

Biosynthese und Metabolismus von 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanon in Erdbeeren

Chemisch-analytische, biochemische und molekularbiologische Studien

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Martina Wein
aus
Erlangen

Würzburg 2001

Eingereicht am:

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:

2. Gutachter:

der Dissertation

1. Prüfer:

2. Prüfer:

3. Prüfer:

des Promotionskolloquiums

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 1998 bis Dezember 2000 am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie in Zusammenarbeit mit dem Julius-von-Sachs Institut für Biowissenschaften, Lehrstuhl für molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik der Universität Würzburg durchgeführt.

Herrn PD Dr. Wilfried Schwab gilt mein herzlicher Dank für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung und die vielfältige Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Ralf Kaldenhoff danke ich herzlich für die problemlose Zusammenarbeit und die wissenschaftliche Betreuung der molekularbiologischen Arbeiten.

Herrn Prof. Dr. P. Schreier gebührt mein Dank für die Unterstützung und die Möglichkeit, an seinem Lehrstuhl zu promovieren.

Mein besonderer Dank gilt Asaph Aharoni vom Plant Research International, Business Unit Cell Cybernetics (Wageningen, Niederlande) für die geduldige Einweisung und Betreuung meiner ersten Gehversuche in der Molekularbiologie.

Für die Bereitstellung des Kaffeeoyl-CoA-Esters bzw. der 1,6-Dichloro-1,6-dideoxyfructose danke ich Till Beuerle, Eran Pichersky (University of Michigan, USA) und Sam Molinary (Tate and Lyle PLC, London, UK). Bei Bianka Pink bedanke ich mich für die Synthese des Arabinose-tetraacetats.

Ganz besonders möchte ich mich bei all den ehemaligen und jetzigen Mitgliedern des Arbeitskreis Schreier und der Arbeitsgruppe Kaldenhoff bedanken, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen und bei kleinen und größeren Problemen jederzeit behilflich waren.

Der LC-MS-Crew, allen voran Birgit Gutsche und Stefanie Diem danke ich dafür, dass sie meine überfallartigen Loop-Injektionen trotz des dichtgepackten Messplans immer untergebracht haben.

Bei allen Korrekturlesern möchte ich mich an dieser Stelle für die fachlichen und grammatikalischen Verbesserungen bedanken.

Schließlich gilt mein Dank der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der German-Israeli Foundation for Scientific Research and Development, die durch Bereitstellung finanzieller Mittel diese Arbeit ermöglicht haben.

PUBLIKATIONSLISTE

Veröffentlichungen

Wein, M., Lavid, N., Lewinsohn, E., Schwab, W. und Kaldenhoff, R.

Isolation, Cloning and Expression of a Multifunctional *O*-Methyltransferase Capable of Forming 2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2*H*)-furanone, One of the Key Aroma Compounds in Strawberry Fruits.

Plant J. **2001**, zur Veröffentlichung eingereicht.

Schwab, W., Wein, M. und Kaldenhoff, R.

Multifunctional Caffeic acid *O*-Methyltransferase.

2001, zur Patentierung eingereicht.

Wein, M., Lewinsohn, E. und Schwab, W.

Metabolic Fate of Isotopes during the Biological Transformation of Carbohydrates to 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanone in Strawberry Fruits.

J. Agric. Food Chem. **2001**, *49*, 2427-2432.

Aharoni, A., De Vos, C.H.R., Wein, M., Sun, Z., Greco, R., Kroon, A., Mol, J.N.M. und O'Connel, A.P.

The strawberry *FaMYB1* transcription factor suppresses anthocyanin and flavonol accumulation in transgenic tobacco.

Plant J. **2001**, *28* (3), 319-332.

Dahlen, T., Hauck, T., Wein, M. und Schwab, W.

2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanone as a Secondary Metabolite from D-Fructose-1,6-diphosphate Metabolism by *Zygosaccharomyces rouxii*.

J. Biosci. Bioeng. **2001**, *91* (4), 352-358.

Kavvadias, D., Beuerle, T., Wein, M., Boss, B., König, T. und Schwab, W.

Novel 1,3-Dioxanes from Apple Juice and Cider.

J. Agric. Food Chem. **1999**, *47*, 5178-5183.

Verhoeven, H.A., Aharoni, A., Wein, M., Blaas, J., Bouwer, R. und van Tunen, A.J.

Genetic Modification of Flavour and Fragrance Production in Plants.

In: Natural Product Analysis, P. Schreier, M. Herderich, H.-U. Humpf, W. Schwab (Hrsg.); Vieweg, Braunschweig, **1998**, 311-312.

Schneider, C., Wein, M., Harmsen, D. und Schreier, P.

A Fatty Acid α -Ketol, a Product of the Plant Lipoxygenase Pathway, Is Oxidized to 3(*Z*)-Dodecendioic Acid by a Bacterial Monooxygenase.

Biochem. Biophys. Res. Commun. **1997**, *232*, 364-366.

Posterbeitrag:

Schwab, W., Dahlen, T., Wein, M., Hauck, T. und Raab, T.

Bioformation of Aroma-Active 4-Hydroxy-3(2*H*)-furanones by the Yeast *Zygosaccharomyces rouxii*.

GDCh-Jahrestagung Chemie 2001, Universität Würzburg 23.-29.09.2001.

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	I
SUMMARY	IV
A EINLEITUNG.....	1
B KENNTNISSTAND.....	3
1 Aroma von Erdbeeren.....	3
2 2,5-Dimethyl-3(2<i>H</i>)-furanone	5
2.1 Entdeckung und Vorkommen.....	5
2.2 Eigenschaften.....	6
2.3 Biosynthese.....	8
2.3.1 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2 <i>H</i>)-furanon	8
2.3.2 2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2 <i>H</i>)-furanon	12
3 Methyltransferasen.....	14
3.1 Allgemeines.....	14
3.2 Pflanzliche <i>O</i> -Methyltransferasen	15
3.3 Strukturelle und funktionelle Eigenschaften von <i>O</i> -Methyltransferasen	17
4 Aufgabenstellung und Zielsetzung.....	20
4.1 Chemisch-analytische und biochemische Untersuchungen.....	20
4.2 Molekularbiologische Untersuchungen	20
C ERGEBNISSE UND DISKUSSION	21
1 Untersuchungen zur Biosynthese von DMHF in Erdbeeren.....	21
1.1 Synthese von stabil markierten Desoxyzuckern.....	21
1.1.1 Synthese von [1- ¹³ C]-1-Desoxy-D-fructose.....	21
1.1.2 Synthese von [6- ² H ₁]-6-Desoxy-D-glucose	22
1.1.3 Synthese von [5,6,6,6- ² H ₄]-6-Desoxyhexulose-1-phosphat	23
1.2 Applikationsversuche mit Erdbeeren.....	24
1.2.1 Grundlagen	24
1.2.2 Erste Messreihe.....	26
1.2.3 Zweite Messreihe.....	29
1.3 Zusammenfassung und Diskussion	37
2 Isolierung und Charakterisierung einer <i>O</i>-Methyltransferase aus Erdbeeren	40
2.1 Strategie	40

2.2	Erstellen einer cDNA-Bibliothek aus Erdbeeren (<i>Fragaria ananassa</i> cv. Elsanta)	41
2.3	Isolierung von OMT-Sequenzen	42
2.4	Gewebespezifische Expression von STOMT	48
2.5	Heterologe Expression von STOMT in <i>Escherichia coli</i>	49
2.6	Aktivitätsbestimmung von STOMT	51
2.7	Diskussion	55
D	MATERIAL UND METHODEN	58
1	Material	58
1.1	Chemikalien	58
1.2	Enzyme	59
1.3	Pflanzenmaterial	59
1.4	Medien und Pufferlösungen	60
1.5	Säulenchromatographie	60
2	Geräte	61
2.1	Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (HRGC-MS)	61
2.2	Isotopenverhältnismassenspektrometrie (HRGC-IRMS)	61
2.3	Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	62
2.4	Hochleistungsflüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie (HPLC-MS/MS)	63
2.5	Kernresonanzspektroskopie (NMR)	63
2.6	Flüssigszintillationszähler (LSC)	64
2.7	Photometer	64
2.8	Sonstige Geräte	64
3	Methoden	65
3.1	Darstellung stabil markierter Monosaccharide	65
3.1.1	[1- ¹³ C]-1-Desoxy-D-fructose	65
3.1.2	[6- ² H ₁]-6-Desoxy-D-glucose	67
3.1.3	[5,6,6,6- ² H ₄]-6-Desoxyhexulose-1-phosphat	69
3.2	Applikationsversuche mit Erdbeeren	70
3.2.1	Applikation	70
3.2.2	Aufarbeitung	70
3.3	Verfahren mit Ribonukleinsäuren (RNA)	71
3.3.1	Isolierung von RNA	71
3.3.2	Elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel	72
3.3.3	Transferverfahren für RNA	73

3.4	Verfahren mit Desoxyribonukleinsäuren (DNA)	74
3.4.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	74
3.4.2	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	74
3.4.3	Auftrennung von DNA	75
3.4.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	76
3.4.5	Klonierung von DNA-Fragmenten	77
3.4.6	Sequenzierung von DNA	79
3.5	Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren	79
3.6	Hybridisierung von Nukleinsäuren	80
3.7	Herstellung einer cDNA-Bibliothek	80
3.7.1	Synthese der cDNA	80
3.7.2	<i>In vitro</i> Verpackung und Titerbestimmung	82
3.7.3	Amplifikation der cDNA-Bibliothek	82
3.7.4	Screeningverfahren	83
3.7.5	<i>In vivo</i> Exzision	84
3.8	Heterologe Expression	85
3.9	Verfahren mit Proteinen	85
3.9.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	85
3.9.2	Konzentrationsbestimmung	87
3.10	Aktivitätsassay	88
3.10.1	Durchführung	88
3.10.2	Produkt-Analyse	88
E	LITERATURVERZEICHNIS	89
F	ANHANG	100
1	Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren	100
2	Oligonukleotide	100
3	Eingesetzte Vektoren	101
3.1	pBluescript SK	101
3.2	pCR [®] 2.1-TOPO [®]	102
3.3	pGEX	103

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

δ	chemische Verschiebung
$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$	Isotopenverhältnis in Promille, gemessen am Standard <i>Pee Dee Belemnite</i>
^{14}C -DMHF	4-Hydroxy-2(oder 5)-[^{14}C]methyl-5(oder 2)-methyl-3(2 <i>H</i>)-furanon
^{14}C -SAM	<i>S</i> -Adenosyl-L-[<i>methyl</i> - ^{14}C]methionin
2-BE	2-Butoxyethanol
Abb.	Abbildung
AEDA	Aroma Extraction Dilution Analysis (Aromaextraktions-Verdünnungsanalyse)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
CCOMT	Caffeoyl CoA <i>O</i> -Methyltransferase (Kaffeesäure-CoA <i>O</i> -Methyltransferase)
cDNA	copy DNA (komplementäre DNA)
CoA	Coenzym A
COMT	Caffeic acid <i>O</i> -Methyltransferase (Kaffeesäure <i>O</i> -Methyltransferase)
cv.	Cultivar (Kulturvarietät)
d	Dublett
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
df	Filmdicke von Trennphasen
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DMHF	2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2 <i>H</i>)-furanon
DMMF	2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2 <i>H</i>)-furanon
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
dpm	Desintegrations per minute (Zerfälle pro Minute)
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
E.C.	Enzyme Commission (Enzym Klassifizierungsnummer)
EB-Puffer	Extraktionspuffer
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	Elektronenstoßionisierung
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector (Verdampfungs-Lichtstredetektor)
ESI	Elektrosprayionisierung
FD	Flavour Dilution (Aroma-Verdünnung)
FDP	Fructosediphosphat (Fructose-1,6-bisphosphat)

G-3-P	Glycerinaldehyd-3-phosphat
GC	Gaschromatographie
GST	Glutathion- <i>S</i> -transferase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigchromatographie)
HRGC	High Resolution Gas Chromatography (Kapillargaschromatographie)
i.D.	innerer Durchmesser
IEMT	Isoeugenol <i>O</i> -Methyltransferase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
IRMS	Isotope Ratio Mass Spectrometry (Isotopenverhältnismassenspektrometrie)
kb	Kilobasen
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
LB	Luria-Bertani
LSC	Liquid Scintillation Counting (Flüssigszintillationsmessung)
M	Molekölion
m	Multipllett
<i>m/z</i>	Masse-Ladungsverhältnis
MEN-Puffer	Morpholinopropansulfonsäure/EDTA/Natriumacetat-Puffer
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mRNA	Messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
NAD^+	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
NDP	Ribonukleosid-5'-diphosphat
NIH	National Institute of Health (USA)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Kernmagnetische Resonanz)
OD_{600}	Optische Dichte bei 600 nm
OMT	<i>O</i> -Methyltransferase
ORF	Open Reading Frame (offenes Leseraster)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
pfu	Plaque Forming Units (Plaque-bildende Einheiten)
<i>Pi</i>	ortho-Phosphat
PI-OMT	Plant OMT (Pflanzliche <i>O</i> -Methyltransferase)
PP	Probenpuffer
ppb	parts per billion (Anteile pro Milliarde)
ppm	parts per million (Anteile pro Million)

q	Quartett
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
R _t	Retentionszeit
s	Singulett
SAH	<i>S</i> -Adenosyl-L-homocystein
SAM	<i>S</i> -Adenosyl-L-methionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SM-Puffer	Natrium/Magnesium-Puffer
SSC-Puffer	Natriumcitrat-Puffer
t	Triplett
TAE-Puffer	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
Tab.	Tabelle
TBE-Puffer	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u	Atomare Masseneinheit
U	Unit (μmol/min)
UDP	Uridindiphosphat
UPM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V _{max}	Maximale Umsatzgeschwindigkeit
XAD	Spezialadsorberharz aus Amberlite® XAD

Anmerkung:

In der Arbeit wurden für natürlich vorkommende, chemische Verbindungen weitgehend die in der Aromaforschung und Molekularbiologie üblichen Trivialnamen verwendet.

Die Namen von Gensequenzen (z. B. *STOMT*) erfolgte in kursiver Schreibweise, wohingegen die entsprechenden Proteine (*STOMT*) in normaler Schreibweise dargestellt wurden.

ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit präsentiert neue Erkenntnisse zur Biosynthese von 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanon (DMHF) und 2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2*H*)-furanon (DMMF), zwei wichtigen Aromakomponenten in Erdbeeren. Potentielle, mit stabilen Isotopen markierte Vorläufersubstanzen wurden an Erdbeeren appliziert und drei Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Der Nachweis über den erfolgreichen Einbau erfolgte mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie. Anhand der Massenspektren von DMHF und DMMF, die aus den behandelten Erdbeeren mittels Festphasenextraktion isoliert wurden, konnte der Markierungsgrad der Verbindungen ermittelt werden und somit Rückschlüsse über die Effizienz der Metabolisierung der applizierten Zucker zu den beiden Furanonen DMHF und DMMF gezogen werden. Als mögliche Ausgangsstoffe dienten unterschiedlich markierte D-Glucose und D-Fructose, sowie Desoxyzucker, da diese als direkte Vorläufersubstanzen von DMHF und DMMF diskutiert werden. Isotopenmarkierte Desoxy-D-glucose oder Desoxy-D-fructose sind kommerziell nicht erhältlich, weshalb die Verbindungen [1-¹³C]-1-Desoxy-D-fructose, [6-²H₁]-6-Desoxy-D-glucose und [5,6,6,6-²H₄]-6-Desoxyhexulose-1-phosphat zuerst synthetisiert werden mussten.

Nach Applikation der Desoxyzucker wurde keine Erhöhung des Markierungsgrades an stabilen Isotopen gegenüber dem natürlichen Isotopenverhältnis festgestellt. Somit können 6-Desoxy-D-glucose, 1-Desoxy-D-fructose und 6-Desoxy-D-fructose-1-phosphat als Prekursoren von DMHF und DMMF ausgeschlossen werden. Als gute Vorläufersubstanzen erwiesen sich D-Glucose und D-Fructose. Markierungen (¹³C und ²H) an Position C-1 oder C-6 der beiden Verbindungen wurden sowohl in DMHF als auch in dessen Methoxyderivat DMMF detektiert, wobei die Applikation von D-Fructose im Gegensatz zur D-Glucose einen höheren Markierungsgrad der Zielverbindungen zur Folge hatte.

Durch den Einsatz positionsspezifisch markierter D-Glucose (²H-Markierung an Position C-1, C-2 oder C-4) sollten Aufschlüsse über den Metabolisierungsmechanismus gewonnen werden. Die Markierung der D-[2-²H]Glucose befand sich wie die der D-[1-²H]Glucose in den Methylgruppen der Furanone, was nur durch eine intramolekulare Verschiebung von C-2 nach C-1 erklärbar ist. Diese wurde bei der Glucosephosphatisomerase-katalysierten Umwandlung von D-Glucose-6-phosphat zu D-Fructose-6-phosphat beobachtet. Somit muss D-Glucose bei der Biosynthese von DMHF und DMMF zuerst in diese Intermediate überführt werden. Im Gegensatz zu an Position C-2 markierter D-Glucose ging das Proton an Position C-4 im Laufe der Metabolisierung verloren. Demzufolge findet der in der Natur verbreitete Desoxygenierungsmechanismus von Monosacchariden nicht statt und schließt die Beteiligung von Desoxyzuckern an der Biosynthese von DMHF und DMMF gänzlich aus. Nach Einsatz von uniform markierter D-Fructose konnte sechsfach markiertes DMHF und DMMF identifiziert werden, was durch den Einbau der intakten Kohlenstoffkette zu erklären ist. Dieser Befund und weitere Untersuchungen mit verschiedenen Glykolyse-regulierenden Substanzen deuteten darauf hin, dass die Furanone dem zentralen Kohlenhydratstoffwechsel, der Glykolyse, entspringen. Vor der Aldolase-

katalysierten Spaltung in zwei C₃-Einheiten muss jedoch eine Abzweigung erfolgen, da sonst die Kohlenstoffkette nicht unverändert vorliegen könnte.

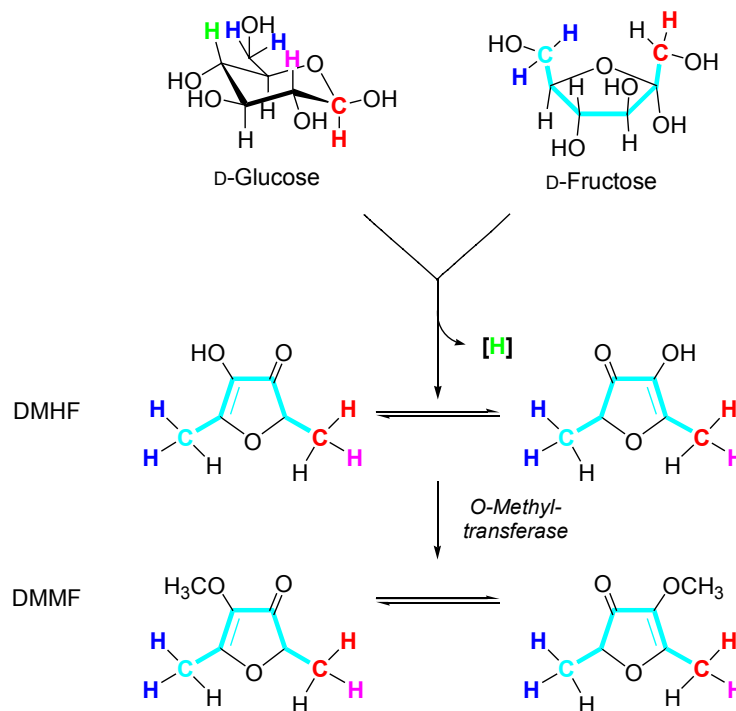


Abb. I Wiederfindung der positionsspezifischen, stabilen Isotopen aus D-Glucose und D-Fructose in den Zielmolekülen DMHF und DMMF.

Im zweiten Teil der Arbeit ist erstmals mit Hilfe von molekularbiologischen Techniken die vollständige cDNA einer *O*-Methyltransferase (OMT) aus Erdbeeren isoliert worden. Hierfür wurde mRNA aus reifenden Erdbeeren extrahiert und eine cDNA Bibliothek hergestellt. Diese wurde mit einer OMT-spezifischen Sonde durchmustert, welche durch PCR mit degenerierten Primern synthetisiert worden war. Nach mehreren Vereinzelnungs-Zyklen konnte die vollständige cDNA einer *O*-Methyltransferase (*STOMT*, Strawberry OMT) erhalten werden. Northern-Analysen ergaben, dass die entsprechende RNA ausschließlich in den verschiedenen Reifestadien der Frucht akkumuliert, mit den höchsten Transkriptmengen in der rot-werdenden und reifen Frucht. In anderen Gewebeteilen wie Wurzel, Blätter, Stängel und Blüte konnte keine *STOMT*-RNA nachgewiesen werden. Das korrespondierende Protein zeigte hohe Homologien zu Kaffeesäure-OMTs aus Weidengewächsen der Gattung *Populus*.

Nach erfolgreicher, heterologer Expression von *STOMT* in *E. coli* wurde die Substratspezifität des Enzyms untersucht, dessen Temperaturoptimum bei 30°C lag. Alle eingesetzten Substrate mit phenolischem Grundgerüst, wie Brenzcatechin, Kaffeesäure, Kaffeeoyl-CoA und 3,4-Dihydroxybenzaldehyd, aber auch das Furanonderivat DMHF wurden von der rekombinanten *O*-Methyltransferase umgesetzt. Als bestes Substrat erwies sich 3,4-Dihydroxybenzaldehyd, das, im Gegensatz zu dessen Methylierungsprodukt Vanillin, bisher in Erdbeeren nicht nachgewiesen werden konnte. Kaffeesäure wurde ebenfalls effektiv methyliert, worin vermutlich die Hauptaufgabe von *STOMT* in der Pflanze liegt. Die Methylierung von Kaffeesäure oder 5-Hydroxyferulasäure ist ein wichtiger Prozess in der Entstehung von Lignin.

Die Tatsache, dass Erdbeeren teilweise in den Leitbündeln und verstärkt in den Achenen lignifiziert sind, erklärt das Vorhandensein eines solchen Enzyms.

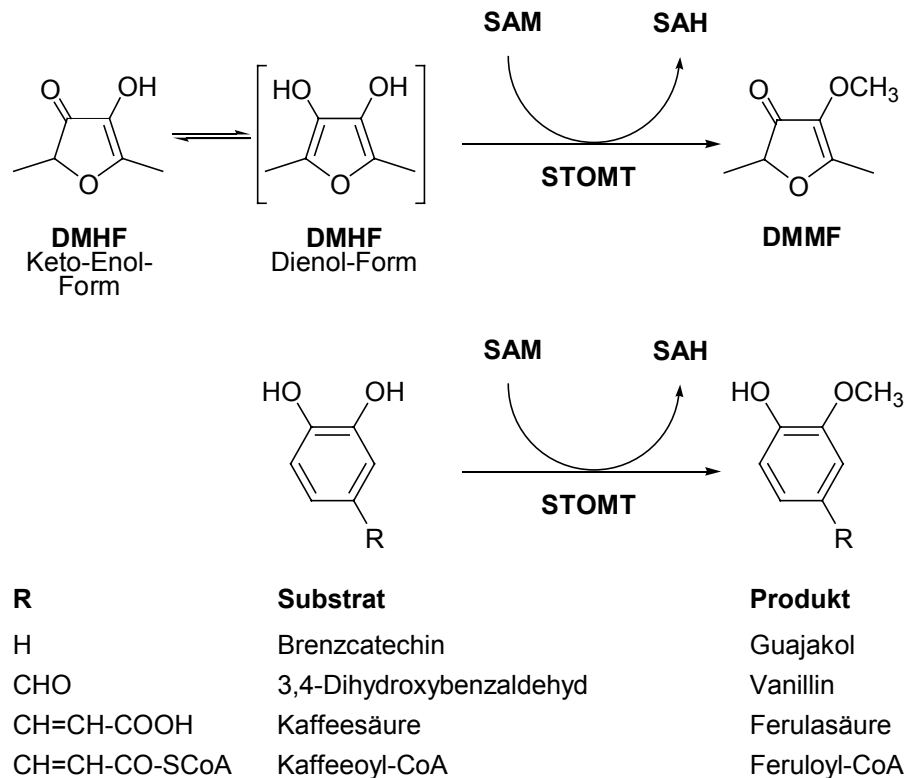


Abb. II Reaktionsschema der Methylierung mit den von STOMT (*O*-Methyltransferase aus Erdbeeren) umgesetzten Substraten. SAM: *S*-Adenosyl-L-methionin, SAH: *S*-Adenosyl-L-homocystein.

DMHF, das als Dienol-Tautomer eine aromatische Struktur mit Hydroxylgruppen aufweist und somit strukturelle Ähnlichkeiten zu phenolischen Verbindungen zeigt, wurde ebenfalls von STOMT als Substrat akzeptiert. Die Bildung von DMMF, dem Methoxyderivat von DMHF erfolgte vergleichsweise langsam, war aber eindeutig auf die Methyltransferase-Aktivität zurückzuführen. STOMT ist aufgrund des Expressionsmusters als fruchtspezifisch und reifeinduziert einzustufen. Primäre Funktion ist vermutlich zu Beginn der Fruchtreifung die Lignifizierung der Leitbündel und später die der Achenen. Gleichzeitig scheint STOMT wesentlich an der Bildung der Aromastoffe DMMF und Vanillin in Erdbeeren beteiligt zu sein.

SUMMARY

The present work reveals new insight in the biosynthesis of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanone (DMHF) and 2,5-dimethyl-4-methoxy-3(2*H*)-furanone (DMMF), two important flavor compounds in strawberries. Isotopically labeled precursors were applied to detached strawberries and incubated for three days at room temperature. The successful incorporation of the isotopes was determined by gas chromatography-mass spectroscopy. On the basis of the mass spectra of DMHF and DMMF, isolated from treated strawberries by solid phase extraction, the ratio of labeled and unlabeled compounds was determined. Thus, the conversion of sugars to the furanones DMHF and DMMF could be analyzed in regard to efficiency of metabolism. Differently labeled D-glucose, D-fructose and deoxysugars were used as they are considered to be good precursors of DMHF and DMMF. [1-¹³C]-1-Deoxy-D-fructose, [6-²H₁]-6-deoxy-D-glucose and [5,6,6,6-²H₄]-6-deoxyhexulose-1-phosphate had to be synthesized first since these isotopically labeled deoxysugars are not commercially available.

After application of the labeled deoxysugars, the ratio of stable isotopes did not change in comparison with the natural isotopic ratio. As a consequence 6-deoxy-D-glucose, 1-deoxy-D-fructose and 6-deoxyhexulose-1-phosphate can be ruled out as precursors of DMHF and DMMF. D-Glucose and D-fructose were converted efficiently to the furanones. The isotopic label (¹³C and ²H) from position C-1 and C-6 of both carbohydrates was detected in DMHF and its derivative DMMF. In contrast to D-glucose, D-fructose was metabolized more efficiently to the target molecules as the furanones showed a higher degree of labeling.

The use of D-glucose labeled at different positions should provide information about the mechanism of the biosynthesis. The label of D-[2-²H]glucose as well as that of D-[1-²H]glucose was recovered in the methyl group of the furanones. This observation was explained by an intra molecular isotope shift from position C-2 to C-1 which was observed in the course of the conversion of D-glucose-6-phosphate to D-fructose-6-phosphate mediated by phosphohexose isomerase. Consequently, D-glucose has to be transformed into these intermediates prior to the formation of DMHF and DMMF. In contrast to D-glucose, which was labeled at position C-2, the label at position C-4 was lost during the transformation. Therefore, the natural mechanism of deoxygenation might not occur during the biosynthesis of DMHF and DMMF. After application of D-[U-¹³C₆]fructose the incorporation of six ¹³C atoms into DMHF and DMMF was detected. This implies that the complete carbon skeleton is incorporated. These findings and additional studies with different regulatory substances of the glycolysis indicated that the central metabolism of carbohydrates (glycolysis) is involved in the biosynthesis of furanones. Prior to the final cleavage into two C₃-fragments by aldolase, another pathway has to branch off, as otherwise the skeleton can not remain unchanged.

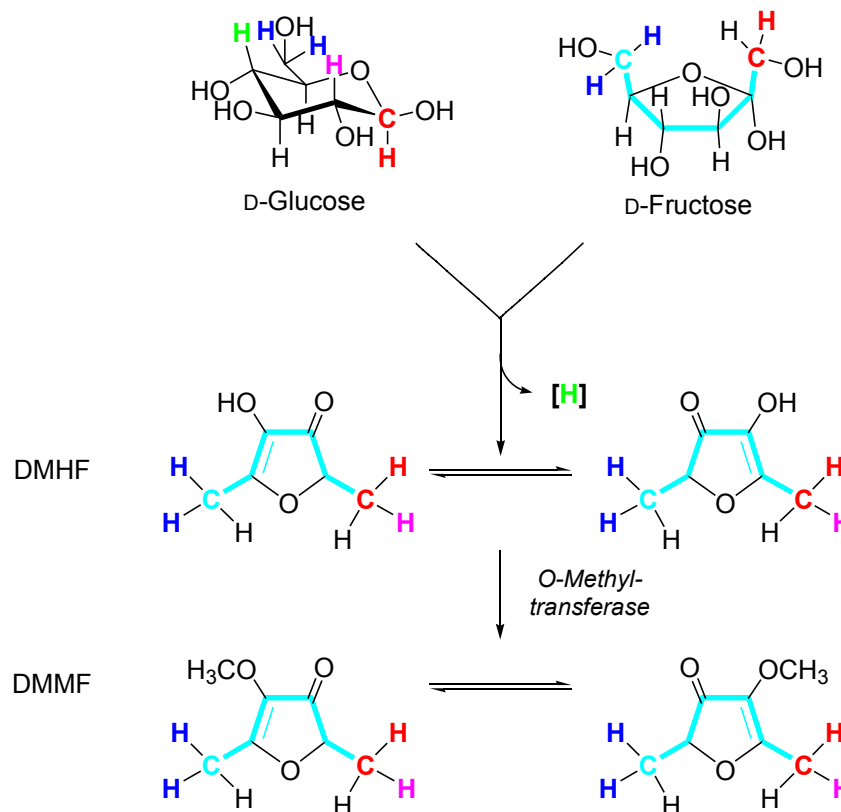


Fig. I Metabolic fate of isotopes during the biological transformation of D-glucose and D-fructose into DMHF and DMMF.

In the second part of the thesis the complete cDNA of a *O*-methyltransferase from strawberry was isolated by the means of molecular techniques. First, mRNA was extracted from turning strawberries to construct a cDNA library. An OMT specific fragment, synthesized by PCR with degenerated primers, was used as probe in order to screen the cDNA library. After few cycles of separation a complete cDNA coding for a putative *O*-methyltransferase (*STOMT*, strawberry OMT) was obtained. Northern analysis revealed high abundance in the different stages of fruit ripening while highest RNA levels were found in turning and ripe fruit. On the contrary, there were no *STOMT*-RNA transcripts in other tissue such as root, leaf, petiole and flower. The corresponding protein showed high homology to caffeic acid OMTs from *Salicacea* (*Populus*).

STOMT was successfully expressed in *E. coli* in order to determine the substrate specificity. The enzyme showed highest activity at 30°C. All tested phenolic compounds such as catechol, caffeic acid, caffeoyl CoA and protocatechuic aldehyde as well as the furanone derivative DMHF were accepted by the recombinant *O*-methyltransferase. *STOMT* converted most rapidly protocatechuic aldehyde, which has not been detected in strawberry yet, to its methylated counterpart vanillin. Caffeic acid was also accepted to a high degree, which is probably the main function in strawberry. The methylation of caffeic acid and 5-hydroxyferulic acid is an important process in the formation of lignin. The fact that the vascular bundles contain lignin and the achenes are strongly lignified explains the presence of such an enzyme in strawberry.

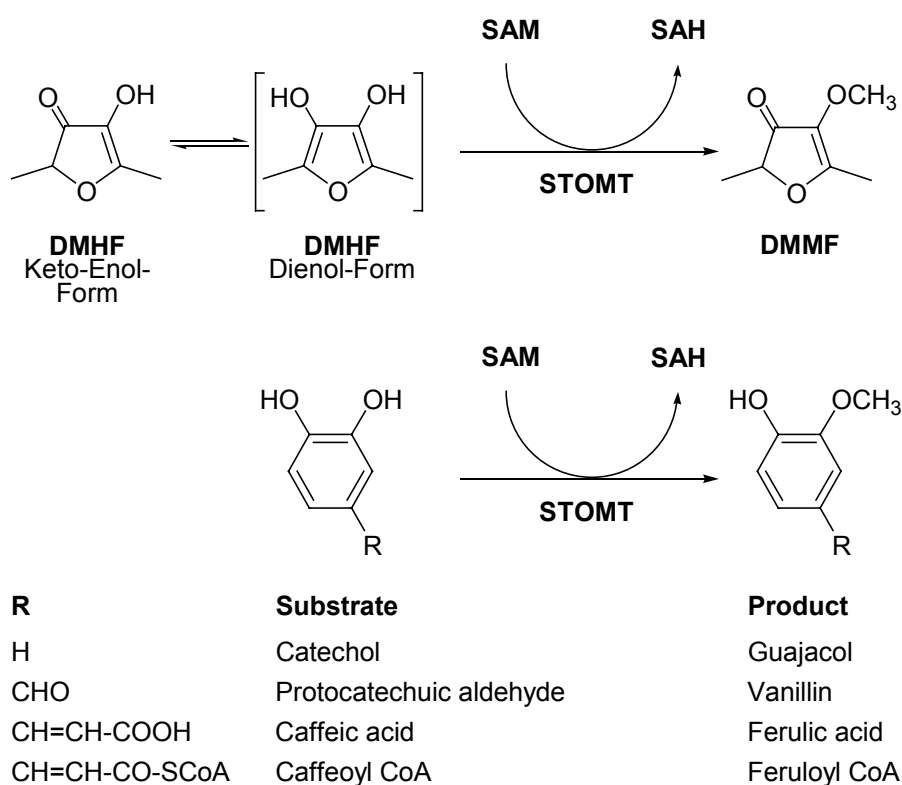


Fig. II Conversion of several substrates, accepted by STOMT (strawberry *O*-methyltransferase). SAM: *S*-adenosyl-L-methionine, SAH: *S*-adenosyl-L-homocysteine.

The dienolic tautomer of DMHF exhibiting an aromatic structure with two hydroxy groups shows structural homology to phenolic compounds. Therefore, DMHF was accepted as substrate by STOMT. Although the conversion proceeds quite slowly, unequivocally the methoxy derivative descends from DMHF by OMT activity. In accordance with its expression pattern in strawberry, STOMT is fruit specific and induced during ripening. In the course of the maturation, the primary function of STOMT is probably the lignification of the vascular bundles in the beginning and later that of the achenes. On the other hand, STOMT seems to be substantially involved in the biosynthesis of the flavor compounds DMMF and vanillin, too.

A EINLEITUNG

Erdbeeren sind aufgrund ihres Aromas bei den Verbrauchern weltweit sehr beliebt. Die Erdbeerpflanze gehört zur Familie der Rosengewächse (*Rosaceae*) und bildet fleischige Scheinfrüchte. Der eigentlich genießbare Teil der Frucht ist der vergrößerte, saftige Blütenboden, dem außen, gut sichtbar, die kleinen Samen, die auch als Nüsschen oder Achenen bezeichnet werden, aufsitzen. Erdbeeren sind süß, aromatisch, reich an Vitaminen und besitzen einen geringen Brennwert. Aus diesem Grund eignen sie sich sowohl zum Frischverzehr als auch zum Verfeinern von Süßspeisen und Desserts. Weltweit werden jährlich über 2,5 Mio. Tonnen Erdbeeren angebaut und geerntet. Die Anbaugelände, die sich hauptsächlich in der nördlichen Hemisphäre befinden, erstrecken sich dabei über alle klimatischen Zonen (Hancock 1999). Trotz dieser weiten Verbreitung und den hohen Produktionszahlen reicht einem Bericht der Neuen Züricher Zeitung vom 26.06.2001 zufolge die gesamte Welt-Erdbeerernte gerade aus, um 5 % des amerikanischen Bedarfs an „Erdbeergeschmack“ zu decken. Milchprodukte, wie Erdbeeryoghurt oder -quark, aber auch andere Lebensmittel mit Erdbeergeschmack erfreuen sich immer größerer Beliebtheit. Somit steigt auch die Nachfrage an Erdbeeraroma, das sich aus einer Vielzahl an verschiedenen Verbindungen zusammensetzt. Auch wenn bei der Deklaration von Aromastoffen per Gesetz nicht mehr auf die Herkunft „natürlich“ oder „naturidentisch“ hingewiesen werden muss, so ist doch der Trend der Lebensmittelindustrie hin zum „natürlichen“ Aroma erkennbar. Ursache dafür ist sicherlich die allgemeine Verbrauchererwartung, die eine natürliche Substanz dem „Reagenzglas-Aromastoff“ vorzieht. So werden Produkte, die die Zutat „natürliches Aroma“ aufweisen, qualitativ hochwertiger eingestuft als Produkte, die mit der Zutat „Aroma“ gekennzeichnet sind. Die Gewinnung der nötigen natürlichen Erdbeeraromastoffe aus der Frucht ist, wie oben angedeutet, aus rein produktionstechnischen Gründen nicht möglich. Nach Anlage 1 der Aromenverordnung in der Fassung vom 29.01.1998 werden Aromastoffe auch dann als natürlich deklariert, wenn sie durch enzymatische oder mikrobiologische Verfahren aus beliebigen pflanzlichen Ausgangsstoffen gewonnen werden. Die Simulation der pflanzlichen Aromastoffproduktion setzt aber das Wissen über den vollständigen Biosyntheseweg voraus. Auch wenn sich das Erdbeeraroma nur schwer auf einzelne Verbindungen beschränken lässt, so scheinen dennoch zwei Carbonylverbindungen, 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanon (DMHF) und 2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2*H*)-furanon (DMMF) eine wichtige Stellung einzunehmen (Hirvi und Honkanen 1982, Larsen und Mitarbeiter 1992). Trotz intensiver Forschungen in den letzten drei Jahrzehnten ist es bisher nicht gelungen, den natürlichen Bildungsweg dieser beiden aromawirksamen Verbindungen in der Erdbeere im Detail aufzuklären.

Ziel dieser Arbeit war es daher, neue Erkenntnisse über die Biosynthese von DMHF und DMMF in Erdbeeren zu erlangen. Sie knüpft dabei direkt an die Ergebnisse von Herrn René Roscher (1998) an, der im Rahmen seiner Doktorarbeit den Einbau radioaktiv markierter Prekursoren nach Verfütterung an Erdbeeren nachweisen konnte. In der vorliegenden Studie sollten allerdings stabile Isotope zum Einsatz kommen, eine ebenfalls bewährte Technik zur Aufklärung von Biosynthesemechanismen. Mit Hilfe von positionsspezifischen Markierungen in potentiellen

Vorläuferverbindungen können Stoffwechselwege nachvollzogen werden, wenn sich die Markierung nach Metabolisierung in der Pflanze in den Zielmolekülen befindet (Schmidt und Schmelz 1980). Des Weiteren wurden molekularbiologische Methoden herangezogen, um die Bildung des Methoxyethers DMMF aufzuklären, der theoretisch durch Aktivität einer Methyltransferase aus DMHF hervorgeht. Dabei wurden Sequenzhomologien auf DNA-Ebene genutzt, die eine begrenzte Vorhersage über die Funktionalität des kodierten Proteins erlauben. Aufgrund der inzwischen zahlreich publizierten Gene und der entsprechenden Proteine in öffentlichen Datenbanken (GenBank, www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankSearch.html oder Swiss-Prot, www.expasy.ch/sprot/) können isolierte DNA-Sequenzen mit bereits charakterisierten Sequenzen verglichen werden und somit vorab selektiert werden. Die auf diese Weise ausgewählten Gene werden schließlich charakterisiert und durch heterologe Expression in mikrobiellen Systemen auf ihre tatsächlichen Eigenschaften hin untersucht.

B KENNTNISSTAND

1 Aroma von Erdbeeren

Das Aroma der Erdbeere setzt sich aus einer Vielzahl verschiedener Komponenten zusammen. Bis heute wurden über 300 Verbindungen beschrieben, die an der Aromabildung beteiligt sind. Die zahlenmäßig am stärksten vertretenen Substanzklassen sind Ester, Alkohole, Säuren und Carbonylverbindungen. Des Weiteren werden Acetale, Lactone, Furanone, Terpene, aromatische und schwefelhaltige Verbindungen genannt (Maarse und Visscher 1992, Honkanen und Hirvi 1990). Es handelt sich somit um eine komplexe Mischung, die zudem sortenspezifisch große Unterschiede aufweist (Hirvi 1982, Douillard und Guichard 1989, Ulrich und Mitarbeiter 1995). Trotz dieser großen Zahl an aromawirksamen Komponenten sind nur wenige tatsächlich für den typischen Erdbeergeschmack verantwortlich. Sundt (1970) beschrieb 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanon (DMHF, Furaneol[®]) als die wichtigste Aromakomponente in Erdbeeren, wohingegen Pyysalo und Mitarbeiter (1979) 2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2*H*)-furanon (DMMF) als Hauptaromakomponente der Walderdbeere (*Fragaria vesca*) identifizierten. Andererseits wurden auch Ester geradkettiger, flüchtiger Carbonsäuren als die bedeutendsten Aromabestandteile betrachtet (Dirinck und Mitarbeiter 1981), wobei in der Studie von Schreier (1980) zusätzlich noch (*E*)-2-Hexenal, (*E*)-2-Hexen-1-ol und DMHF Erwähnung fanden. Alle genannten Studien haben eine in erster Linie quantitative Betrachtung der Messergebnisse gemein. Dem Phänomen Geschmack bzw. Geruch ist damit aber nicht genüge getan. So ist generell bei der Bewertung von aromawirksamen Substanzen auf deren tatsächlichen Beitrag zum Aroma zu achten. Eine Möglichkeit, diesen zu bestimmen, ist die Ermittlung des „Aromawerts“. Hierbei handelt es sich um den Quotienten der im Lebensmittel auftretenden Konzentration eines Aromastoffs und dessen Geruchsschwellenwert, also der niedrigsten Konzentration, bei der diese Verbindung noch als solche wahrgenommen werden kann. Der Aromawert ist daher ein Maß für die Geruchswirksamkeit und ermöglicht den direkten Vergleich zwischen verschiedenen Verbindungen (Rothe und Thomas 1963). Ein vergleichbares Maß in der Aromaforschung ist der durch Aromaextraktions-Verdünnungsanalyse (AEDA, Aroma Extract Dilution Analysis) ermittelte Verdünnungsfaktor (FD-Faktor, Flavour-Dilution). Hierbei wird ein Aromaextrakt kontinuierlich verdünnt und durch Kapillargaschromatographie-Olfaktometrie der Verdünnungsfaktor bestimmt, bei der eine Verbindung gerade noch erkennbar ist (Ullrich und Grosch 1987, Acree 1993). Eine Substanz ist demnach um so aromawirksamer, je höher der Wert ist. Eine Sättigung der Geruchsrezeptoren bei hoher Konzentration wird hierbei aber nicht berücksichtigt.

Hirvi und Honkanen (1982) konnten in drei verschiedenen Erdbeersorten (Annelie, Alaska P., Senga Sengana) und in der Walderdbeere (*Fragaria vesca* L.) die höchsten Aromawerte für Ethylhexanoat, Ethylbutanoat, (*E*)-2-Hexenal und DMMF feststellen. Ebenfalls sortenunabhängig wurden in einer weiteren Studie DMHF und Ethylhexanoat als die Verbindungen mit den höchsten Aromawerten ermittelt. In vier^(*) von sechs Sorten (Elsanta, Elvira^{*}, Dania, Bogota^{*}, Pandora^{*}, Senga Sengana^{*}) konnte bei dieser Untersuchung Ethylbutanoat als Verbindung mit

dem höchsten Aromawert festgestellt werden (Larsen und Mitarbeiter 1992). Bei der sensorischen Analyse einer Modellaromalösung, bestehend aus den für Senga Sengana wichtigsten Komponenten, zeigte sich, dass keine Verbindung allein in der Lage ist, das natürliche Erdbeeraroma zu simulieren. Das Fehlen bzw. Vorhandensein von Substanzen bis zu einem Aromawert von 1000 teilweise sogar 100 kann in Modellaromalösungen deutliche sensorische Unterschiede hervorrufen (Larsen und Poll 1992). In zwei weiteren Studien wurde das Aromaprofil jeweils einer Erdbeersorte mittels AEDA untersucht und für die Verbindungen mit den höchsten FD-Faktoren zusätzlich die Aromawerte festgestellt. In der Sorte Senga Sengana wurden hierbei (*Z*)-3-Hexenal, DMMF, und 2-Methylbuttersäure als die entscheidenden Aromakomponenten ermittelt (Fischer und Hammerschmidt 1992). Bei einem vergleichbaren Vorgehen konnten Schieberle (1994) bzw. Schieberle und Hofmann (1997) DMHF, (*Z*)-3-Hexenal, Methylbutanoat, Ethylbutanoat und Ethyl-2-methylpropanoat als die Substanzen mit den höchsten FD-Faktoren und Aromawerten in einer nicht näher beschriebenen spanischen Erdbeersorte feststellen. Bei einer anschließenden sensorischen Überprüfung eines Modellerdbeersafts bestehend aus den zwölf bedeutendsten Komponenten, wurden DMHF und (*Z*)-3-Hexenal als die wichtigsten Bestandteile identifiziert, deren Fehlen sich in einem deutlich veränderten Geruchseindruck im Vergleich zum typischen Erdbeergeruch bemerkbar machten.

Wie an den vorgestellten Ergebnissen ersichtlich wird, ist es nahezu unmöglich, den typischen Erdbeergeschmack an einzelnen Substanzen festzumachen. So kommen verschiedene Arbeitsgruppen selbst bei der Untersuchung der selben Erdbeersorte zu verschiedenen Ergebnissen. Auffällig ist hierbei die Tatsache, dass in nahezu allen Studien entweder DMHF oder DMMF als eine der wichtigsten Aromabestandteile genannt werden. So sind die beiden Furanoderivate zweifellos als Schlüsselkomponenten des Erdbeeraromas zu betrachten.

2 2,5-Dimethyl-3(2H)-furanone

2.1 Entdeckung und Vorkommen

Rodin und Mitarbeiter isolierten 1965 erstmals eine intensiv nach angebrannter Ananas riechende Verbindung aus 250 frisch gepressten Ananasfrüchten. Diese als Hauptaromakomponente der Ananas bezeichnete Substanz konnte anhand spektroskopischer Daten als 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanon (DMHF) identifiziert werden. Noch im selben Jahr bestätigten Willhalm und Mitarbeiter (1965) durch eigene Messungen die vorgeschlagene Struktur. Sie wiederholten eine von Hodge (1960) veröffentlichte Synthese, bei der Rhamnose und Piperidinacetat zu DMHF umgesetzt wurden. Durch anschließende Derivatisierungen (Methylierung, Acetylierung und Oxidation) konnten die postulierten Strukturelemente eindeutig nachgewiesen werden. In den folgenden Jahren wurde DMHF auch in zahlreichen anderen Früchten dokumentiert wie etwa: Erdbeere (Ohloff 1969, Sundt 1970), arktische Moosbeere (Kallio 1976), Himbeere (Honkanen und Mitarbeiter 1980), Weintraube (Rapp und Mitarbeiter 1980), Mango (Pickenhagen 1981) und Tomate (Buttery und Mitarbeiter 1994). In vielen der genannten Früchte (Ananas, Erdbeere, Mango und Tomate) liegt DMHF zusätzlich in gebundener Form, als DMHF- β -D-Glucopyranosid (DMHF-Glucosid) und DMHF-6'-O-malonyl- β -D-Glucopyranosid (DMHF-Malonylglucosid) vor (Roscher und Mitarbeiter 1996, Schwab und Roscher 1997). Interessanterweise beschränkt sich die Existenz von DMHF auf die Früchte. Aus anderen Teilen der Pflanze, wie etwa Wurzel, Blätter oder Stängel, konnte DMHF trotz intensiver Untersuchungen bisher nicht isoliert werden.

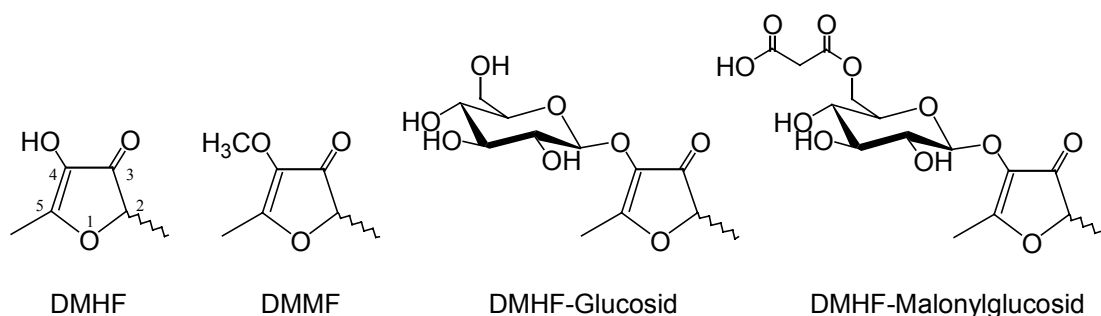


Abb. 1 Strukturformeln von 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanon (DMHF), 2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanon (DMMF), DMHF- β -D-glucopyranosid (DMHF-Glucosid) und DMHF-6'-O-malonyl- β -D-glucopyranosid (DMHF-Malonylglucosid).

Des Weiteren findet sich DMHF in vielen thermisch behandelten Lebensmitteln wieder. In kohlenhydrat- und proteinhaltigen Lebensmitteln kommt es durch Hitzeeinwirkung zur sogenannten Maillard-Reaktion, bei der reduzierende Zucker durch Einwirkung von Aminen dehydratisiert und zyklisiert werden (Ledl und Schleicher 1990). Dabei entstehen eine Reihe von aromawirksamen Verbindungen, unter anderem auch DMHF. So konnte DMHF in zahlreichen Backwaren (Brot, Biskuitkuchen, Chips), Fleischprodukten (Rind, Schwein, Fisch) und gerösteten Waren (Kaffee, Popcorn, Malz) identifiziert werden (Schwab und Roscher 1997, Roscher 1998).

Da verschiedene Mikroorganismen in der Lage sind, 4-Hydroxy-3(2*H*)-furanone zu produzieren, wurde DMHF auch in einigen Lebensmitteln nachgewiesen, die einem fermentativen Prozess unterliegen. DMHF ist wichtiger Aromabestandteil von Emmentaler und Cheddar Käse, wobei sich hauptsächlich Milchsäurebakterien als DMHF-Produzenten herausgestellt haben (Preininger und Grosch 1994/1995, Milo und Reineccius 1997). Eine untergeordnete Rolle spielt DMHF in Sojasauce, bei deren Herstellung verschiedene Hefen (*Zygosaccharomyces rouxii*, *Candida*) eingesetzt werden. Das Aroma der Sojasauce wird vielmehr von dessen Ethyl-Homologen 2-Ethyl-4-hydroxy-5-methyl-3(2*H*)-furanon bzw. 5-Ethyl-4-hydroxy-2-methyl-3(2*H*)-furanon geprägt (Nunomura und Mitarbeiter 1976/1980).

Der Methylether von DMHF, 2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2*H*)-furanon (DMMF), wurde 1965 von Willhalm und Mitarbeitern als Reaktionsprodukt von DMHF und Diazomethan beschrieben. Im Jahre 1974 gelang es Hunter und Mitarbeitern, DMMF als Hauptkomponente im Aromaextrakt aus Mangopüree zu identifizieren. Zwei Jahre später wurde es als entscheidende Aromakomponente in arktischen Moosbeeren erkannt (Kallio 1976). Vergleichbar mit DMHF konnte auch DMMF im Folgenden aus weiteren Früchten isoliert werden, nämlich Erdbeeren (Pyysalo und Mitarbeiter 1979), Weintrauben (Rapp und Mitarbeiter 1980), Himbeeren (Honkanen und Mitarbeiter 1980), Ananas (Pickenhagen und Mitarbeiter 1981), Kiwi (Takeoka und Mitarbeiter 1986) und Brombeeren (Georgilopoulos und Gallois 1987). Im Gegensatz zu DMHF spielt DMMF weder bei Erhitzungs- noch bei Fermentationsprozessen eine Rolle.

2.2 Eigenschaften

Sowohl DMHF als auch DMMF besitzen ein asymmetrisches Kohlenstoffatom an Position C-2 und sind daher als chirale Verbindungen zu betrachten. Obwohl enzymatische Reaktionen gewöhnlich durch einen hohen Grad an Stereospezifität charakterisiert sind, konnten bisher aus pflanzlichen Quellen nur racemische Mischungen isoliert werden. Die Ursache hierfür ist vermutlich auf eine Säure-katalysierte Keto-Enol-Tautomerie zurückzuführen (Bruche und Mitarbeiter 1991, Wintoch und Mitarbeiter 1991).

Die Enol-Struktur von DMHF erlaubt es somit, die Verbindung in zwei weiteren tautomeren Formen darzustellen (Rodin und Mitarbeiter 1965). Bisher ist es jedoch nicht gelungen, die in Abb. 2 gezeigte Diketo- oder Dienol-Struktur zu isolieren oder darzustellen.

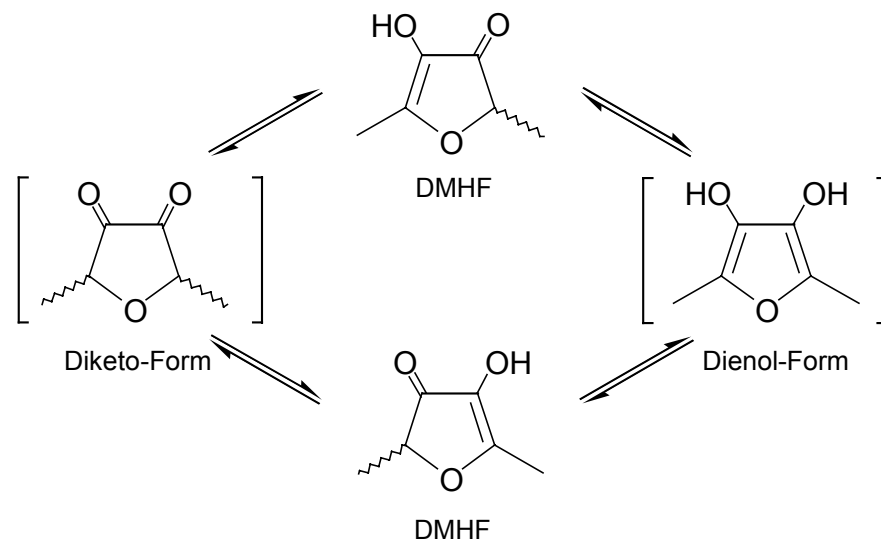


Abb. 2 Mögliche tautomere Strukturen von DMHF.

DMHF ist in Gegenwart von Luftsauerstoff äußerst instabil. Bei Raumtemperatur oder höheren Temperaturen lassen sich oxidative Zersetzungsreaktionen innerhalb kürzester Zeit beobachten, wohingegen die Lagerfähigkeit von DMHF in einer Stickstoffatmosphäre bei Temperaturen unter 0°C auf mehrere Monate verlängert werden kann (Willhalm und Mitarbeiter 1965, Hofmann und Eugster 1966, Henry und Silverstein 1966). Wenngleich in wässrigen Lösungen die Zersetzungs Vorgänge mit verminderter Geschwindigkeit ablaufen, lässt sich bei einem neutralen pH-Wert eine Halbwertszeit von nur 12 Tagen feststellen. Lediglich in saurer Lösung kann die Halbwertszeit auf 50 (pH < 4) bis 100 Tage (pH 4) verlängert werden (Hirvi und Mitarbeiter 1980). In chlorophyllhaltiger, ethanolischer Lösung wurde zudem ein beachtlicher photochemischer Abbau festgestellt (Chen und Mitarbeiter 1996). DMMF unterliegt ebenfalls einem Zersetzungsprozess, der Abbau verläuft aber im Vergleich zu DMHF wesentlich langsamer (Hirvi und Mitarbeiter 1980). Die geringe Stabilität von DMHF hatte zur Folge, dass in frühen gaschromatographischen Untersuchungen DMHF zumeist stark unterrepräsentiert war. Durch hohe Temperaturen in Kombination mit den aktiven Oberflächen der Trennsäulen wurde das leicht oxidierbare DMHF zerstört, bevor es detektiert werden konnte. Erst durch Einsatz von weitgehend inerten „fused silica“ Kapillarsäulen konnte DMHF identifiziert werden, wenn auch in niedrigen Konzentrationsbereichen immer noch eine verhältnismäßig starke Unterdrückung zu erkennen war (Flath und Forrey 1970, Blank und Mitarbeiter 1992, Schwab und Roscher 1997).

Die polare Verbindung DMHF ist in Wasser sehr gut löslich, wobei sich aufgrund eines phenolähnlichen Verhaltens eine saure Reaktion feststellen lässt. Mit einem pK_a -Wert von 8,2 kann DMHF als schwache Säure eingestuft werden. Da eine 2 %ige DMHF-Lösung einen pH-Wert von 2,8 aufweist, ist sie mit einer 2 %igen Essigsäurelösung vergleichbar (Buttery und Mitarbeiter 1995).

DMHF besitzt als Reinsubstanz bzw. in hohen Konzentrationen einen karamellartigen, malzigen, süßen Geschmack, der an verbrannten Zucker erinnert. Mit zunehmender Verdünnung tritt zusätzlich ein fruchtiger Sinneseindruck auf, der dem Aroma von Erdbeeren oder Ananas ähnelt (Re und Mitarbeiter 1973). Die Geschmackseigenschaften der beiden Enantiomere, die sich

gaschromatographisch an derivatisierten β -Cyclodextrinphasen trennen lassen, unterscheiden sich hierbei nur geringfügig. Das (-)-Enantiomer besitzt den starken süßen, karamellartigen Geschmack, wohingegen das (+)-Enantiomer einen insgesamt schwächeren Eindruck hinterlässt, der weniger süß, dafür mehr butterartig und röstig ausgeprägt ist (Bruche und Mitarbeiter 1995, Fischer und Hammerschmidt 1992). Das flüchtige DMHF besitzt einen niedrigen Geruchsschwellenwert, der abhängig von den angewandten Untersuchungsmethoden zwischen 0,03 ppb und 1700 ppb in wässrigen Systemen variiert. Durchschnittlich kann aber ein Wert von 10 - 100 ppb als realistisch betrachtet werden (Schwab und Roscher 1997, Roscher 1998).

Die Geruchseigenschaften von DMMF werden als süß, sherry-ähnlich, erdig oder muffig beschrieben. Bei dieser Verbindung ist hauptsächlich ein Enantiomer für den resultierenden Geschmack verantwortlich, da das zweite Enantiomer einen um den Faktor 1000 niedrigeren Geruchsschwellenwert aufweist (Fischer und Hammerschmidt 1992, Larsen und Poll 1992, Bruche und Mitarbeiter 1995). Insgesamt ist das Methoxyfuranon weniger aromaaktiv als DMHF, da dessen Geruchsschwellenwert im Bereich 100 - 1000 ppb anzusiedeln ist und damit um Faktor zehn höher als DMHF liegt (Schwab und Roscher 1997).

2.3 Biosynthese

2.3.1 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanon

Obwohl DMHF und DMMF bereits vor über 30 Jahren als wichtige Aromakomponenten in verschiedenen Früchten, vor allem aber in Erdbeeren erkannt wurden, ist dennoch relativ wenig über deren Biosynthese in Pflanzen bekannt. Pisarnitskii und Mitarbeiter (1992) waren die ersten, die einen möglichen Bildungsweg der beiden Furanone in Früchten vorschlugen. Sie sahen einen direkten Zusammenhang zwischen dem Gehalt an Methylpentosen und den Gehalten an DMHF und DMMF in reifenden Erdbeeren. Ferner ließ sich die Menge an DMHF in einem Erdbeerhomogenat durch Erhitzen drastisch erhöhen. Folglich vermuteten sie, dass die Bildung über eine Maillard-analoge Dehydratisierung der Desoxyhexosen erfolgen muss. Fucose und vor allem Rhamnose wurden als effektive Vorläufersubstanzen ermittelt. Angesicht der üblichen Temperaturen, denen Erdbeeren während der Reifung ausgesetzt sind, erscheint es aber als äußerst unwahrscheinlich, dass eine durch Hitze einwirkung bedingte chemische Reaktion für die Entstehung der 4-Hydroxy-3(2H)-furanone verantwortlich sein soll.

Ausgehend von einem enzymatischen Biosyntheseweg werden ebenfalls 6-Desoxyhexosen als potentielle Vorläufer von DMHF und seiner Derivate diskutiert. In Studien mit Erdbeerkallus-Kulturen konnte die Bildung von DMHF-Glucosid nur nach Zugabe von D- bzw. L-Fucose, L-Rhamnose oder 6-Desoxy-D-fructose beobachtet werden, wohingegen in Kontrollansätzen ohne Zusatz der Desoxyzucker das Glucosid nicht detektierbar war (Zabetakis und Holden 1995/1996, Zabetakis und Mitarbeiter 1996). Da die Ausbeute nach Applikation von 6-Desoxy-D-fructose am größten war (1,03 ppm), vermuteten die Autoren, dass die anderen Hexosen einer vorherigen

Isomerisierung zu 6-Desoxy-D-fructose unterzogen werden müssen. Des Weiteren wurde die Möglichkeit in Erwägung gezogen, dass DMHF nicht direkt, sondern über ein glucosidisches Intermediat gebildet wird. Der vorgeschlagene Biosyntheseweg geht von einer Aldolase-katalysierten Kondensation von Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und Lactaldehyd aus. Das entstehende 6-Desoxy-D-fructose-1-phosphat wird nach Abspaltung der Phosphatgruppe mit Glucose zu einem Desoxyanalogon der Saccharose verknüpft und anschließend durch einen nicht näher erläuterten Reaktionsschritt zu DMHF-Glucosid metabolisiert. Im Gegensatz zur Saccharose (β -D-Fructofuranosyl-(2 \rightarrow 1)- α -D-glucopyranosid) müsste die Desoxyfructose aber über Position C-3 an eine β -konfigurierte Glucose glycosidisch gebunden werden, da das DMHF-Derivat in Erdbeeren als β -D-Glucopyranosid vorliegt (Mayerl und Mitarbeiter 1989, Sen und Mitarbeiter 1991). DMHF wäre erst nach Abspaltung des Glucoserestes frei verfügbar. Somit müsste eingangs der Erdbeerreife das DMHF-Glucosid gebildet werden, aus dem nachfolgend DMHF mittels Glucosidasen freigesetzt wird. Dem widersprechen Beobachtungen von Pérez und Mitarbeitern (1996) denen zufolge DMHF bereits in unreifen Erdbeeren (Reifestadium „weiß“ und „pink“) in geringer Konzentration vorhanden ist (Abb. 3). Erst in späteren Reifestadien, wenn längst höhere DMHF-Konzentrationen in der Erdbeere vorliegen, ist es möglich, auch das DMHF-Glucosid nachzuweisen.

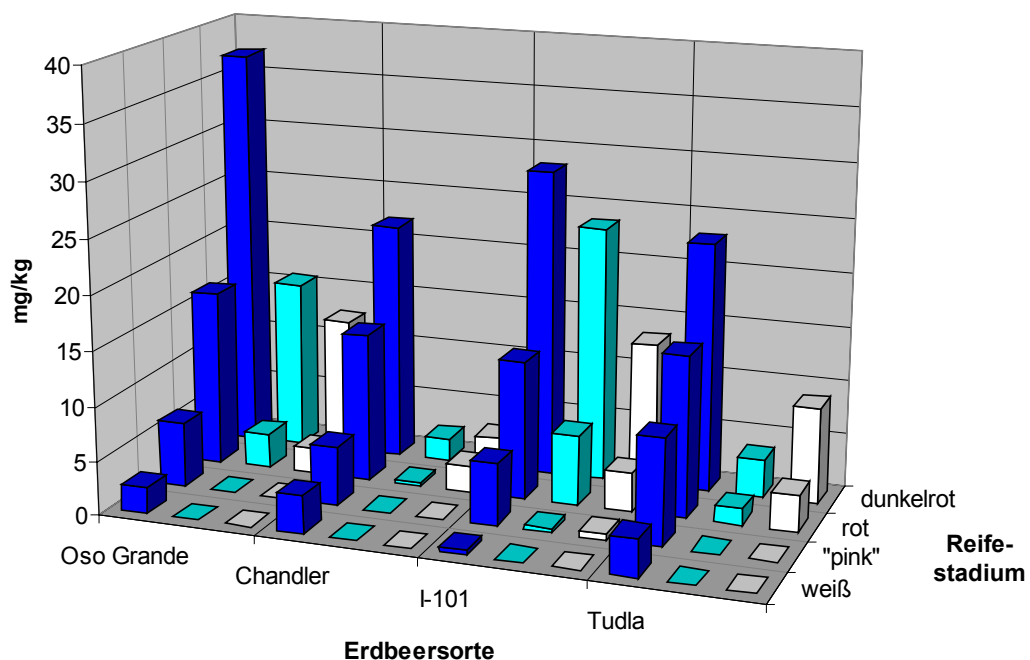


Abb. 3 Gehalte von DMHF (■), DMMF (■) und DMHF-Glucosid (□) von vier verschiedenen Erdbeersorten während der Reifung. Die Gehalte sind in mg/kg Frischgewicht angegeben. Die vier Reifestadien sind von vorne nach hinten dargestellt, wobei die rot-werdende Frucht als „pink“ bezeichnet wird (nach Pérez und Mitarbeitern 1996).

Da 6-Desoxyfructose als Produkt einer Aldolkondensation von Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und Lactaldehyd und anschließender Dephosphorylierung angesehen werden kann, wurden weitere Fütterungsstudien mit Erdbeerkallus-Kulturen durchgeführt. Dabei wurde Lactaldehyd und dessen potentieller Vorläufer 1,2-Propandiol, das in Erdbeeren nachgewiesen

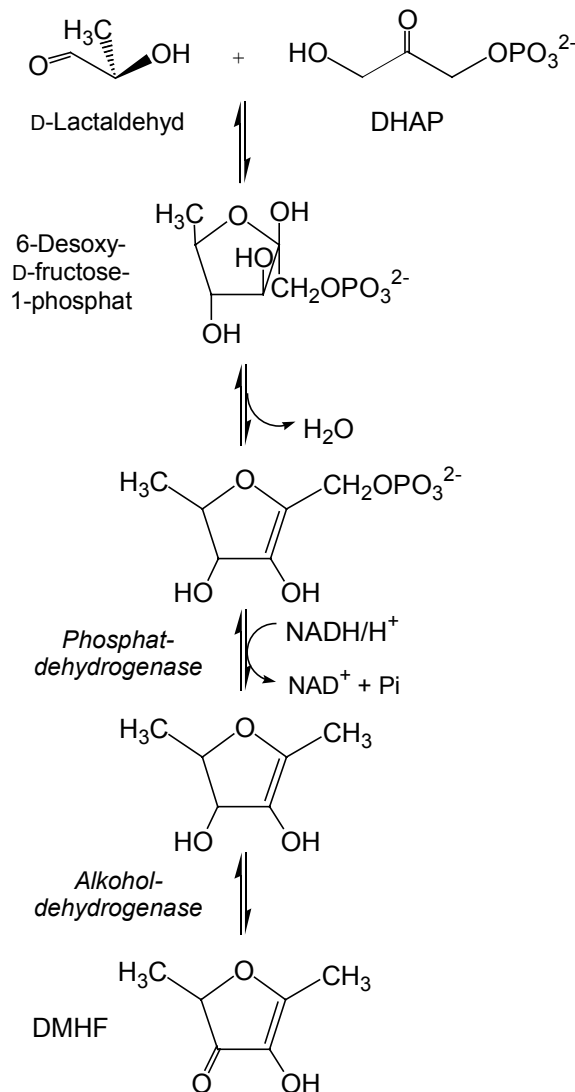


Abb. 4 Vorgeschlagener Biosyntheseweg von DMHF nach Zabetakis und Mitarbeitern 1999.

werden konnte, als Substrat eingesetzt (Zabetakis und Gramshaw 1998). Nach Applikation von 1,2-Propandiol wurden erneut geringe Mengen an DMHF-Glucosid (0,94 ppm) detektiert (Zabetakis und Gramshaw 1998), wohingegen der Zusatz von Lactaldehyd die Bildung von DMHF (26,6 ppm) und DMHF-Glucosid (0,3 ppm) zur Folge hatte (Zabetakis und Mitarbeiter 1999). In Kallus-Kulturen, die mit dem Bakterium *Methylobacterium extorquens* kontaminiert waren, konnte dagegen ohne Zusatz weiterer Kohlenstoffquellen sowohl DMHF (5,86 ppm) als auch DMMF (11,35 ppm) nachgewiesen werden. Da das Bakterium in der Lage ist, 1,2-Propandiol zu Lactaldehyd zu oxidieren, könnte dieses das aus der Erdbeere stammende 1,2-Propandiol metabolisieren und somit den Prekursor für DMHF zur Verfügung stellen (Zabetakis 1997). Aufgrund dieser Erkenntnisse befürworten die Autoren den in Abb. 4 dargestellten Biosyntheseweg von DMHF mit Lactaldehyd als Schlüsselkomponente. Ferner vermuten sie, dass Erdbeerkalli nicht in der Lage sind, die Oxidation von 1,2-Propandiol zu Lactaldehyd durchzuführen, dies aber den limitierenden Faktor in der Genese von DMHF darstellt. Die Bildung von DMHF-Glucosid hingegen müsste, wie oben erläutert, in einem von DMHF unabhängigen Biosyntheseweg über das Saccharose-Analogon erfolgen (Zabetakis 1997, Zabetakis und Mitarbeiter 1999).

In einer anderen Studie wurde die Bildung von DMHF durch den Hefestamm *Zygosaccharomyces rouxii* untersucht. Hecquet und Mitarbeiter (1996) konnten demonstrieren, dass nach Zugabe verschiedener Desoxyzucker bzw. Zuckerphosphate zum Kulturmedium (Endkonzentration von 5 %) die Ausbeute an DMHF gesteigert werden konnte. Der Zusatz von D-Fructose-6-phosphat bzw. 6-Desoxy-L-mannose bewirkte eine Erhöhung der DMHF-Konzentration auf 3,8 bzw. 5,0 ppm im Vergleich zu 1,8 ppm in Kontrollversuchen. Eine weitere

Steigerung auf 18,0 ppm bzw. 52,4 ppm konnte durch Zugabe von 6-Desoxyhexulose bzw. D-Fructose-1,6-bisphosphat erzielt werden. Somit ließ sich D-Fructose-1,6-bisphosphat als der effektivste Prekursor bei der DMHF-Produktion in *Z. rouxii* ausmachen.

Die teilweise widersprüchlichen Theorien bezüglich der DMHF-Bildung in Erdbeeren inspirierten zu einer weiteren Untersuchung des Biosyntheseweges, bei der mittels Verstoffwechselung radioaktiver Substrate die tatsächliche Kohlenstoffquelle für DMHF in Erdbeeren ermittelt werden sollte (Roscher und Mitarbeiter 1998). Zum Einsatz kamen dabei sowohl Verbindungen aus dem Kohlenhydratstoffwechsel (Pyruvat, Dihydroxyaceton, phosphorylierte und freie D-Glucose bzw. D-Fructose) als auch Desoxyhexosen und D-Lactaldehyd. Diese wurden in Wasser gelöst und durch Aufsaugen über den Stiel der intakten Erdbeere zugeführt. Anhand der gemessenen Aktivität in den Zielmolekülen (DMHF, DMMF und DMHF-Glucosid) ließ sich das Ausmaß des Einbaus der Prekursoren in die Furanonmetabolite ermitteln. Es konnte keine Metabolisierung von L-Rhamnose und L-Fucose in die Zielsubstanzen festgestellt werden. Das gleiche Ergebnis wurde für D-Lactaldehyd und dessen potentiellen Vorläufer L-Threonin ermittelt, wohingegen die Applikation von Dihydroxyaceton, zu geringfügigen Einbauraten führte. Sichtlich steigende Einbauraten hatte der Zusatz von D-Glucose, D-Glucose-6-phosphat, D-Fructose und D-Fructose-1,6-bisphosphat zur Folge. Auch bei dieser Studie konnte D-Fructose-1,6-bisphosphat als effektivstes Substrat ermittelt werden, das am besten in die DMHF-Struktur eingebaut wird. Generell war bei dieser Studie eine Wiederfindung der radioaktiven Markierung sowohl in DMHF als auch in dessen Derivaten (DMMF und DMHF-Glucosid) möglich. Durch den Einsatz von uniform ^{13}C -markierter D-Fructose gelang schließlich die Beweisführung, dass dabei die vollständige Kohlenstoffkette der D-Fructose in die Furanonstruktur eingebaut wird (Schwab 1998). Massenspektrometrische Analysen zeigten, dass nach Applikation von D-[U- $^{13}\text{C}_6$]Fructose neben unmarkiertem, natürlich vorkommendem DMHF, auch ein um sechs Einheiten schwereres DMHF-Isotopomer auftrat. Dies galt ebenso für die DMHF-Derivate DMMF und DMHF-Glucosid. Ein um nur drei Einheiten schwereres Fragment wurde nicht detektiert, welches eine vorherige enzymatische Spaltung der D-Fructose in zwei C_3 -Einheiten gezeigt hätte. Der von Zabetakis und Holden (1996) in Kalluskulturen vorgeschlagene Biosyntheseweg von DMHF über eine Aldolase-katalysierte Reaktion von DHAP und D-Lactaldehyd scheint daher in intakten Erdbeeren nicht einzutreten. Ebenso kann die von Pisarnitskii und Mitarbeiter (1992) favorisierte Bildung von DMHF über eine Maillardreaktion der Rhamnose bzw. Fucose ausgeschlossen werden.

2.3.2 2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanon

So vielschichtig die Biosynthese von DMHF betrachtet werden kann, so umstritten wird auch die Biogenese seines Methylethers DMMF diskutiert. Generell sind hierbei zwei Möglichkeiten denkbar. Einerseits lässt sich aufgrund der Strukturanalogie ein direkter Zusammenhang zu DMHF vermuten, so dass DMMF aus DMHF biosynthetisiert werden kann. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass beide Verbindungen unabhängig voneinander in der Pflanze gebildet werden. Letztere Variante bevorzugten Bruce und Mitarbeiter (1995), die die ^{13}C -Isotopengehalte von DMHF und DMMF aus Erdbeeren mit Hilfe der Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (IRMS) analysiert und verglichen haben. Dabei konnten sie feststellen, dass DMMF einen um 9 ‰ niedrigeren $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ -Wert aufweist als DMHF. Sollte nun DMMF direkt vom DMHF abstammen, so müsste das Kohlenstoffgrundgerüst „isotopisch“ identisch sein und die Abreicherung an ^{13}C einzig auf die Einführung der Methylgruppe zurückzuführen sein. Um diese Differenz zu verursachen, müsste die Methylgruppe von DMMF einen $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ -Wert von -90 bis -100 ‰ aufzeigen. Die Existenz von stark abgereicherten Methylgruppen aus *S*-Adenosyl-L-methionin (SAM) wurde zwar berichtet, jedoch sind bisher lediglich Werte bis -43 ‰ bekannt (Weilacher und Mitarbeiter 1996). Isotopenmessungen von aus Erdbeeren gewonnenem DMMF ergaben, dass der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert der OCH_3 -Gruppe mit dem des Gesamtmoleküls im Rahmen der Messgenauigkeit übereinstimmte (Werner 1998). Somit kann eine Isotopendiskriminierung im Zusammenhang mit der Methylierung ausgeschlossen werden. Dementsprechend ist die Abreicherung auf eine andere Position in der Kohlenstoffkette zurückzuführen und deutet auf zwei unabhängige Biosynthesewege von DMHF und DMMF hin (Bruce und Mitarbeiter 1995, Werner 1998). Sollte der Anteil an ^{13}C bei allen Kohlenstoffatomen von DMMF im Vergleich zu DMHF geringer sein, erwägt Werner (1998) auch einen identischen Biosyntheseweg, setzt dann aber eine Bildung in verschiedenen Kompartimenten voraus.

Dem stehen Untersuchungen zur Bildung von DMHF, DMMF und DMHF-Glucosid in Abhängigkeit von den verschiedenen Reifestadien gegenüber. Übereinstimmend konnte bei allen drei Verbindungen beobachtet werden, dass deren Gehalte im Laufe der Reifung stark zunehmen. DMHF steigt nahezu kontinuierlich vom Reifestadium „pink“ bis „dunkelrot“ an, wohingegen DMMF und DMHF-Glucosid zeitversetzt einen sprunghaften Anstieg beim Übergang von „rot“ nach „dunkelrot“ zeigen (vgl. Abb. 3). Die höchsten Gehalte der drei Verbindungen wurden in überreifen Früchten ermittelt (Sanz und Mitarbeiter 1995, Pérez und Mitarbeiter 1996). Dieses Bildungsmuster lässt daher den Schluss zu, dass die genannten Furanone dem selben Biosyntheseweg entspringen und DMHF mittels enzymatischer Methylierung bzw. Glucosylierung in DMMF und DMHF-Glucosid überführt wird. Dies könnte auch die deutliche Abnahme von DMHF bei gleichzeitigem Anstieg von DMMF in Erdbeeren nach achttägiger Lagerung bei 3°C erklären (Pickenhagen und Mitarbeiter 1981). Roscher und Mitarbeiter (1997) untermauerten diese Hypothese, indem sie nach Applikation von *S*-Adenosyl-L-[methyl- ^{14}C]methionin (^{14}C -SAM) radioaktiv markiertes DMMF in Erdbeeren identifizieren konnten. Folglich musste die markierte Methylgruppe des SAMs auf DMHF übertragen worden

3 Methyltransferasen

3.1 Allgemeines

Methyltransferasen sind Enzyme, die in der Lage sind, die von einem Cofaktor stammende CH_3 -Gruppe auf geeignete Akzeptormoleküle zu übertragen. Die Verknüpfung kann dabei an nucleophilen Atomen wie Sauerstoff, Stickstoff oder Schwefel erfolgen, aber auch C-Methylierungen sind bekannt. Die meisten Methyltransferasen benutzen SAM als universellen Methylgruppendonor, dessen Schwefel-gebundene CH_3 -Gruppe unter Bildung von *S*-Adenosyl-L-homocystein (SAH) abgespalten und übertragen wird (Abb. 6). SAM wird in einer thermodynamisch aufwendigen Reaktion aus L-Methionin und ATP gebildet. L-Methionin seinerseits geht aus einem Methioninsynthase-katalysierten Methyltransfer von *N*⁵-Methyltetrahydrofolat auf L-Homocystein hervor. Somit kann SAH, nachdem das Nucleosid abgespalten wurde, zu L-Methionin und SAM regeneriert werden (Ravanel und Mitarbeiter 1998). SAM-abhängige Methyltransferasen sind imstande, eine große Bandbreite verschiedener Moleküle zu methylieren. Anfänglich wurde angenommen, dass die CH_3 -Übertragung auf kleine Moleküle, wie etwa Phenylpropanoide, Alkaloide oder Flavonoide beschränkt wäre, später zeigte sich jedoch, dass auch Makromoleküle wie DNA, RNA, Proteine, Lipide und Polysaccharide als Substrate dienen können (Fauman und Mitarbeiter 1999).

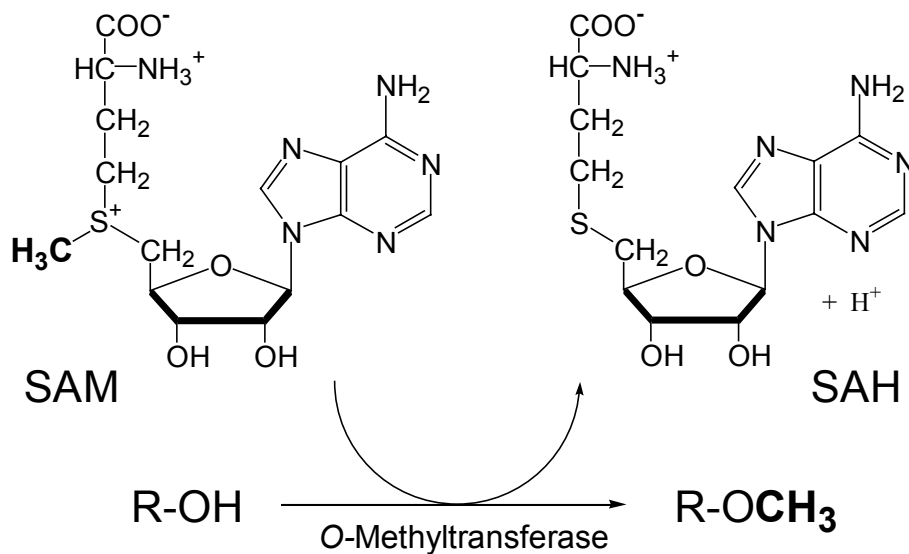


Abb. 6 Reaktionsschema für *O*-Methyltransferasen. SAM: *S*-Adenosyl-L-methionin, SAH: *S*-Adenosyl-L-homocystein, R: beliebiger organischer Rest.

3.2 Pflanzliche *O*-Methyltransferasen

Den im Pflanzenreich weit verbreiteten *O*-Methyltransferasen (OMTs) wird gerade im Sekundärmetabolismus eine bedeutende Rolle zugesprochen. Sie sind essentiell bei der Aufrechterhaltung vieler biologischer Aktivitäten. Die enzymatische Methylierung inaktiviert reaktive Hydroxy- und/oder Carboxygruppen zahlreicher pflanzlicher Produkte und verändert somit deren Löslichkeit und gegebenenfalls deren intrazelluläre Kompartimentierung (Ibrahim und Muzac 2000). Nach Ibrahim und Mitarbeiter (1998) lassen sich *O*-Methyltransferasen gemäß ihrer Substratspezifität in vier Klassen einteilen. So werden der Klasse A OMTs zugeordnet, die die große Gruppe der von Phenylpropan abgeleiteten Verbindungen methylieren. Aber auch einfache phenolische Substanzen gehören dieser Substanzgruppe an. Ebenfalls phenylpropanoiden Ursprungs allerdings komplexerer Gestalt sind die Flavonoide, die von OMTs der Klasse B umgesetzt werden. OMTs der Klasse C bzw. D wiederum metabolisieren Alkaloide bzw. sonstige nicht weiter charakterisierte aliphatische Verbindungen.

Innerhalb der pflanzlichen OMTs nehmen die der Klasse A eine führende Stellung ein, da sie an der Ligninbiosynthese beteiligt und daher Gegenstand intensiver Untersuchungen sind. Lignin ist ein hochpolymeres, quervernetztes phenolisches Material, das aus Cumaryl-, Guajacyl- und Sinapyluntereinheiten besteht. Die Aufgabe der OMTs besteht in der Metamethylierung von Polyhydroxy-(*E*)-Zimtsäurederivaten. Im ursprünglichen Ligninbiosynthese-Schema ist angenommen worden, dass Kaffeesäure zu Ferulasäure, dem Grundgerüst der Coniferyleinheit, und 5-Hydroxyferulasäure zu Sinapinsäure umgesetzt wird. Die in die Ligninbiosynthese involvierten Methyltransferasen wurden der Einfachheit halber als Kaffeesäure-OMTs (COMT, Caffeic acid O-Methyltransferase) bezeichnet, obwohl in vielen Fällen 5-Hydroxyferulasäure als Substrat bevorzugt wird (Dixon und Mitarbeiter 2001). Nach der Methylierung erfolgt eine Veresterung der Säuren mit dem Coenzym A und anschließend eine in zwei Schritten ablaufende Reduktion über die Aldehydstufe zum Alkohol. Diese sogenannten freien Monolignole werden anschließend in einem Peroxidase-katalysierten Vorgang zu einem kompliziert aufgebauten Mischpolymerisat verknüpft. Alternativ kann die Methylierung der Säuren auf Ebene der CoA-Ester stattfinden, was in erster Linie durch die sogenannten Kaffeesäure-CoA-OMTs (CCOMT, Caffeoyl-CoA O-Methyltransferase) katalysiert wird (Ye und Mitarbeiter 1994, Li und Mitarbeiter 1999). In neueren Studien wurden auch Kaffeeoyl- und 5-Hydroxyconiferylaldehyd bzw. -alkohol als Substrate für COMT identifiziert. Im Vergleich zu den Säuren zeigen vor allem die Aldehyde eine höhere Affinität gegenüber den Methyltransferasen auf. Da deren Umsetzungsgeschwindigkeiten ebenfalls deutlich über den der Säuren liegen, muss das bisherige geradlinige Biosyntheschema überdacht und neue, alternative Verzweigungsmöglichkeiten in Betracht gezogen werden (Abb. 7) (Osakabe und Mitarbeiter 1999, Li und Mitarbeiter 2000, Parvathi und Mitarbeiter 2001).

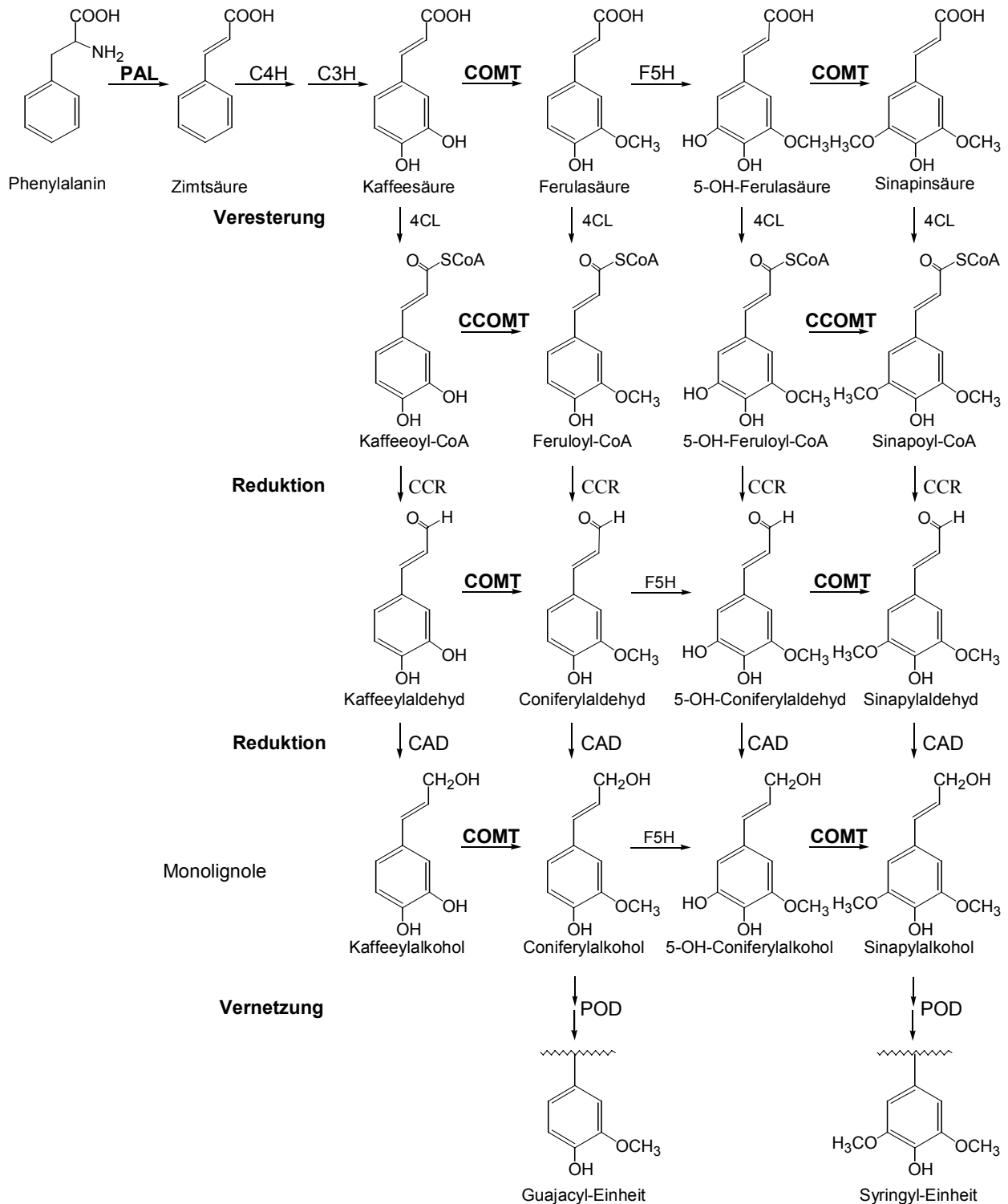


Abb. 7 Schema der Ligninbiosynthese. PAL: Phenylalaninammoniaklyase, C4H: Zimtsäure-4-hydroxylase, C3H: 4-Cumarat-3-hydroxylase, COMT: Kaffeesäure-*O*-Methyltransferase, CCOMT: Kaffeesäure-CoA-*O*-Methyltransferase, F5H: Ferulat-5-hydroxylase, 4CL: 4-Cumarat-CoA-Ligase, CCR: Zimtsäure-CoA-Reduktase, CAD: Zimtalkoholdehydrogenase. POD: Peroxidase (nach Dixon und Mitarbeiter 2001).

3.3 Strukturelle und funktionelle Eigenschaften von *O*-Methyltransferasen

Seitdem 1991 die ersten cDNAs von pflanzlichen OMTs kloniert wurden (Schmitt und Mitarbeiter 1991, Bugos und Mitarbeiter 1991) nimmt die Zahl der veröffentlichten Methyltransferase-Sequenzen kontinuierlich zu. Somit ist es möglich, aufgrund von Sequenzvergleichen Aufschluss über konservierte Regionen und deren Bedeutung zu erlangen. Die beträchtliche Diversität der akzeptierten Substrate erklärt die geringe Ähnlichkeit zwischen den verschiedenen *O*-, *N*-, *S*- und *C*-Methyltransferasen (Fauman und Mitarbeiter 1999). Einzig das gemeinsame Cosubstrat SAM lässt auf strukturelle Übereinstimmungen schließen. So konnten Joshi und Chiang (1998) aus 56 verschiedenen pflanzlichen SAM-abhängigen Methyltransferasen drei konservierte Regionen ermitteln, die vermutlich als SAM-bindende Domänen anzusehen sind. Da neben einer Vielzahl an OMTs auch *N*- und *C*-Methyltransferasen verglichen wurden, also auch ein großes Substratspektrum abgedeckt wurde, halten die Autoren eine Beteiligung der Konsensusmotive an der Substratspezifität für unwahrscheinlich. Diese als Motiv A, B und C bezeichneten Sequenzabschnitte befinden sich in der C-terminalen Hälfte der Proteine und umfassen insgesamt 30 Aminosäuren. Motiv A [(V/I/L)(V/L)(D/K)(V/I)GGXX (G/A)] wurde in allen untersuchten Methyltransferasen mit maximal zwei Nichtübereinstimmungen gefunden. Motiv B [(V/I/F)(A/P/E)X(A/P/G)DAXXXK(W/Y/F)] und Motiv C [(A/P/G/S)(L/I/V)(A/P/G/S)XX(A/P/G/S)(K/R)(V/I)(E/I)(L/I/V)] wurden zu je 98 % gefunden, wobei maximal drei Nichtübereinstimmungen festgestellt wurden.

Bei näherer Betrachtung der *O*-Methyltransferasen lassen sich zwei Kategorien identifizieren. Die als PI-OMT I (Plant-OMT) bezeichneten Methyltransferasen weisen eine Länge von 231 - 248 Aminosäuren, entsprechend einem Molekulargewicht von 23 - 27 kDa auf. Sie benötigen zweiwertige Kationen wie etwa Mg^{2+} , um Aktivität zu zeigen, und akzeptieren nahezu ausschließlich die CoA-Ester der Kaffee- und 5-Hydroxyferulasäure (Martz und Mitarbeiter 1998, Li und Mitarbeiter 1999). Die Abstände zwischen den Motiven A und B bzw. B und C sind identisch und betragen 19 bzw. 24 Aminosäuren. Interessanterweise zeigen PI-OMT I Proteine, die den CCOMT gleichstehen, strukturell mehr Ähnlichkeiten zu Catechol-OMTs aus Säugetieren als zu pflanzlichen Kaffeesäure-OMTs (Joshi und Chiang 1998). Sie sind, wie bereits erwähnt, in die Ligninbiosynthese involviert, tragen aber auch bei pathogener Infektion oder Verwundung zur Zellwandverstärkung und Abwehrreaktion bei (Schmitt und Mitarbeiter 1991, Busam und Mitarbeiter 1997).

Die weit größere Anzahl an OMTs ist der zweiten Kategorie, den PI-OMT II Proteinen, zuzuordnen. Diese Enzyme sind mit 344 - 383 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 38 - 43 kDa größer als die der ersten Kategorie und benötigen keine Kationen für katalytische Funktionalität. Auch sie weisen übereinstimmende Abstände zwischen den einzelnen Motiven auf. Im Vergleich zu PI-OMT I fallen die Zwischenräume mit 52 (A/B) und 30 - 33 (B/C) Aminosäuren aber deutlich größer aus. Bei den hier untersuchten Sequenzen zeigen sich noch vier weitere homologe Regionen (Motiv I, J, K und L), die in 75 % aller PI-OMT II Proteine auftreten. Drei dieser Sequenzabschnitte (J, K und L) entsprechen den von Ibrahim und Mitarbeitern (1998) vorgeschlagenen OMT-spezifischen Regionen II, III und V (vgl. Abb. 8).

Die insgesamt fünf Konsensusbereiche (I - V) werden als OMT-Signaturen bezeichnet, wobei Region IV eingeschränkt betrachtet werden muss, weil es sich um ein Metall-bindendes Motiv handeln soll. Für Region I, die mit Motiv A übereinstimmt, lässt sich eine Beteiligung an der SAM-Bindung ableiten, da sie dem Motiv einer Catechol-OMT aus Ratten entspricht, das mittels Röntgenstrukturanalyse als SAM-Bindungsstelle identifiziert wurde (Vidgren und Mitarbeiter 1994). Die Funktion der restlichen Regionen (II, III und V) bzw. Motive (J, K und L) bleibt jedoch unbekannt. Ein Zusammenhang zur Substratbindung erscheint aufgrund des breiten Substratspektrums unwahrscheinlich.

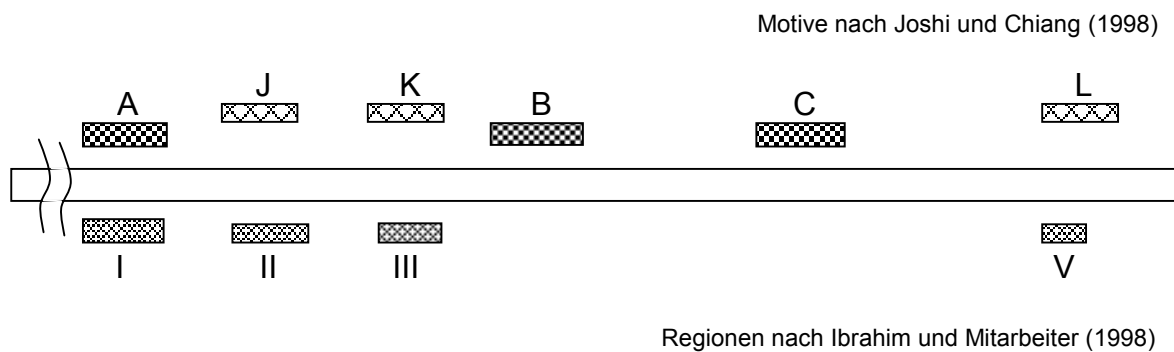


Abb. 8 Konsensus Regionen von *O*-Methyltransferasen (PI-OMT II) in der C-terminalen Hälfte des Polypeptids nach Joshi und Chiang (1998) und Ibrahim und Mitarbeiter (1998).

Erste Anhaltspunkte für Substrat-relevante Bereiche konnten Mutageneseversuche mit OMTs aus *Clarkia breweri* erbringen. Durch Austausch weniger Aminosäuren im N-terminalen Bereich der Proteine war es gelungen die Substratspezifität einer (Iso)Eugenol-OMT (IEMT) und einer Kaffeesäure-OMT (COMT) drastisch zu ändern. Dabei wurden punktuell Aminosäuren der IEMT durch die der COMT ersetzt und umgekehrt. Besonders große Unterschiede ergaben sich bei Veränderungen an Position 133-135 bzw. 164-165 für IEMT und 130-131 bzw. 133-135 für COMT. Hierdurch verloren beide Enzyme ihre ursprüngliche Substratspezifität beinahe vollständig (Wang und Pichersky 1999). Ein vergleichbares Phänomen konnte bei zwei aus Wiesenrauten (*Thalictrum tuberosum*) isolierten OMTs (Thatu 1 und 4) beobachtet werden. Beide Proteine unterschieden sich an Position 21 in nur einer Aminosäure (Thatu 1: Tyrosin, Thatu 4: Cystein) und zeigten doch ein erstaunlich ungleiches Methylierungsverhalten. Thatu 1 war imstande, sowohl diphenolähnliche Strukturen (Kaffeesäure, Brenzcatechin) als auch eine hohe Anzahl an verschiedenen Tetrahydrobenzylisochinolinolinen effektiv umzusetzen. Thatu 4 hingegen wies lediglich ein Viertel der Kaffeesäure-Methylierungsaktivität von Thatu 1 auf und war kaum bzw. nicht in der Lage, andere Substrate zu methylieren (Frick und Kutchan 1999).

PI-OMT II Proteine methylieren eine Vielzahl verschiedener Substrate, wie Brenzcatechin (COMT I, Maury und Mitarbeiter 1999), myo-Inositol (Vernon und Bohnert 1992), Salicylsäure (Ross und Mitarbeiter 1999), Chalkone (Maxwell und Mitarbeiter 1992), Flavonole (Gauthier und Mitarbeiter 1996), Flavonoide (Christensen und Mitarbeiter 1998) und Scoulerin (Takeshita und Mitarbeiter 1995). Besonders bemerkenswert aber gestaltet sich das Substratspektrum der

sogenannten Kaffeesäure-OMTs. Aus Luzernen (*Medicago sativa* L.) konnten sowohl COMTs isoliert werden, die ausschließlich Kaffee- und 5-Hydroxyferulasäure methylieren (COMT I, Inoue und Mitarbeiter 2000), als auch solche, die in der Lage sind, die freien Säuren und in geringerem Ausmaß auch deren CoA-Analoga umzusetzen (COMT1, Inoue und Mitarbeiter 1998). Aus Weihrauchkiefer (*Pinus taeda*) und Tabak (*Nicotiana tabacum*) wiederum sind COMTs bekannt, die Kaffeesäure bzw. 5-Hydroxyferulasäure und deren CoA-Ester gleichermaßen als Substrat akzeptieren (AEOMT, Li und Mitarbeiter 1997; COMT II, Maury und Mitarbeiter 1999). Unter der Bezeichnung Kaffeesäure-OMT sind weiterhin Enzyme zu finden, die neben den Zimtsäurederivaten (Kaffeesäure und 5-Hydroxyferulasäure) auch andere Substanzklassen methylieren. So sind einerseits die bereits erwähnten Thatu OMTs aus Wiesenrauten zu nennen, die zusätzlich auch Tetrahydrobenzylisochinolin-Alkaloide umsetzen (Frick und Kutchan 1999), andererseits die Vertreter aus Milzkraut (*Chrysosplenium americanum*), die ferner Flavone (Luteolin) und Flavonole (Quercetin und Myricetin) akzeptieren (Gauthier und Mitarbeiter 1998). Interessant gestaltet sich auch das Methylierungsverhalten einer aus *Arabidopsis* isolierten OMT, die ursprünglich aufgrund von Sequenzhomologien als Kaffeesäure-OMT identifiziert wurde. Dieser Vertreter bevorzugt eindeutig die Flavonole Quercetin und Myricetin, wohingegen Kaffeesäure und 5-Hydroxyferulasäure in einem nicht nennenswerten Ausmaß umgesetzt wurden (Muzac und Mitarbeiter 2000).

Die Funktionalität der PI-OMT II Enzyme ist angesichts der zahlreichen Substrate vielfältig. Wie bei der PI-OMT I Gruppe sind auch hier in erster Linie die Ligninbiosynthese und verschiedenartige Abwehrreaktionen zu nennen. Diese können sich in der induzierten Lignifizierung von Zellwänden als Abwehrreaktion gegen Pathogenbefall oder der Bildung von Phytoalexinen manifestieren (Pellegrini und Mitarbeiter 1993). In Zellsuspensionskulturen der Wiesenraute konnte durch Zugabe von Methyljasmonat die Aktivität von Isochinolin-Methyltransferasen induziert werden, die an der Biosynthese des fungizid wirkenden Alkaloids Berberin beteiligt sind (Frick und Kutchan 1999). Ebenfalls antimykotische Eigenschaften weist Pisatin auf, ein Pterocarpanderivat aus infiziertem Erbsengewebe (*Pisum sativum*), das durch Methylierung mittels einer Isoflavonoid-Methyltransferase biosynthetisiert wird (Wu und Mitarbeiter 1997). In Eiskraut (*Mesembryanthemum crystallinum*) hingegen wird durch osmotischen Stress *Int1* induziert, ein Gen, das eine myo-Inositol-Methyltransferase codiert, die den ersten Schritt der Biosynthese von Pinitol katalysiert (Vernon und Bohnert 1992). Für SAMT aus *Clarkia breweri* werden zwei verschiedene Einsatzmöglichkeiten vorgeschlagen. Die Umsetzung von Salicylsäure zur flüchtigen Methylsalicylsäure trägt zum Gesamtduft der Blüte bei und fördert somit die Bestäubung durch Motten. Außerdem wird die Bildung von Methylsalicylsäure als Teil des pflanzlichen Schutzmechanismus gegen Pathogene diskutiert, da neben Salicylsäure auch die Akkumulation des Methylesters im beschädigten Gewebe beobachtet werden kann (Ross und Mitarbeiter 1999, Seskar und Mitarbeiter 1998).

4 Aufgabenstellung und Zielsetzung

4.1 Chemisch-analytische und biochemische Untersuchungen

Ziel dieser Arbeit war es, neue Erkenntnisse zur Biosynthese von DMHF und seiner Derivate zu erlangen. Aufbauend auf die Ergebnisse von Roscher (1998) sollten weitere Fütterungsversuche mit Erdbeeren durchgeführt werden, die sich jedoch in der Art der verwendeten Markierung unterschieden. Waren die ersten Applikationen noch unter Verwendung radioaktiver Substanzen durchgeführt worden, so sollten bei den folgenden Untersuchungen die Markierung mittels stabiler Isotope (^2H und ^{13}C) vorgenommen werden. Dies hatte mehrere Vorteile. Einerseits konnten aufwendigere, mehrstufige Synthesen durchgeführt werden, die sonst aus geräte- und sicherheitstechnischer Sicht mit Radionukliden nur schwer realisierbar gewesen wären. Andererseits war es möglich, größere Mengen der potentiellen Vorläufer zu applizieren, um dementsprechend den Einbau in die Furanonstruktur besser verfolgen zu können. Zum Einsatz sollten vor allem verschiedene Desoxyzucker kommen, denen aufgrund der in Kap. B 2.3 geschilderten Arbeiten eine Beteiligung an der DMHF-Biosynthese nachgesagt wurde. Diese Studie sollte Aufschluss über die Wirksamkeit der Desoxyhexosen als Vorläufer für 4-Hydroxy-3(2*H*)-furanone geben. Da aber diese Art von Monosacchariden – wenn überhaupt – nur unmarkiert erhältlich ist, bestand der erste Abschnitt dieser Arbeit darin, geeignete Synthesen zu entwickeln, um isotopenmarkierte Desoxyzucker herzustellen. Des Weiteren galt es mit Hilfe von D-Fructose- und D-Glucosederivaten eine Optimierung der Applikationsmethode bezüglich der eingesetzten Menge, des Applikationszeitpunktes und des Reifestadiums der Erdbeere zu erreichen. Gleichzeitig sollte der Verbleib der positionsspezifischen Isotopenmarkierung während der Metabolisierung bestimmt werden.

4.2 Molekularbiologische Untersuchungen

Wie in Kap. B 2.3.2 ausführlich dargelegt, bestand berechtigter Grund zur Annahme, dass die Methylgruppe an Position C-4 von DMMF mit Hilfe einer *O*-Methyltransferase von SAM auf DMHF übertragen wird. Bisher sind aber aus Kulturerdbeeren der Art *Fragaria ananassa* auf molekularer Ebene keine OMTs isoliert oder gar charakterisiert worden. Lediglich aus Walderdbeeren (*Fragaria vesca*) konnte bislang eine unvollständige cDNA isoliert werden, die Sequenzanalogien zu Kaffeesäure-CoA-*O*-Methyltransferasen aufweist. Das Substratspektrum dieser OMT wurde jedoch nicht überprüft (Nam und Mitarbeiter 1999). Der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit lag daher bei der Identifikation einer aus Erdbeeren stammenden OMT, die die Fähigkeit besitzt, DMHF zu methylieren. Basierend auf den Sequenzhomologien pflanzlicher OMTs im Bereich der SAM-Bindungsstellen wurden degenerierte Primer eingesetzt mit dem Ziel, eine oder mehrere OMT-Transkripte aus einer Erdbeer-cDNA-Bibliothek zu isolieren. Mit Hilfe eines bakteriellen Expressionssystems galt es schließlich, die Funktionalität des kodierten Proteins zu überprüfen und die Substratspezifität zu testen.

C ERGEBNISSE UND DISKUSSION

1 Untersuchungen zur Biosynthese von DMHF in Erdbeeren

1.1 Synthese von stabil markierten Desoxyzuckern

Im Gegensatz zu vielen Monosacchariden, die kommerziell in ^2H - und ^{13}C -markierter Form erhältlich sind, werden nur wenige Desoxyzucker im Handel angeboten. Daher mussten zur Darstellung stabil markierter Desoxyzucker geeignete Synthesen entwickelt werden, die den Einbau von ^2H und ^{13}C an bestimmten Positionen im Molekül erlauben. Generell wurden alle im Folgenden dargestellten Synthesen zuerst mit unmarkierten Edukten auf ihre Durchführbarkeit hin getestet. Erst nach erfolgreicher spektroskopischer Überprüfung der Reaktionsprodukte wurden die stabil markierten Ausgangssubstanzen eingesetzt.

1.1.1 Synthese von [1- ^{13}C]-1-Desoxy-D-fructose

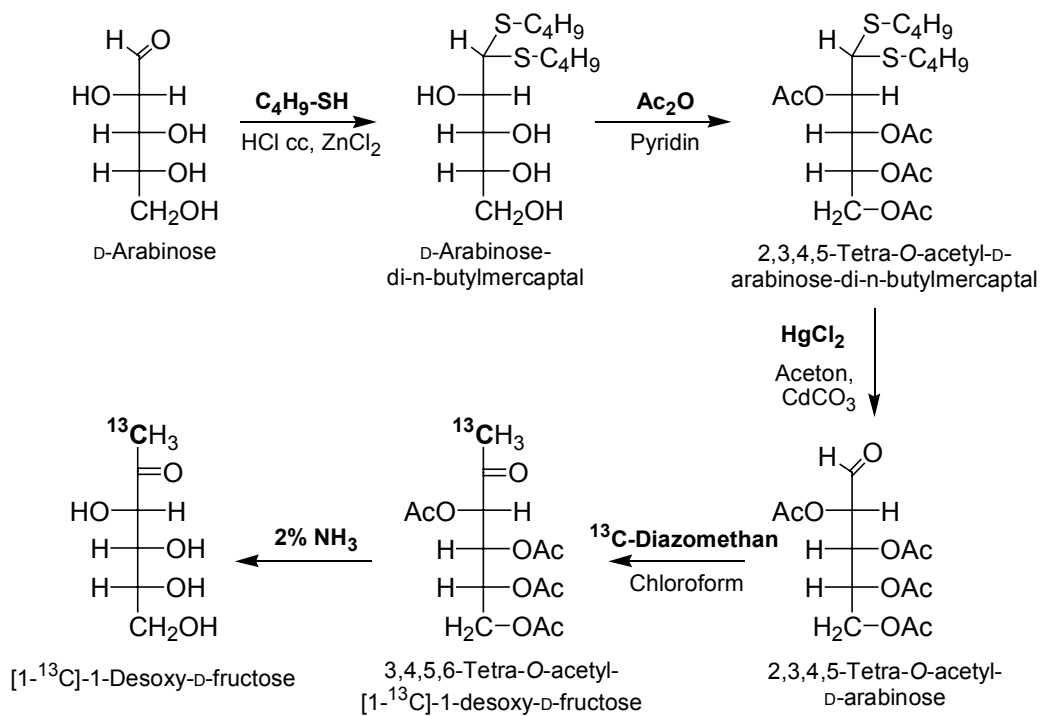


Abb. 9 Syntheschema für [1- ^{13}C]-1-Desoxy-D-fructose. Ac: Acetyl.

Als Ausgangsverbindung für die Darstellung von 1-Desoxy-D-fructose diente D-Arabinose, die an Position C-1 mit Hilfe von Diazomethan methyliert wurde (Abb. 9). In der fünfstufigen Synthese mussten zuerst Schutzgruppen eingeführt werden, um eine weitere Reaktion des Diazomethans mit den freien OH-Gruppen zu verhindern. Im ersten Schritt wurde unter Bildung von D-Arabinose-di-n-butylmercaptal die Aldehydgruppe blockiert, um im Anschluss die freien OH-Gruppen mittels Acetanhydrid zu acetylieren (Zinner und Mitarbeiter, 1956). Nach

Abspaltung der Thioacetal-Gruppen durch Quecksilberchlorid konnte der freie Aldehyd durch Diazomethan methyliert werden (Wolfrom und Mitarbeiter, 1941/1945). Da Diazomethan explosiv, hoch toxisch und kanzerogen ist, wurde das Methylierungsreagenz *in situ* aus *N*-Methyl-*N*-nitroso-4-toluolsulfonamid durch Zugabe von KOH in etherischer Methanollösung dargestellt (De Boer und Backer, 1956). Üblicherweise erfolgt die Methylierung ebenfalls in etherischer Lösung. Durch den Einsatz von Chloroform als Lösungsmittel konnte jedoch die Bildung von Nebenprodukten verringert und die Produktausbeute erhöht werden. Mit Hilfe von ^{13}C -markiertem Diazomethan (gebildet aus *N*-[^{13}C]Methyl-*N*-nitroso-4-toluolsulfonamid) konnte die entsprechende Markierung an Position C-1 in das Molekül eingeführt werden. Anschließend wurden in ammoniakalischer Lösung die Acetyl ester hydrolysiert und das Produkt getrocknet. Nach mehrmaligem Lyophilisieren konnte [$1\text{-}^{13}\text{C}$]-1-Desoxy-D-fructose erhalten werden.

1.1.2 Synthese von [$6\text{-}^2\text{H}_1$]-6-Desoxy-D-glucose

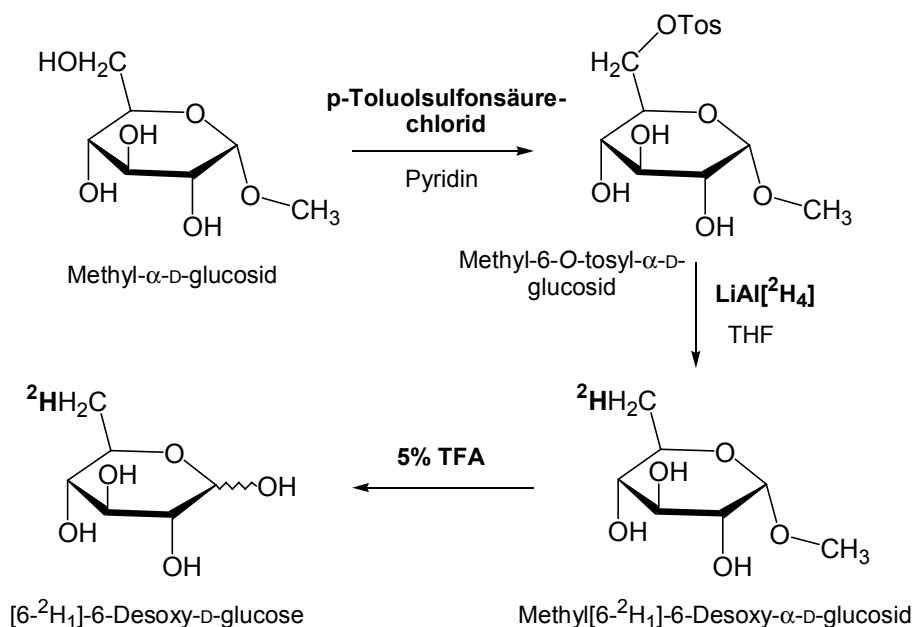


Abb. 10 Syntheschema für [$6\text{-}^2\text{H}_1$]-6-Desoxy-D-glucose. Tos: Tosyl, TFA: Trifluoressigsäure.

Für die Synthese von deuterierter 6-Desoxy-D-glucose wurde das Methyl- α -D-glucosid in das Methyl-6-O-tosyl- α -D-glucosid überführt (Cramer und Mitarbeiter 1959) und anschließend mit $\text{LiAl}[\text{}^2\text{H}_4]$ reduziert, wobei ein ^2H -Atom an Position C-6 in das Molekül eingeführt wurde (Haque und Mitarbeiter 1987). Nach Hydrolyse mit Trifluoressigsäure konnte schließlich [$6\text{-}^2\text{H}_1$]-6-Desoxy-D-glucose isoliert werden (Abb. 10).

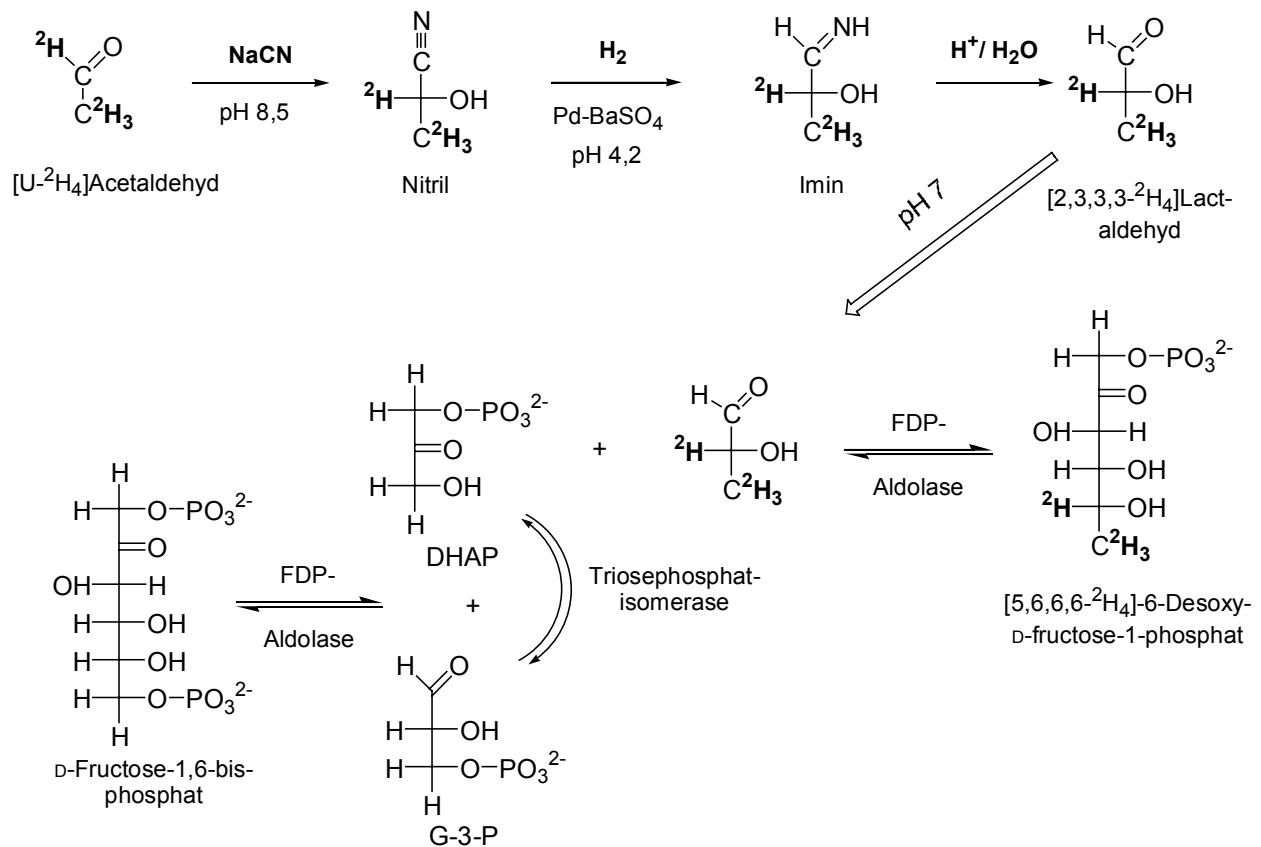
1.1.3 Synthese von [5,6,6,6-²H₄]-6-Desoxyhexulose-1-phosphat

Abb. 11 Syntheschema für [5,6,6,6-²H₄]-6-Desoxyhexulose-1-phosphat, exemplarisch für [5,6,6,6-²H₄]-6-Desoxy-D-fructose-1-phosphat dargestellt. FDP-Aldolase: D-Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase, DHAP: Dihydroxyacetonphosphat, G-3-P: Glycerinaldehyd-3-phosphat.

6-Desoxyzuckerphosphate lassen sich vereinfacht durch zwei Schritte darstellen (Abb. 11). Zuerst wurde Acetaldehyd mit Natriumcyanid in einer Kiliani-Fischer-Synthese zu Lactaldehyd umgesetzt (Serianni und Mitarbeiter 1979). Da im ersten Teilschritt, während der Bildung des Cyanhydrins, zwei diastereomere Nitrile entstanden, bildete sich nach Reduktion zum Imin und Protonierung ein racemisches Gemisch aus D- und L-Lactaldehyd. Diese wurden anschließend durch enzymatische Aldolkondensation mit Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) zu einer Mischung aus 6-Desoxy-D-fructose-1-phosphat und 6-Desoxy-L-sorbose-1-phosphat umgesetzt (Durrwachter und Mitarbeiter 1986). Das für die Aldolkondensation notwendige DHAP war enzymatisch aus D-Fructose-1,6-bisphosphat durch D-Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase reversibel gebildet worden. Als zweites Produkt der enzymatischen Spaltung entstand Glycerinaldehyd-3-phosphat (G-3-P), welches durch Triosephosphatisomerase in DHAP umgewandelt wurde. Das Gleichgewicht der ersten enzymatischen Reaktion konnte somit zugunsten der Spaltung verschoben werden. Durch Verwendung von [U-²H₄]Acetaldehyd im ersten Syntheseschritt wurden vier Deuteriumatome in das Molekül eingeführt.

1.2 Applikationsversuche mit Erdbeeren

1.2.1 Grundlagen

Wie bereits bei den von Roscher (1998) durchgeführten Applikationsversuchen wurden auch in dieser Studie intakte Erdbeeren verwendet, um die Bedingungen während der Fruchtreifung so realistisch wie möglich zu simulieren. Da bei der sogenannten Stielapplikation, bei der die Substratlösung über den Stiel in die Erdbeere aufgesogen werden muss, ein Großteil der markierten Verbindungen im Stiel verbleibt und somit für die Biosynthese von DMHF nicht zur Verfügung steht (Roscher und Mitarbeiter 1998), wurde für die folgenden Anwendungen die von Schwab (1998) benutzte Methode angewandt. Hierbei wird der potentielle Prekursor in Leitungswasser gelöst und mit Hilfe einer Spritze in die Erdbeere, deren Kelchblätter vorher entfernt wurden, injiziert. Das Abtrennen der Früchte von der Mutterpflanze und die daraus resultierende Unterbrechung der Nährstoff-Zufuhr, scheint keinen größeren Einfluss auf die DMHF-Bildung zu haben, da selbst bei mehrtägiger Lagerung reifer, geernteter Erdbeeren die DMHF-Konzentration kontinuierlich ansteigt. Erst nach Ablauf von sieben Tagen kehrt sich dieser Trend um (Pérez und Mitarbeiter 1996).

Insgesamt wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt, die getrennt voneinander betrachtet werden müssen, da aufgrund geringfügiger Modifikation in der Ausführung ein Vergleich nur mittelbar möglich ist.

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Erdbeeren nach Applikation der Substrate drei Tage bei Raumtemperatur im Tageslicht inkubiert und anschließend eingefroren. Die Isolierung der Zielverbindungen (DMHF, DMMF und DMHF-Glucosid) erfolgte durch Festphasenadsorptionschromatographie an XAD-2 Polystyrolharz. Die Methode erlaubte eine unkomplizierte Abtrennung polarer Verbindungen (Proteine, Kohlenhydrate und ähnliches) aus dem wässrigen Erdbeerhomogenat. Die verbleibenden Komponenten ließen sich anschließend durch Verwendung zweier unterschiedlich polarer Elutionsmittel in einen Aromaextrakt (Diethylether) und einen Glykosidextrakt (Methanol) auftrennen (Gunata und Mitarbeiter 1985, Roscher 1998). Nach dem Einengen wurden die Extrakte direkt ohne weitere Aufreinigung analysiert. DMHF und DMMF, die im Aromaextrakt enthalten waren, wurden mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (HRGC-MS) auf ihre Isotopenverhältnisse hin untersucht. Die Auswertung erfolgte durch Integration der Peakflächen des Moleküliions der unmarkierten Verbindung $[M^+]$ und des dazugehörigen Moleküliions des markierten Isotopomers $[(M+x)^+]$, wobei x die Anzahl der markierten Atome repräsentiert. Das Verhältnis der Flächen wird als Markierungsgrad bezeichnet und ist nachstehend in einer allgemeinen Form dargestellt:

$$\text{Markierungsgrad [\%]} = \frac{\text{Fläche}[(M+x)^+]}{\text{Fläche}[M^+]} \times 100$$

Bei allen durchgeführten Experimenten sind daher die Moleküliionen der unmarkierten Zielverbindung (m/z 128) für DMHF und (m/z 142) für DMMF heranzuziehen.

Wie in Abb. 12 ersichtlich, macht sich die relative Häufigkeit von ^2H (0,015 %) und ^{13}C (1,108 %) auch in unmarkiertem, natürlichem DMHF bzw. DMMF bemerkbar (Schmidt und Schmelz 1980). Die ermittelten Markierungsgrade sind daher keine Absolutwerte, sondern müssen immer in Relation zu Kontrollwerten betrachtet werden. Aus diesem Grund wurden bei jeder Messreihe Erdbeeren aufgearbeitet, die entweder mit unmarkierter Fructose (Kontrollwert) oder gar nicht behandelt (Blindwert) wurden.

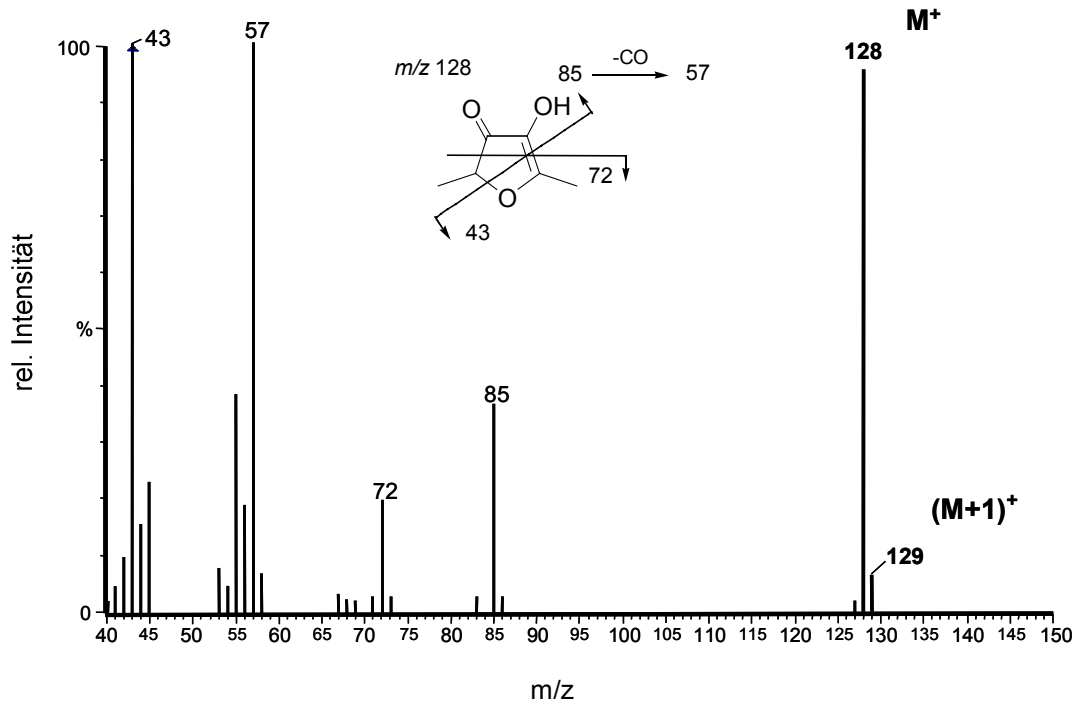


Abb. 12 Massenspektrum nach Elektronenstoßionisierung (EI) von natürlichem DMHF. Hervorgehoben sind die Intensitäten des Molekülions $[M^+]$ (m/z 128) und des Isotopomerions $[(M+1)^+]$ (m/z 129). Die übrigen Signale (m/z 85, 72, 57 und 43) sind typische Fragmentationen von DMHF (Fay und Mitarbeiter 1997).

Bei allen Versuchen der ersten Messreihe wurde neben dem Diethyletherextrakt auch der Methanolextrakt untersucht, in dem sich unter anderem das DMHF-Glucosid befindet. Durch Hochleistungsflüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie (HPLC-MS/MS) ließ sich für diese Verbindung das jeweilige Isotopenverhältnis bestimmen (Schwab 1998). Zuerst wurde das Isotopenverhältnis des Gesamtmoleküls im Massenspektrum und anschließend das des Aglykons im Produktionenspektrum ermittelt. Auf diese Weise konnte der Markierungsgrad von gebundenem DMHF bestimmt werden. Da die Ergebnisse mit denen der HRGC-MS Messung übereinstimmten, wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit auf die Darstellung dieser Daten verzichtet.

Im Allgemeinen beziehen sich alle Positions-spezifischen Diskussionen auf die ursprüngliche Kohlenstoffkette im Zuckermolekül, da im DMHF- und DMMF-Molekül eine andere Nummerierung vorliegt. So entsprechen die beiden C-Methylgruppen des DMHF und DMMF den Positionen C-1 und C-6 der Monosaccharide.

1.2.2 Erste Messreihe

Die erste Messreihe sollte die Frage klären, ob Desoxyzucker in die Furanonstruktur eingebaut werden. Zum Einsatz kamen $[6-^2\text{H}_1]$ -6-Desoxy-D-glucose und $[6-^{13}\text{C}]$ -6-Desoxy-D-fructose, die, wie in Kap. B 2.3.1 beschrieben, als Vorläufer des DMHF-Glucosid diskutiert werden. Ferner wurde $[1-^{13}\text{C}]$ -1-Desoxy-D-fructose eingesetzt, da aufgrund der Strukturhomologie eine Metabolisierung zu DMHF denkbar wäre. In Abb. 13 ist der mögliche Bildungsmechanismus dargestellt. Nach Wasserabspaltung an Position 2 und 6 könnte eine Umlagerung der Doppelbindung ($\Delta 5,6$) in den Ring stattfinden, wobei nach abschließender Keto-Enol-Tautomerie DMHF entstünde. Aus technischen Gründen stand $[6-^{13}\text{C}]$ -6-Desoxy-D-fructose nur als Gemisch mit $[6-^{13}\text{C}]$ -6-Desoxy-D-glucose zur Verfügung.

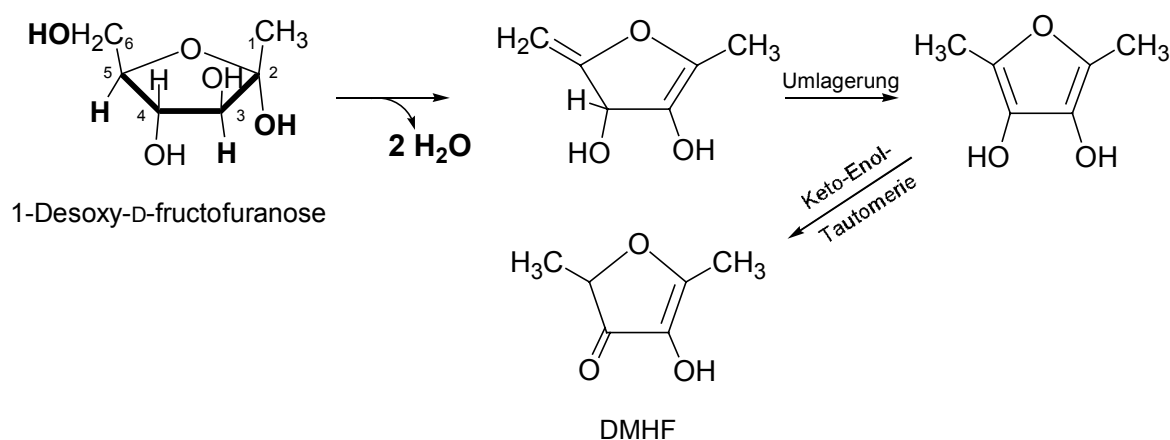


Abb. 13 Mögliches Biosyntheschema von DMHF ausgehend von 1-Desoxy-D-fructose.

Des Weiteren wurde L- $[1-^{13}\text{C}]$ Ascorbinsäure appliziert, da diese als Vorläufer von Sotolon (3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon), einem Struktur analogon von DMHF, identifiziert wurde (König und Mitarbeiter 1999). An Position C-1 markierte D-Glucose und D-Fructose dienen als Vergleichsproben, bei denen ein Einbau aufgrund der Ergebnisse von Roscher und Mitarbeitern (1998) zu erwarten war. Bei allen Applikationen wurden 5 bis 6 mg der in 50 μl Wasser gelösten Substanz in Erdbeeren der Sorte Elsanta und White D injiziert. Die in Tab. 1 zusammengefassten Ergebnisse sind Mittelwerte von je zwei bis vier Einzelapplikationen. Da alle verwendeten Substrate nur an je einer Position markiert waren, wurden zur Berechnung des Markierungsgrades jeweils die Molekülonen des einfach markierten Isotopomers $[(M+1)^+]$ mit (m/z 129) für DMHF und (m/z 143) für DMMF herangezogen.

Wie aus Tab. 1 hervorgeht, entsprachen die Werte für alle applizierten Desoxyzucker in etwa denen der Kontroll- und Blindwerte, wohingegen die Werte für Ascorbinsäure sogar noch unter den Kontrollwerten lagen. Die Isotopenverteilung in den Zielmolekülen stimmte daher mit der Verteilung in den natürlichen Furanonen überein. Folglich kann weder zusätzliches ^{13}C noch ^2H in die Furanonstruktur aufgenommen worden sein. Sowohl L-Ascorbinsäure als auch 1-Desoxy-D-fructose und 6-Desoxy-D-fructose/-glucose können somit als Vorläufer für DMHF und DMMF ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse wurden anschließend durch den Einsatz der

empfindlichen Kapillargaschromatographie-Isotopenverhältnismassenspektrometrie (GC-IRMS) bestätigt. Durch Ermittlung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte konnte ebenfalls keine signifikante Anreicherung an ^{13}C in DMHF und DMMF nach Applikation von $[6-^{13}\text{C}]$ -6-Desoxy-D-fructose und $[1-^{13}\text{C}]$ -1-Desoxy-D-fructose ermittelt werden.

Tab. 1: Markierungsgrad der Zielverbindungen DMHF und DMMF nach Applikation einfach markierter Substrate. Zur Berechnung wurde das Isotopomerion $[(\text{M}+1)^+]$ herangezogen.

Substanz	DMHF	DMMF
L-[1- ^{13}C]Ascorbinsäure	5,1 % \pm 1,7 %	5,5 % \pm nb
D-Fructose (Kontrollwert)	6,2 % \pm 0,7 %	7,4 % \pm 0,1 %
Blindwert	6,7 % \pm 0,1 %	7,5 % \pm 0,1 %
$[6-^{13}\text{C}]$ -6-Desoxy-D-fructose/-glucose	6,9 % \pm nb	6,6 % \pm nb
$[1-^{13}\text{C}]$ -1-Desoxy-D-fructose	6,9 % \pm 0,5 %	8,0 % \pm 0,5 %
$[6-^2\text{H}_1]$ -6-Desoxy-D-glucose	7,0 % \pm nb	7,2 % \pm nb
D-[1- ^{13}C]Glucose	7,8 % \pm 1,5 %	13,2 % \pm nb
D-[1- ^{13}C]Fructose	7,8 % \pm 0,3 %	11,5 % \pm nb
D-[1- ^2H]Glucose	8,1 % \pm 1,4 %	11,9 % \pm 0,8 %
D-[1- $^2\text{H}_1]$ Fructose	8,5 % \pm 1,3 %	10,8 % \pm nb

nb: nicht bestimmt (Einzelwert)

Nach Applikation von isotopenmarkierter D-Glucose und D-Fructose wurden generell die Markierungen in den Zielmolekülen wiedergefunden. Übereinstimmend ließ sich ein geringfügig höherer Anteil der $[\text{M}+1]$ -Isotopomere im Vergleich zu Kontroll- und Blindwerten erkennen. Eine Aussage über das bevorzugte Substrat war indes nicht möglich. Auffälligerweise wies DMMF gegenüber DMHF einen größeren Anteil des schweren Isotops auf.

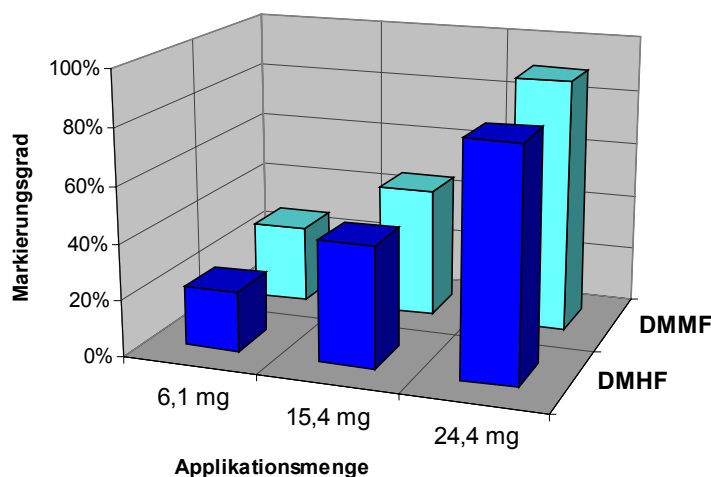
Der Einsatz zweifach markierter Substrate erlaubte eine klarere Aussage darüber, welche der beiden isomeren Verbindungen bevorzugt eingebaut wird. Nach Applikation von D-[6,6- $^2\text{H}_2$]Glucose und D-[6,6- $^2\text{H}_2$]Fructose ließ sich ein deutlich besserer Einbau der D-Fructose gegenüber der D-Glucose erkennen (Tab. 2). Im Gegensatz zu dem vorherigen Experiment war auch ein eindeutiger Unterschied zu den Kontrollwerten ersichtlich, da die natürliche Häufigkeit der $[\text{M}+2]$ -Isotopomere ($< 1\%$) gegenüber den $[\text{M}+1]$ -Isotopomeren (ca. 7 %) deutlich verringert ist. Dieser Ansatz zeigte, dass D-Fructose und in geringerem Ausmaß auch D-Glucose zu DMHF und DMMF metabolisiert werden können und dass bei dieser Transformation beide Protonen an Position C-6 erhalten bleiben. Lediglich für die $[\text{M}+2]$ -Isotopomere konnte ein Anstieg des Markierungsgrades gegenüber den Kontroll- und Blindwerten beobachtet werden, wohingegen die Verhältnisse der $[\text{M}+1]$ -Isotopomere konstant blieben.

Tab. 2 Markierungsgrad [M+2] nach Applikation von zweifach markierter D-Glucose und D-Fructose.

Substrat	DMHF	DMMF
Blindwert	0,9 % ± 0,1 %	0,9 % ± 0,1 %
D-Fructose (Kontrollwert)	0,8 % ± 0,2 %	0,9 % ± 0,1 %
D-[6,6- ² H ₂]Glucose	4,1 % ± 0,8 %	6,3 % ± nb
D-[6,6- ² H ₂]Fructose	5,7 % ± 1,5 %	8,5 % ± nb

nb: nicht bestimmt (Einzelwert)

In einem abschließenden Versuch der ersten Messreihe sollte untersucht werden, inwiefern die applizierte Menge den Markierungsgrad der Zielmoleküle beeinflussen kann. Hierfür wurden in drei etwa gleich große Erdbeeren steigende Mengen (6,1 mg, 15,4 mg und 24,4 mg) an D-[1-¹³C]Fructose injiziert. Ein negativer Einfluss auf die DMHF-Biosynthese aufgrund der hohen D-Fructose-Zugabe war nicht zu erwarten, da bei Studien mit Erdbeeren, die in D-Fructose- oder D-Fructose-6-phosphat-haltige Nährlösung getaucht wurden, die Bildung von DMHF sogar gesteigert werden konnte (Pérez und Mitarbeiter 1999).

**Abb. 14** Markierungsgrad [M+1] von DMHF und DMMF nach Applikation von steigenden Konzentrationen an D-[1-¹³C]Fructose.

Wie in Abb. 14 skizziert, konnte hierbei mit steigender Substratmenge auch ein Anstieg des Markierungsgrades von DMHF und DMMF festgestellt werden. Der höchste Markierungsgrad wurde nach Applikation von 24,4 mg D-[1-¹³C]Fructose festgestellt. Durch den natürlichen Zuckergehalt in der Erdbeere wird die markierte D-Fructose mit steigender applizierter Menge weniger stark verdünnt. Dabei entspricht die Steigerungsrate des Markierungsgrades in etwa der prozentualen Steigerung der Substratmenge (die vierfache Menge an Fructose resultierte in einem viermal so hohen Markierungsgrad).

Zusammenfassung der ersten Messreihe:

Nach Applikation von einfach markierten Desoxyzuckern ($[1-^{13}\text{C}]$ -1-Desoxy-D-fructose, $[6-^{13}\text{C}]$ -6-Desoxy-D-fructose/-glucose und $[6-^2\text{H}_1]$ -6-Desoxy-D-glucose) konnte auch durch Einsatz der empfindlichen GC-IRMS kein Einbau in die Zielmoleküle festgestellt werden. Ebenso ist L-Ascorbinsäure keine Vorläufersubstanz für DMHF und DMMF. Sowohl D-Glucose als auch D-Fructose wurden in die Furanonstruktur eingebaut. Dabei konnte beobachtet werden, dass nicht nur die Einfachmarkierung (^{13}C bzw. ^2H) an Position C-1, sondern auch die vollständige Zweifachmarkierung an Position C-6 ($^2\text{H}_2$) in den Zielsubstanzen wieder gefunden wurde. Da D-Fructose besser als D-Glucose in DMHF und DMMF eingebaut worden ist, sind vermutlich von D-Fructose ausgehend weniger Reaktionsschritte nötig, um dieses Monosaccharid in DMHF zu überführen. Wie aus der letzten Studie ersichtlich ist, war die eingesetzte Menge an potentiell Vorläufer ein entscheidendes Kriterium für die Höhe des resultierenden Markierungsgrades. So ließen sich nach Einsatz höherer Mengen an markierten Monosacchariden eindeutige Aussagen treffen, ob die entsprechenden Verbindungen in die Zielsubstanzen eingebaut wurden. Bei Vergleichen zwischen zwei oder mehreren Substanzen muss sowohl die applizierte Menge als auch die Größe der Erdbeere berücksichtigt werden, da sonst eine unterschiedlich starke Verdünnung der isotonenmarkierten Substanz mit den natürlich vorkommenden unmarkierten Zuckern in der Frucht zu Fehlinterpretationen führen kann. Unmissverständliche Ergebnisse können außerdem durch den Einsatz von Mehrfachmarkierungen erreicht werden, da die natürliche Häufigkeit von zwei- und mehrfach markierten Isotopomeren unter einem Prozent liegt und daher auch ein geringfügiger Einbau detektiert werden kann. Auf eine erneute Applikation der Desoxyzucker kann aber dennoch verzichtet werden. Diese unterschieden sich nur minimal von den Blind- und Kontrollwerten. Nur wenn mindestens ein mit D-Glucose oder D-Fructose vergleichbarer Einbau stattgefunden hätte, wäre eine wiederholte Applikation sinnvoll gewesen. So kann aber mit großer Sicherheit davon ausgegangen werden, dass zur Bildung von DMHF mehr Metabolisierungsschritte notwendig sind als von D-Glucose oder D-Fructose ausgehend.

1.2.3 Zweite Messreihe

Alle bisherigen Experimente wurden bei einer Inkubationsdauer von drei Tagen durchgeführt. Eine längere Zeit war nicht möglich, da die Beeren sonst zu stark eintrockneten oder aber Gefahr liefen, von Schimmelpilzen befallen zu werden. Dennoch stellte sich die Frage der günstigsten Inkubationsdauer. Aus diesem Grund wurden drei Erdbeeren, die jeweils 10 mg D-[U- $^{13}\text{C}_6$]Fructose enthielten, unterschiedlich lang (ein, zwei oder drei Tage) inkubiert. Die resultierenden Markierungsgrade für das [M+6]-Isotopomer sind in Abb. 15 zusammengefasst.

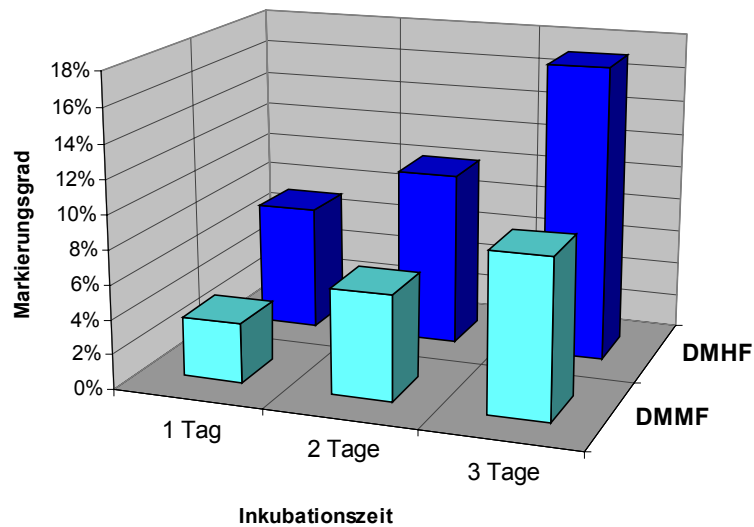


Abb. 15 Markierungsgrad [M+6] von DMHF und DMMF nach Applikation von D-[U-¹³C₆]Fructose nach ein, zwei oder drei Tagen Inkubationszeit.

Wie aus der Grafik ersichtlich ist, steigt der Markierungsgrad kontinuierlich mit zunehmender Inkubationsdauer an. Der höchste Einbau ließ sich bei DMHF nach drei Tagen feststellen. Unter Berücksichtigung der oben genannten Einschränkungen bei längerer Lagerdauer war die gewählte Inkubationszeit von drei Tagen als am günstigsten zu erachten.

Ebenso wie die Inkubationsdauer den Grad des Einbaus beeinflussen kann, sollte die Verwendung unterschiedlich reifer Erdbeeren eine Optimierung der Einbaurrate ermöglichen. Aus diesem Grund wurde eine weiße, eine rot-werdende und eine reife Erdbeere mit je 9 mg D-[U-¹³C₆]Fructose behandelt und drei Tage inkubiert.

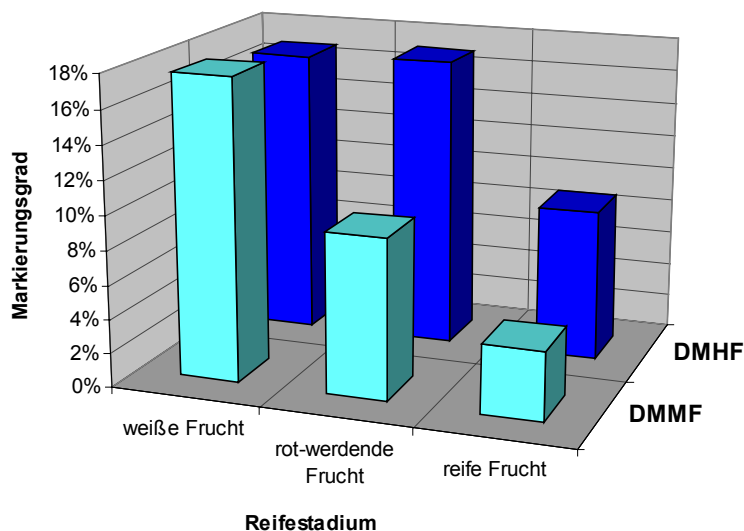


Abb. 16 Markierungsgrad [M+6] von DMHF und DMMF nach Applikation von D-[U-¹³C₆]Fructose in Erdbeeren verschiedener Reifestadien.

Wie der Abb. 16 zu entnehmen ist, konnte der höchste Markierungsgrad durch Verwendung von unreifen, weißen Erdbeeren erzielt werden. Im Vergleich zum Reifestadium „rot-orange“ konnte jedoch nur eine Steigerung im Markierungsgrad des Methoxyderivats erzielt werden, wohingegen der Wert für das Hydroxyfuranon nahezu konstant blieb. Die relativ niedrigen Werte in der reifen Frucht lassen sich sicherlich darauf zurückführen, dass in diesem Reifestadium sowohl DMHF als auch DMMF bereits gebildet worden sind und daher ein Einbau der isotopenmarkierten D-Fructose den Markierungsgrad nur noch in geringem Maße beeinflusst. Außerdem ist zu beachten, dass der Zuckergehalt in Erdbeeren während der Reifung kontinuierlich zunimmt (Woodward 1972). Dadurch tritt nach Injektion in die reife Frucht eine starke Verdünnung der markierten D-Fructose auf und folglich ist ein niedrigerer Markierungsgrad zu erwarten.

Nachdem nun die besten Bedingungen bezüglich der Inkubationsdauer und des Reifestadiums der Erdbeeren für diese Art von Fütterungsstudien ermittelt worden waren, wurden weitere Substrate eingesetzt, die Aufschluss über die DMHF-Biosynthese geben sollten. Die Wiederholung der in der ersten Serie eingesetzten D-Glucosen und D-Fructosen in höherer Konzentration ergab, dass trotz Einfachmarkierung eine Unterscheidung der beiden Substrate möglich ist. Jeweils ca. 15 mg D-[1-¹³C]Fructose, D-[1-²H₁]Fructose und D-[1-²H]Glucose wurden in weiße/rot-werdende Erdbeeren injiziert und nach drei Tagen aufgearbeitet.

Tab. 3 Markierungsgrad [M+1] von DMHF und DMMF nach Applikation einfachmarkierter und unmarkierter Substrate.

Substanz	DMHF	DMMF
Kontrolle	7,3 % ± 1,2 %	7,0 % ± 0,3 %
D-[4- ² H]Glucose	7,7 % ± 1,3 %	7,2 % ± 0,1 %
1,6-Dichloro-1,6-dideoxyfructose	8,3 % ± 1,2 %	7,0 % ± 0,2 %
D-[2- ² H]Glucose	13,0 % ± 1,6 %	15,1 % ± 2,4 %
D-[1- ² H]Glucose	24,2 % ± 0,2 %	20,3 % ± 3,3 %
D-[1- ² H ₁]Fructose	32,5 % ± 1,6 %	34,0 % ± 0,3 %
D-[1- ¹³ C]Fructose	38,4 % ± nb	36,3 % ± nb

nb: nicht bestimmt (Einzelwert)

Die in Tab. 3 dargestellten Ergebnissen zeigen einen deutlichen Unterschied im Markierungsgrad von DMHF und DMMF nach Applikation von D-[1-²H]Glucose und D-[1-²H₁]- bzw. D-[1-¹³C]Fructose. Nach Literaturangaben sind sowohl die Konzentrationszunahme von D-Glucose und D-Fructose während der Fruchtentwicklung, als auch deren Endkonzentration in der reifen Frucht nahezu identisch (Forney und Breen 1986, Wrolstad und Shallenberger 1981).

Zum Zeitpunkt der Applikation sollten daher beide Verbindungen in gleichem Maße durch den natürlich vorhandenen Pool verdünnt werden und in vergleichbaren Konzentrationen für die Metabolisierungsschritte zur Verfügung stehen. Die Art der Markierung (^2H oder ^{13}C) im Fructosemolekül scheint das Metabolisierungsverhalten nicht zu beeinträchtigen. Die Werte für die beiden D-Fructosen sind als gleichwertig anzusehen, wenn auch die ^{13}C -Markierung geringfügig besser eingebaut wurde. In dieser Untersuchungsreihe konnte ein in etwa gleicher Markierungsgrad für DMHF und DMMF ermittelt werden im Gegensatz zu den Ergebnissen der ersten Serie (vgl. Tab. 1), die einen deutlich höheren Markierungsgrad für das Methoxyfuranon aufwiesen.

Mit 1,6-Dichloro-1,6-dideoxyfructose stand ein Fructosederivat zur Verfügung, dessen Eignung, zu DMHF metabolisiert zu werden, ebenfalls untersucht wurde. Ein Einbau der unmarkierten Dichloroverbindung in die Zielmoleküle fand aber nicht statt. Da in diesem Fall keine Isotopenmarkierung vorlag, wurde der Einbau der Chloratome überprüft. Der Einbau von Chlor müsste das Molekulargewicht um 35 (ein Chloratom) bzw. 70 (zwei Chloratome) erhöhen. Weder die Molekülmassen m/z 163 bzw. 198 für DMHF noch m/z 177 bzw. 212 für DMMF konnten im Chromatogramm des Aromaextraktes (Ionenspuren der angegebenen Massen) detektiert werden. Auch mögliche Fragmentationen waren nicht nachweisbar. Somit kann eine Metabolisierung von 1,6-Dichloro-1,6-dideoxyfructose zu DMHF oder DMMF ausgeschlossen werden. Einerseits kann die räumliche Anordnung der sperrigen Chloratome eine enzymatische Umsetzung verhindern, andererseits sind Veresterungen mit Phosphat-Gruppen oder Nukleotiden wie Uridintriphosphat, wie sie im Zuckerstoffwechsel häufig eintreten, aufgrund der Blockierung an Position 1 und 6 nicht mehr möglich.

Wie in Kap. B 2.3 dargestellt, wird in zwei unabhängigen Studien von D-Fructose-1,6-bisphosphat als bisher effektivstem Vorläufer von DMHF berichtet (Hecquet und Mitarbeiter 1996, Roscher und Mitarbeiter 1998). Daher besteht Grund zur Annahme, dass die Phosphatgruppen Voraussetzung für die Desoxygenierung an Position C-1 und C-6 sind. Ein denkbares Intermediat in der DMHF-Biosynthese wäre daher 6-Desoxy-D-fructose-1-phosphat, ein Molekül das bereits eine endständige Methylgruppe besitzt, wohingegen Position C-1 noch unverändert vorliegt. Aus diesem Grund wurde auch diese Substanz an Erdbeeren appliziert. Da im ersten Schritt der Synthese, der notwendig ist, um die Markierung in das Molekül einzuführen, ein racemisches Gemisch entsteht, konnte nur eine Mischung aus 6-Desoxy-L-sorbose-1-phosphat und 6-Desoxy-D-fructose-1-phosphat isoliert werden (vgl. Kap. C 1.1.3). Es wurden jeweils 16 mg $[5,6,6,6\text{-}^2\text{H}_4]$ -6-Desoxyhexulose-1-phosphat in drei verschiedene Erdbeeren injiziert.

Tab. 4 Markierungsgrad von DMHF und DMMF nach Applikation von [5,6,6,6-²H₄]-6-Desoxyhexulose-1-phosphat (6-Desoxyhex-1-P). Es wurden alle möglichen Isotopomere ([M+1] bis [M+4]) berücksichtigt.

Substanz	[M+1]	[M+2]	[M+3]	[M+4]
DMHF				
Kontrolle	7,3 % ± 1,2 %	1,4 % ± 1,0 %	0,2 % ± 0,1 %	<0,1 % ± <0,1 %
[5,6,6,6- ² H ₄]-6-Desoxyhex-1-P	6,5 % ± 0,5 %	0,5 % ± 0,5 %	0,2 % ± 0,1 %	0,1 % ± <0,1 %
DMMF				
Kontrolle	7,0 % ± 0,3 %	1,0 % ± 0,3 %	0,3 % ± 0,1 %	<0,1 % ± <0,1 %
[5,6,6,6- ² H ₄]-6-Desoxyhex-1-P	7,5 % ± 0,6 %	0,3 % ± 0,4 %	0,4 % ± 0,1 %	<0,1 % ± <0,1 %

Auch wenn die Ausgangsverbindung über vier Markierungen verfügt, so sollten in den Zielmolekülen nur drei Markierungen vollständig detektierbar sein, da das Proton an Position C-5 teilweise verloren gehen müsste. In Tab. 4 sind daher alle möglichen Isotopomere berücksichtigt. Dabei entsprechen alle Markierungsgrade praktisch den Kontrollwerten. Ein unmittelbarer Einbau von 6-Desoxyhexulose-1-phosphat in DMHF und DMMF kann somit ausgeschlossen werden.

Obwohl Desoxyzucker mehrfach als direkte Vorläufer von DMHF beschrieben wurden, (Pisarnitskii und Mitarbeiter 1992, Hecquet und Mitarbeiter 1996, Zabetakis und Holden 1996) konnte in den hier durchgeführten Inkorporationsversuchen kein Einbau von Desoxyzuckern in die Furanonstruktur festgestellt werden. Die Biosynthese von 6-Desoxyzuckern ist in Pflanzen, vor allem aber in Mikroorganismen, intensiv untersucht worden. Die C-6-Desoxygenierung verläuft nach einem einheitlichen Schema, bei dem verschiedene Nukleosiddiphosphat-Monosaccharide (NDP-Monosaccharide), hauptsächlich aber NDP-D-Glucose, als Ausgangsverbindungen identifiziert wurden (Abb. 17, Johnson und Liu 1999, Giraud und Naismith 2000). Diese werden im weiteren Verlauf zur entsprechenden 4-Ketohexose oxidiert und an Position C-5/C-6 dehydriert. Eine abschließende Reduktion an C-6 führt zur Bildung einer 4-Keto-6-desoxyhexose. Letztendlich besteht die Umwandlung aus einer intramolekularen Oxidation/Reduktion, bei der das C-4-Wasserstoffatom in Form eines Hydrids über ein enzymgebundenes NAD⁺ auf die Position C-6 übertragen wird (Hallis und Liu 1999).

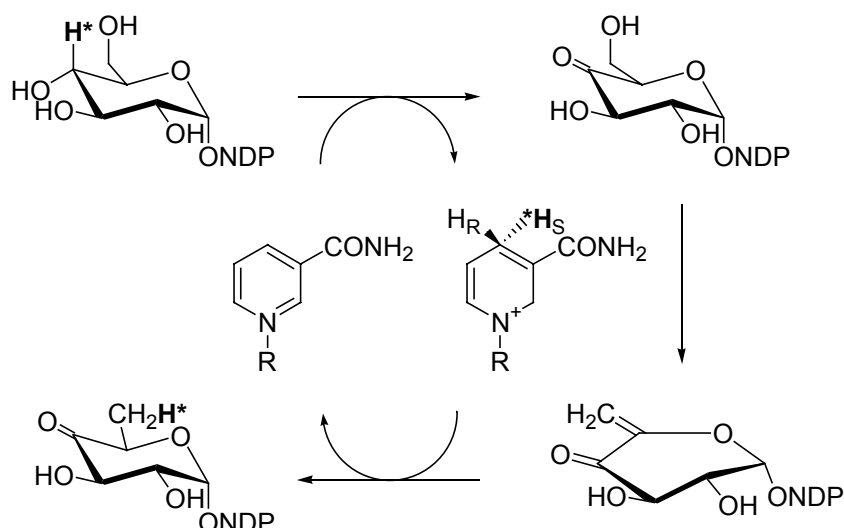


Abb. 17 Schematische Darstellung des Hydridshifts von Position C-4 nach C-6 bei der 6-Desoxygenierung von Monosacchariden (nach Johnson und Liu 1999). NDP: Nucleosiddiphosphat.

Sollte die Biosynthese von DMHF über einen vergleichbaren Mechanismus erfolgen, so müsste ebenfalls ein Hydrid-Shift von Position C-4 der Glucose nach Position C-6 des DMHF zu beobachten sein. Aus diesem Grund wurde D-[4-²H]Glucose als Substrat eingesetzt. Um einen direkten Vergleich zu ermöglichen, wurden Parallelapplikationen mit D-[1-²H]Glucose und D-[2-²H]Glucose durchgeführt. Jeweils 15 mg der genannten Verbindungen wurden an etwa gleich große Erdbeeren appliziert (Tab. 5).

Tab. 5 Markierungsgrad [M+1] von DMHF und DMMF nach Applikation von an verschiedenen Positionen markierter D-Glucose.

Substrat	DMHF	DMMF
Kontrolle	7,3 % ± 1,2 %	7,0 % ± 0,3 %
D-[4- ² H]Glucose	7,7 % ± 1,3 %	7,2 % ± 0,1 %
D-[2- ² H]Glucose	13,0 % ± 1,6 %	15,1 % ± 2,4 %
D-[1- ² H]Glucose	24,2 % ± 0,2 %	20,3 % ± 3,3 %

Der Zusatz von D-[4-²H]Glucose bewirkte keine Veränderung der Isotopenverhältnisse von DMHF und DMMF gegenüber den natürlich vorkommenden Furanonen. Da nach Applikation von D-[1-²H]Glucose ein Anstieg des Markierungsgrades auf über 20 % festgestellt werden konnte, ließ sich eindeutig nachweisen, dass das Proton an Position C-4 während der Bildung von DMHF verloren geht. Überraschenderweise konnte auch nach Fütterung von D-[2-²H]-Glucose ein beachtlicher Anstieg des Markierungsgrades beobachtet werden, wenn auch niedriger als nach Applikation von D-[1-²H]Glucose. Da D-Fructose besser in die Furanonstruktur eingebaut wird (vgl. Tab. 3), muss die extern zugeführte D-Glucose erst zu D-Fructose isomerisiert werden. Die Ketose trägt aber an Position C-2 kein Proton mehr und müsste daher

die Markierung verlieren. Selbst wenn eine direkte Metabolisierung von D-Glucose zu DMHF stattfände, dürfte ein derart hoher Markierungsgrad nicht detektierbar sein. Das Proton an Position C-2 in DMHF müsste aufgrund der Keto-Enol-Tautomerie mit dem Medium ausgetauscht werden und könnte daher den Markierungsgrad nicht wesentlich beeinflussen. Somit muss sich die C-2-Markierung wie die C-1-Markierung der D-Glucose in den C-Methylgruppen von DMHF und DMMF befinden. Die Massenspektren von DMHF und DMMF nach Applikation von D-[1-²H]- und D-[2-²H]Glucose zeigen identische Fragmentierungsmuster, was die aufgestellte Hypothese noch unterstreicht (Abb. 18).

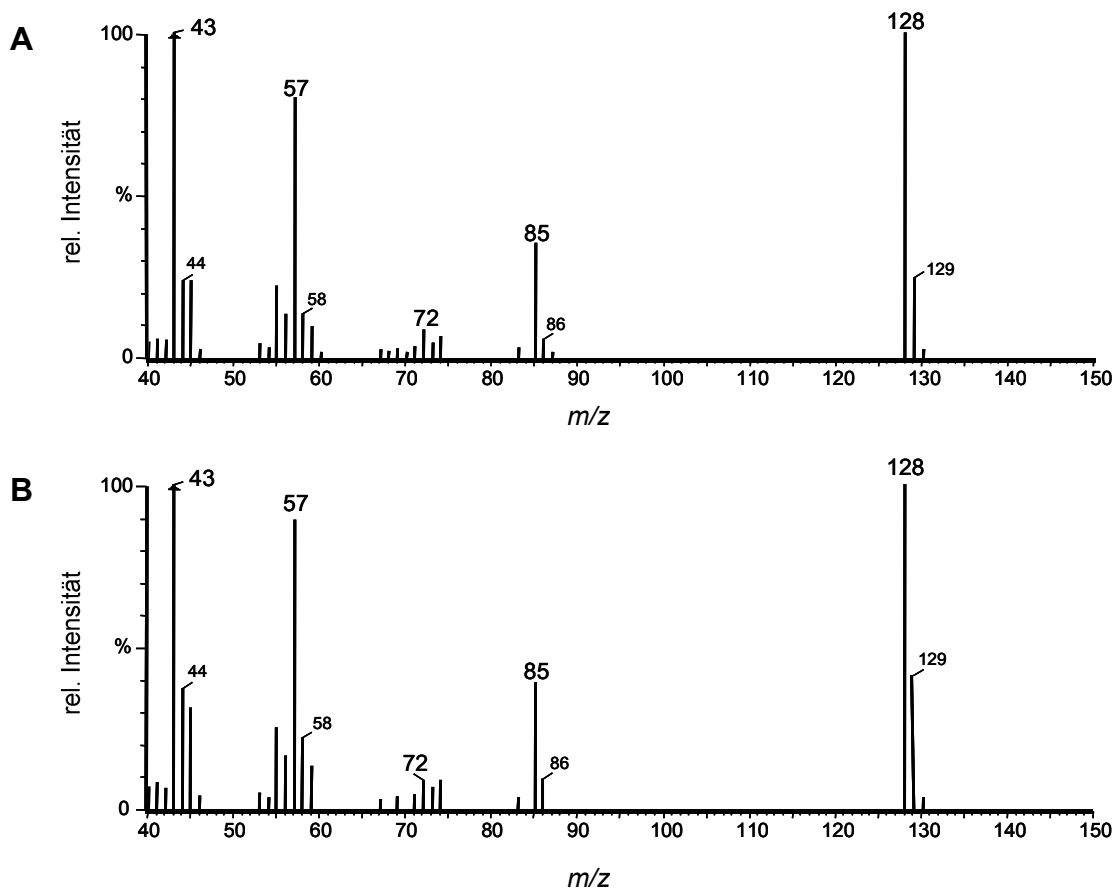


Abb. 18 Massenspektren (EI) von DMHF nach Applikation von D-[2-²H]Glucose (A) und D-[1-²H]Glucose (B).

Der Einbau des von Position C-2 stammenden Protons muss daher auf eine intramolekulare Verschiebung zurückzuführen sein. Diese lässt sich bei der Umwandlung von D-Glucose-6-phosphat zu D-Fructose-6-phosphat mittels Glucosephosphatisomerase beobachten. Mit Hilfe von stabil und radioaktiv markierten Monosacchariden konnte der Transfer des Wasserstoffs von Position C-2 des D-Glucose-6-phosphats an Position C-1 des D-Fructose-6-phosphats nachgewiesen werden. Dieser erfolgt allerdings nur zu etwa 70 % intramolekular (Willem und Mitarbeiter 1990, Zhang und Mitarbeiter 1995) und entspricht damit annähernd dem Unterschied in den Markierungsgraden nach Applikation von D-[1-²H]- und D-[2-²H]Glucose. Die Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass ausgehend von D-Glucose ein Glucosephosphat-

isomerase-katalysierter Zwischenschritt in der Bildung von DMHF und DMMF erforderlich ist. Hierdurch wird der von Roscher und Mitarbeitern (1998) favorisierte Biosyntheseweg von DMHF über D-Glucose-6-phosphat und D-Fructose-6-phosphat bestätigt.

Zweifelsohne kommt dem Kohlenhydratstoffwechsel eine entscheidende Bedeutung in der DMHF-Biosynthese zu. Einfluss darauf könnte somit auch D-Fructose-2,6-bisphosphat, ein Regulator des Auf- und Abbaus von D-Fructose-1,6-bisphosphat, haben. Cytosolisches D-Fructose-2,6-bisphosphat im nanomolaren Konzentrationsbereich inhibiert Fructose-1,6-bisphosphatase bei gleichzeitiger Aktivierung der Phosphofruktokinase. Dies hat eine reduzierte Dephosphorylierung von D-Fructose-1,6-bisphosphat und eine vermehrte Phosphorylierung von D-Fructose-6-phosphat zur Folge, was wiederum zu einem verminderten Saccharoseaufbau führt (Huber 1986, Mertens 1991). Ein Zusatz an D-Fructose-2,6-bisphosphat könnte daher zu einer erhöhten Konzentration an D-Fructose-1,6-bisphosphat und folglich zu einer vermehrten DMHF-Biosynthese führen. Der Einfluss von D-Fructose-2,6-bisphosphat auf die DMHF-Bildung wurde durch Co-Applikation mit D-[6,6-²H₂]Fructose untersucht. Ebenso sollte geprüft werden, ob 1,6-Dichloro-1,6-didesoxyfructose als Struktur analogon die Metabolisierung von D-[6,6-²H₂]Fructose beeinflussen kann. In beiden Fällen wurden 15 mg der D-[6,6-²H₂]Fructose zusammen mit 0,1 mg Fructose-2,6-bisphosphat bzw. 11,3 mg 1,6-Dichloro-1,6-didesoxyfructose in Erdbeeren inkubiert. Als Positivkontrolle diente die gleiche Menge an D-[6,6-²H₂]Fructose ohne weiteren Zusatz.

Tab. 6 Markierungsgrad [M+2] von DMHF und DMMF nach Applikation von 15 mg D-[6,6-²H₂]Fructose mit verschiedenen Zusätzen.

Zusatz	DMHF	DMMF
Kontrolle	1,2 % ± 1,0 %	1,0 % ± 0,3 %
11,3 mg 1,6-Dichloro-1,6-didesoxyfructose	4,7 % ± 1,2 %	3,3 % ± 0,5 %
0,1 mg D-Fructose-2,6-bisphosphat	23,5 % ± 4,1 %	15,2 % ± 3,4 %
ohne weiteren Zusatz	34,6 % ± 7,9 %	24,5 % ± 6,6 %

Die in Tab. 6 dargestellten Markierungsgrade der [M+2]-Isotopomere verdeutlichen, dass sowohl der Zusatz von Fructose-2,6-bisphosphat als auch von 1,6-Dichloro-1,6-didesoxyfructose einen geringeren Einbau von D-[6,6-²H₂]Fructose zur Folge hatte. D-Fructose-2,6-bisphosphat kann aufgrund seiner regulatorischen Eigenschaften generell Einfluss auf die DMHF-Biosynthese ausüben. Nach Zugabe des Regulators könnte eine verstärkte Glykolyse eingetreten sein, was einen Anstieg an intermediär gebildeter D-Fructose-1,6-bisphosphat nach sich zieht. Daher besteht die Möglichkeit, dass das zugegebene markierte Substrat durch pflanzeigene Glykolyseintermediate verdünnt wurde, was einen verringerten Markierungsgrad zur Folge hatte. Der Zusatz von 1,6-Dichloro-1,6-didesoxyfructose hingegen unterband die Metabolisierung der D-[6,6-²H₂]Fructose nahezu vollständig, da nur mehr ein Zehntel des Markierungsgrads der

Positivkontrolle erreicht werden konnte. 1,6-Dichloro-1,6-didesoxyfructose könnte aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu D-Fructose-1,6-bisphosphat als kompetitiver Inhibitor wirken und somit die Metabolisierung zu DMHF und DMMF unterbinden. In tierischen Spermazellen inhibiert 1,6-Dichloro-1,6-didesoxyfructose effektiv Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase und wird selber geringfügig von Aldolase als Substrat akzeptiert (Jones und Morin 1995). Wenn diese Eigenschaften auch in pflanzlichen Zellen auftreten, hätten diese vermutlich eine beachtliche Störung der Glykolyse zur Folge. Die letztgenannten Ergebnisse heben die enorme Bedeutung des Kohlenhydratstoffwechsels und ganz besonders des D-Fructose-1,6-bisphosphats bei der Biosynthese von DMHF und DMMF hervor.

1.3 Zusammenfassung und Diskussion

Im Gegensatz zu vielen anderen pflanzlichen Aromastoffen (Ester, Terpene, Aldehyde) finden Hydroxyfuranone ihren Ursprung im Kohlenhydratstoffwechsel. In der hier durchgeführten Studie sollten mit Hilfe von stabil markierten Substraten neue Erkenntnisse über die Biosynthese von DMHF und dessen Metabolite gewonnen werden. Durch positionsspezifische Markierungen wurden neue Informationen bezüglich der bevorzugten Prekursoren und des metabolischen Verlaufs erarbeitet.

Nach Einsatz von verschiedenen stabil markierten Monosacchariden konnten D-Glucose und D-Fructose als effektive Vorläufer für DMHF und DMMF festgestellt werden. In Einklang mit kürzlich durchgeführten Markierungsversuchen (Roscher und Mitarbeiter 1998) wurde D-Fructose gegenüber D-Glucose wesentlich effizienter in die Zielverbindungen eingebaut. Aufgrund der Isotopenverhältnisse nach Applikation von D-[2-²H]Glucose und Co-Applikation von D-Fructose-2,6-bisphosphat kann eine Beteiligung der Enzyme Glucosephosphatisomerase und Fructose-1,6-bisphosphatase bzw. Phosphofruktokinase vermutet werden, die Kernelemente des Kohlenhydratstoffwechsels und vor allem der Glykolyse darstellen.

Unter Berücksichtigung der von Roscher (1998) publizierten Ergebnisse lässt sich somit der in Abb. 19 dargestellte Biosyntheseweg für DMHF und seine Metabolite annehmen, wobei die ersten enzymatischen Schritte denen der Glykolyse entsprechen. Der bevorzugte Einbau von D-Fructose ließe sich durch eine direkte Phosphorylierung erklären, was das Vorhandensein einer D-Fructose-6-phosphotransferase (E.C. 2.7.1.4) voraussetzt. Aus Tomaten (*Lycopersicon esculentum* Mill.) wurde kürzlich ein Vertreter dieser Enzymklasse isoliert, der mit Ausnahme der Blätter in der ganzen Pflanze detektiert werden konnte. Die höchste Konzentration an mRNA Transkripten wurden in der jungen Frucht und im Wurzelgewebe detektiert, wohingegen die höchste Enzymaktivität in der wachsenden Frucht ermittelt wurde (Martinez-Barajas und Mitarbeiter 1997).

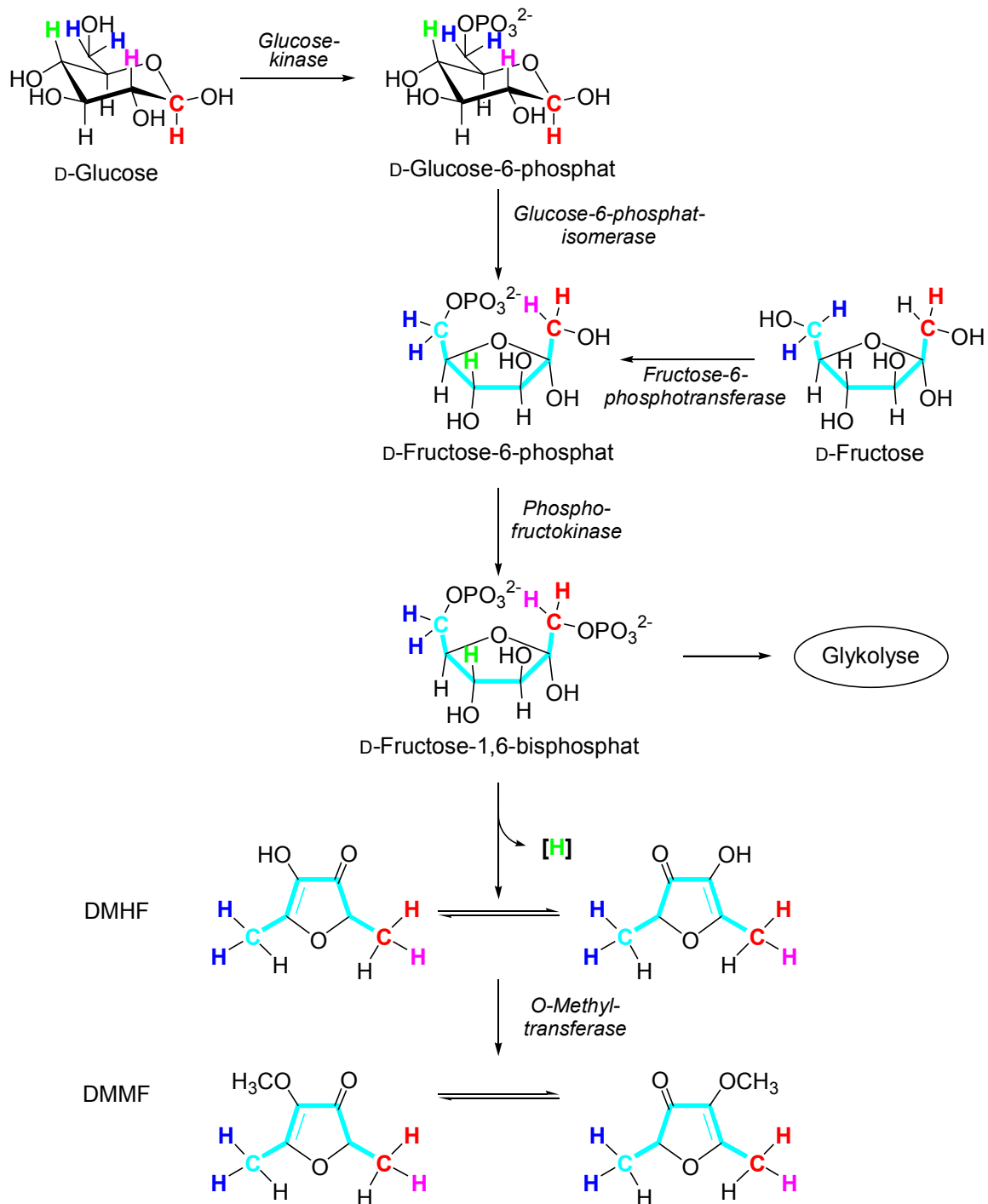


Abb. 19 Postulierter Biosyntheseweg von DMHF und DMMF. Farblich skizziert sind die Positionen, die isotopenmarkiert eingesetzt wurden. Der mögliche Verlauf der einzelnen Isotope bis in die Zielmoleküle ist in den selben Farben dargestellt.

Nach Applikation von uniform markierter D-Fructose konnte die intakte Kohlenstoffkette in den Zielsubstanzen wiedergefunden werden. D-Fructose muss daher direkt und ohne vorherige Spaltung in C_3 -Fragmente zu den Hydroxyfuranonen metabolisiert werden und somit den in der Glykolyse üblichen Fortgang unterbrechen. Sowohl Einfachmarkierungen (2H und ^{13}C) an Position C-1 als auch Zweifachmarkierungen (2H_2) an Position C-6 blieben erhalten und konnten in den entsprechenden C-Methylgruppen von DMHF und DMMF detektiert werden. Von D-Glucose ausgehend wurde zudem ein Protonen-Shift von C-2 nach C-1 beobachtet, da sich auch

nach Applikation von an Position C-2 deuterierter D-Glucose eine Markierung in den C-Methylgruppen von DMHF und DMMF nachweisen ließ.

Im Unterschied zu Studien mit Erdbeer-Kalluskulturen (Zabetakis und Holden 1996, Zabetakis und Mitarbeiter 1999) konnte in intakten Erdbeeren kein Einbau von Desoxyzuckern in die Hydroxyfuranone festgestellt werden. Weder 6-Desoxy-D-fructose und 1-Desoxy-D-fructose noch 6-Desoxy-D-fructose-1-phosphat konnten als Vorläufer von DMHF identifiziert werden. Unter der Voraussetzung, dass diese Verbindungen bei den gewählten Versuchsbedingungen in das Zellinnere transportiert werden, können sie als Zwischenprodukte bei der DMHF-Biosynthese ausgeschlossen werden. Ein weiterer Hinweis auf die Nichtbeteiligung von 6-Desoxyhexosen konnte durch die Anwendung von D-[4-²H]Glucose gewonnen werden. Der Einbau dieser Markierung würde auf einen in Pflanzen üblichen C-6-Desoxygenierungsmechanismus hindeuten. Da aber das Proton von Position C-4 im Laufe der DMHF-Biosynthese vollständig abgespalten wurde, ist eine Beteiligung dieses Mechanismus unwahrscheinlich.

In den hier präsentierten Studien konnte der Einbau der markierten Substrate sowohl in DMHF als auch in DMMF nachgewiesen werden, wobei DMHF meist in einem höheren Maße markiert vorlag. Nur in wenigen Fällen erreichte der Markierungsgrad von DMMF das Niveau des Hydroxyfuranons. Diese Befunde lassen auf einen weiteren enzymatischen Schritt schließen, der DMHF in DMMF überführt. Diese Hypothese steht im Einklang mit Untersuchungen zur zeitlichen Bildung von DMHF und DMMF, bei der festgestellt wurde, dass sortenunabhängig zuerst DMHF gebildet wird und erst nach Erreichen höherer Konzentrationen auch das Methoxyderivat detektiert werden kann (Pérez und Mitarbeiter 1996). Die Metabolisierung von DMHF zu DMMF müsste daher auf eine *O*-Methyltransferase-Aktivität zurückzuführen sein. Diese These wird durch die Untersuchungen von Roscher und Mitarbeiter (1997) bestätigt, da diese die direkte Methylierung von DMHF durch eine SAM-abhängige enzymatische Reaktion nachweisen konnten.

2 Isolierung und Charakterisierung einer *O*-Methyltransferase aus Erdbeeren

2.1 Strategie

Bislang existierten keinerlei Kenntnisse über *O*-Methyltransferasen, die in der Lage sind, Furan-ähnliche Verbindungen zu methylieren. In dieser Arbeit sollten daher Gene, die OMTs kodieren, aus Erdbeeren isoliert werden, um diese heterolog zu exprimieren und die so erhaltenen Proteine auf ihre enzymatische Aktivität hin zu untersuchen. Primäres Ziel war die Isolierung einer OMT, die DMHF als Substrat akzeptiert und in das entsprechende Methoxyderivat überführt. Ausgehend von den Sequenzhomologien im Bereich der SAM-Bindungsstellen wurden degenerierte Primer für die Isolierung gewählt, mit deren Hilfe bereits aus *Thalictrum tuberosum* (Wiesenraute) multifunktionelle OMTs (Thatu 1-4) isoliert werden konnten (Frick und Kutchan 1999). Die Primer basieren auf der Aminosäure-Sequenz einer Lignin-spezifischen OMT (Ptomt1, Acc. X62096) aus *Populus tremuloides* (Zitterpappel) und liegen sowohl in einem homologen SAM-Bereich (MTs I) als auch in SAM-unspezifischen konservierten Regionen (MTas II und MTas IV).

Sense-Primer:

MTs I: 5'-GTI-GAC/T-GTI-GGI-GGI-GGI-ACI-GGI-GC-3'

Antisense-Primer:

MTas II: 5'-GGI-GCA/G-TCC/T-TCI-ATI-ACA/G-TGI-GG-3'

MTas IV: 5'-CAG/A-TGI-T/GCG/A-TCI-C/GIC-CAG/A-TCG/A-TG-3'

(mit I = Inosin)

Bei Expressions-Studien mit rekombinanten Proteinen ausgehend von Ptomt1 oder den vier Thatu-OMTs konnte 5-Hydroxyferulasäure bzw. Kaffeesäure als Substrat festgestellt werden (Bugos und Mitarbeiter 1991, Frick und Kutchan 1999). Auch wenn Kaffee- oder 5-Hydroxyferulasäure auf den ersten Blick kaum strukturelle Ähnlichkeit zu DMHF besitzen, so lassen sich doch Gemeinsamkeiten finden, die die Verwendung von COMT spezifischen Primern rechtfertigen. Sowohl Kaffee- und 5-Hydroxyferulasäure als auch nahezu alle von Frick und Kutchan (1999) getesteten Substrate verfügen über ein aromatisches Ringsystem mit zwei benachbarten OH-Gruppen. Legt man nun das dienolische Tautomer von DMHF zugrunde, so lassen sich auch hier die eben beschriebenen Strukturelemente erkennen (Abb. 20). In der Dienol-Form liegt ein heterocyclisches System mit aromatischem Charakter und zwei vicinalen Hydroxygruppen vor.

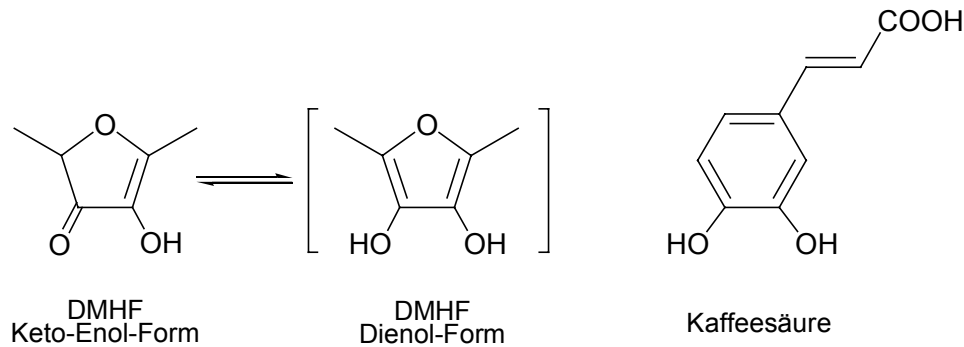


Abb. 20 Strukturähnlichkeit von DMHF (in der Dienol-Form) zu Kaffeesäure.

2.2 Erstellen einer cDNA-Bibliothek aus Erdbeeren (*Fragaria ananassa* cv. Elsanta)

Das eukaryotische Genom besteht nur zu einem Bruchteil aus DNA-Abschnitten, die die genetische Information für Proteine tragen. Die jeweilige DNA wird vor der Proteinbiosynthese in eine einzelsträngige Messenger-RNA (mRNA) transkribiert. Daher beschränkten sich die vorliegenden Untersuchungen auf diese Nukleinsäure-Spezies, die sich aber durch eine ausgeprägte Instabilität auszeichnet. Aus diesem Grund musste zunächst eine komplementäre DNA-Kopie (cDNA) der mRNA-Population hergestellt werden.

DMMF wird erst in der letzten Phase der Fruchtreifung gebildet, weshalb eine verstärkte Transkription des entsprechenden Gens in diesem Reifestadium zu erwarten ist (vgl. Abb. 3). Als Ausgangsmaterial zur Erstellung der cDNA-Bibliothek wurde daher mRNA aus rot-werdenden Erdbeeren verwendet. Aliquote der Erst- und Zweitstrangsynthese wurden entnommen und in Gegenwart von $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ umgesetzt, was eine qualitative Kontrolle der cDNA-Synthese ermöglichte. Nach Auftrennung der markierten Syntheseprodukte im Agarosegel und anschließender Autoradiographie ließ sich eine Größenverteilung von 0,7 bis 4,0 kb für die synthetisierten cDNA-Produkte feststellen (Abb. 21).

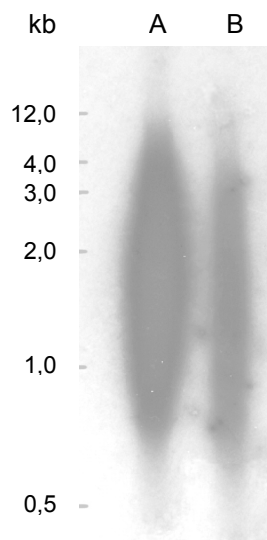


Abb. 21 Autoradiographie der Erst (A)- und Zweitstrangsynthese (B) nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel. Der Größenstandard wurde nach Einlagerung von Ethidiumbromid unter UV sichtbar gemacht und markiert.

Die cDNA wurde nun mit den Lambda ZAP[®]II-Phagenarmen (Uni-ZAP XR Vektor; Stratagene, La Jolla, USA) ligiert und durch *in vitro* Verpackung in funktionstüchtige Phagen überführt. Das Gesamtvolumen der cDNA-Bibliothek betrug ein Milliliter mit 50000 Primärphagen. Zur Überprüfung des rekombinanten Anteils in der Phagenpopulation wurden zehn willkürlich gewählte Einzelplaques ausgestochen und in SM-Puffer suspendiert. Durch PCR mit den Primern T3 und T7, die die Insertionsstelle flankieren, konnte die Größe der einzelnen Insertionen ermittelt werden. Wie aus Abb. 22 ersichtlich ist, waren alle getesteten Phagen rekombinant, wobei die Insertionslängen von ca. 800 bis 2000 bp variierten. Nach Infektion des Wirtsstammes *E. coli* (XL1-Blue MRF[']) mit 600 µl der Phagensuspension wurden die Phagen amplifiziert und in Phagenpuffer aufgenommen. Insgesamt standen somit 18 ml Suspension mit einem Phagentiter von $8,5 \times 10^9$ pfu/ml (Plaque-Forming Units pro ml Phagensuspension) zur Verfügung.

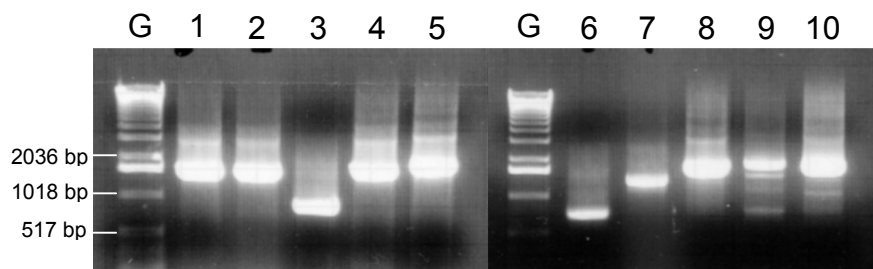


Abb. 22 Elektrophoretische Auftrennung der 10 PCR-Reaktionen von willkürlich gewählten Einzelplaques im Agarosegel. Als Größenstandard (G) diente die 1 kb-DNA-Leiter (Gibco-BRL, Eggenstein).

2.3 Isolierung von OMT-Sequenzen

Die Isolierung von OMT-Sequenzen sollte mittels PCR und den OMT-spezifischen Primern erfolgen. Hierfür wurde die amplifizierte cDNA-Bank in 18 Aliquote aufgeteilt und je ein Mikroliter einer PCR (Polymerase Kettenreaktion) mit den Primern MTs I und MTas IV unterzogen (siehe Kap. D 3.4.4 PCR-Programm: „cDNA-Kontrolle“). Ausgehend von der ursprünglichen *Ptomt1*-Sequenz war ein Fragment der Länge 213 bp zu erwarten (Bugos und Mitarbeiter 1991). In acht der 18 Aliquote konnte nach gelelektrophoretischer Auftrennung eine Bande der Größenordnung 200 bp festgestellt werden. Durch erneut durchgeführte PCR-Reaktionen mit Verdünnungen der positiven Aliquote sollte die Phagenanzahl so reduziert werden, dass nach Infektion des Wirtsstammes vereinzelte Plaques isoliert werden können. Da aber bereits nach der ersten Verdünnung (1:10) keine PCR-Produkte mehr detektierbar waren, musste die cDNA-Bibliothek mit einer OMT-spezifischen Sonde durchmustert werden. Diese wurde durch PCR mit den Primern MTs I und MTas II gewonnen und ergab ein Fragment der Länge 106 bp. Hierfür wurde ein Mikroliter der unverdünnten Phagensuspension (positives

Aliquot des vorhergehenden Tests) eingesetzt und die Reaktionsprodukte im 2 %igen Agarosegel aufgetrennt. Da neben einem Fragment der Größenordnung 100 bp noch eine weitere Bande mit ca. 50 bp auftrat, wurde das größere Fragment aus dem Gel geschnitten, von Gelresten gereinigt und in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO (Invitrogen, Groningen, Niederlande) kloniert. Die Insertionsstelle des Vektors wird von zwei *EcoRI* Schnittstellen umschlossen, so dass sich das Fragment durch Restriktion mit der Endonuklease *EcoRI* isolieren ließ. Die Sequenzierung des 106 bp langen Inserts ergab eine hohe Homologie zu einigen in der Genbank publizierten pflanzlichen COMTs (93 % Identität zu *PACOMT1* aus *Prunus amygdalus*, Acc. Q43609; 90 % zu *VPMTRGENE* aus *Vanilla planifolia*, Acc. CAA48938), weshalb das Fragment als OMT-spezifische Sonde eingesetzt werden konnte.

Zum Durchmustern der cDNA-Bibliothek wurden sechs Platten mit dem *E. coli* Wirtstamm (XL1-Blue MRF[']) inokuliert und mit mindestens 50000 pfu pro Platte infiziert. Nach Ausbildung der Plaques im Bakterienrasen wurden die Phagenpartikel durch Auflegen von Nylonmembranen übertragen. Durch Inkubation der Membran in alkalischer Lösung wurden die Phagen lysiert und die freigesetzte DNA denaturiert, die dann mit der [α -³²P]dCTP-markierten Sonde hybridisiert wurde. Plaques, die im Autoradiogramm ein positives Signal ergaben, wurden ausgestochen und in Phagenpuffer resuspendiert. Aliquote der 44 neuen Phagen-Pools wurden erneut auf Platten mit vorbereiteten Bakterienrasen aufgetragen, um die Plaques zu vereinzeln. Phagen, die ein entsprechendes Insert aufwiesen, wurden nach dem oben beschriebenen Hybridisierungsverfahren ermittelt und einem erneuten Vereinzelnungsverfahren unterzogen. Auf diese Weise konnten 25 Phagen-Suspensionen gewonnen werden, aus denen das pBluescript SK Phagemid freigesetzt wurde („*in vivo* Exzision“). Durch Behandlung mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XhoI* wurden die Phagemide auf Insertionen überprüft und gleichzeitig deren Größe festgestellt. Der Großteil der Phagemide, die entsprechend der zu erwartenden Klone als MT 1 - 25 bezeichnet wurden, enthielten cDNA-Insertionen der Größe 1,2 bis 1,6 kb, wohingegen 3 Klone (MT 3, 6 und 18) eine Länge von etwa 2 kb aufwiesen. Die Klone wurden entsprechend ihrer Größe gruppiert und jeweils zwei Vertreter jeder Größenordnung vom 5'- und 3'-Ende ausgehend sequenziert. Klon MT 16 mit einer Länge von 1,2 kb zeigte Homologie zu einem Expansin-Gen und wurde nicht weiter berücksichtigt. Alle anderen Klone wiesen vom 5'-Ende her, wenn auch mit unterschiedlicher Länge, eine identische Sequenz auf, was ein übereinstimmendes offenes Leseraster von 1098 bp mit einschließt. Lediglich die knapp 2 kb langen Klone unterschieden sich von den restlichen Klonen, da sie am 3'-Ende über etwa 500 zusätzliche Basenpaare verfügten, die aber kein weiteres Leseraster ergeben.

Um zu klären, ob beide Transkriptlängen ursprünglich in Erdbeeren vorkommen, wurde ein Northern-Blot mit RNA, die zur Erstellung der cDNA-Bibliothek verwendet wurde, durchgeführt. Als Sonde wurde eines der kürzeren Fragmente, Klon MT 4, eingesetzt.

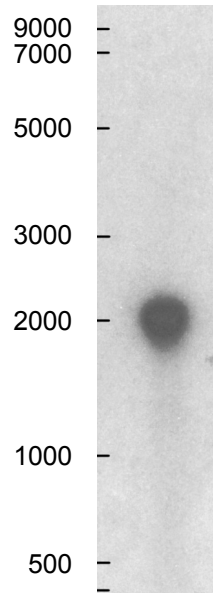


Abb. 23 Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA aus reif-werdenden Erdbeeren. Autoradiographie der Hybridisierung mit der MT 4-Sonde. Der RNA-Größenstandard (RNA-Leiter; BioLabs, USA) wurde durch Einlagerung von Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht und markiert.

In Abb. 23 ist das Autoradiogramm des Blots abgebildet, aus dem ersichtlich wird, dass ausschließlich das längere Transkript mit einer Länge von ca. 2 kb ursprünglich als mRNA vorhanden ist. Daher wurden alle weiteren Untersuchungen mit dem längsten Klon, MT 3 vorgenommen, der im Folgenden als *STOMT* (Strawberry O-Methyltransferase) bezeichnet wird. Die vollständige Nukleotidsequenz und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz ist in Abb. 24 dargestellt. Diese cDNA weist eine Länge von 1876 bp auf, mit einem offenen Leseraster (ORF, open reading frame) von 1098 bp (Position 106 bis 1203) (Abb. 25). Dies entspricht einem Polypeptid von 365 Aminosäuren und einem errechneten Molekulargewicht von 39,817 kDa.

Abb. 24 Vollständige Nukleinsäuresequenz mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz von *STOMT*. Fett dargestellt sind der Translationsstartpunkt (ATG) und das Stopp-Codon (TGA). Fett-kursiv sind die drei SAM-Bindungsstellen (Motiv A, B und C) nach Joshi und Chiang (1998).

1	CTCGTGCCGA	ATTCCGGCAG	AGGTCTTCTC	TGTCCTCTAG	CTCTATCTAG	CACTACCTCA		
61	TCACTCTTCT	ACATCATCTT	CACAAACCCCT	GCAACTTAAC	CCAAAATGGG	TTCCACCGGC		
					M G	S T G		5
121	GAGACTCAGA	TGACTCCGAC	CCATGTCTCC	GACGAGGAAG	CCAACCTCTT	CGCCATGCAA		
	E T Q	M T P T	H V S	D E E	A N L F	A M Q		25
181	CTCGCCAGCG	CCTCCGTCCT	CCCCATGGTC	CTCAAAGCCG	CCATCGAGCT	CGACCTCTTG		
	L A S	A S V L	P M V	L K A	A I E L	D L L		45
241	GAGATCATGG	CCAAGGCCGG	ACCCGGCTCT	TTCTCTCCC	CTAGTGATCT	AGCCTCTCAG		
	E I M	A K A G	P G S	F L S	P S D L	A S Q		65
301	CTTCCGACCA	AGAACCCCGA	AGCTCCGGTC	ATGCTCGACC	GTATGCTTCG	CCTTCTGGCC		
	L P T	K N P E	A P V	M L D	R M L R	L L A		85
361	AGCTACTCCA	TTCTAACCTG	CTCATTGCGT	ACGCTTCCGG	ACGGCAAAGT	TGAGAGGCTC		
	S Y S	I L T C	S L R	T L P	D G K V	E R L		105
421	TACTGTTTGG	GACCTGTGTG	TAAGTTCTTG	ACCAAGAATG	AAGATGGCGT	CTCTATTGCT		
	Y C L	G P V C	K F L	T K N	E D G V	S I A		125
481	GCTCTCTGCC	TCATGAACCA	GGACAAGGTC	CTCGTCGAGA	GCTGGTATCA	TTTGAAGGAT		
	A L C	L M N Q	D K V	L V E	S W Y H	L K D		145
541	GCAGTTCTTG	ATGGTGGGAT	TCCATTTAAC	AAGGCCTATG	GCATGACTGC	ATTTGATTAC		
	A V L	D G G I	P F N	K A Y	G M T A	F D Y		165
601	CATGGAACTG	ACCCTAGATT	CAACAAGGTC	TTCAACAAGG	GAATGGCTGA	CCACTCCACC		
	H G T	D P R F	N K V	F N K	G M A D	H S T		185
661	ATTACCATGA	AGAAAATCCT	TGAGACTTAC	AAAGGCTTCG	AGGGCCTCAA	ATCCATCGTT		
	I T M	K K I L	E T Y	K G F	E G L K	S I V		205
721	GATGTCGGTG	GCGGCACCGG	AGCTGTGGTG	AACATGATCG	TTTCCAAGTA	CCCTTCGATC		
	D V G	G G T G	A V V	N M I	V S K Y	P S I		225
781	AAGGGCATCA	ACTTCGACTT	GCCTCATGTT	ATCGAAGATG	CTCCTCAATA	TCCTGGTGTT		
	K G I	N F D L	P H V	I E D	A P Q Y	P G V		245
841	CAACACGTTG	GAGGGGACAT	GTTTGTAAGT	GTACCAAAGG	GAAATGCAAT	TTTCATGAAG		
	Q H V	G G D M	F V S	V P K	G N A I	F M K		265
901	TGGATATGTC	ACGACTGGAG	TGACGAGCAT	TGCATAAAAT	TCTTGAAGAA	CTGCTACGCT		
	W I C	H D W S	D E H	C I K	F L K N	C Y A		285
961	GCGCTTCCAG	ACGATGGCAA	AGTGATTCTT	GCTGAGTGCA	TTCTTCCTGT	TGCACCAGAC		
	A L P	D D G K	V I L	A E C	I L P V	A P D		305
1021	ACTAGCCTTG	CCACCAAGGG	AGTTGTCCAT	ATGGATGTGA	TCATGTTGGC	GCACAACCCT		
	T S L	A T K G	V V H	M D V	I M L A	H N P		325
1081	GGCGGCAAAG	AGAGGACGGA	GCAGGAATTT	GAAGCCCTGG	CTAAGGGTTC	TGGATTCCAA		
	G G K	E R T E	Q E F	E A L	A K G S	G F Q		345
1141	GGCATTGCGG	TCTGCTGTGA	TGCTTTCAAC	ACCTATGTCA	TTGAGTTTCT	TAAGAAGATC		
	G I R	V C C D	A F N	T Y V	I E F L	K K I		365
1201	TGAGT ACTAG	CTACTTGGCT	TAGTTGGATT	TTGGATGCTG	TCATATGCAT	GCTTTGAATT		
	*							
1261	TGGTTTTTGA	GATGCTGTGC	TGATCTATCT	GCCAGCATGT	GGAATTTGCA	CCATATGTAC		
1321	ATTTTAATTG	AATAAAAAAG	AAATAAGAGA	CTGGTCTTGG	TTTTGCCACA	CAGGCAGTTA		
1381	CCAACCTCTT	CTTCTTCTTT	TACTATCTGT	TTCTAAGTAT	GGGTGCAGCA	ACCTGCGTCG		
1441	ACATCATCAT	CGCCATCCTC	TTGCCTCCTC	TTGGGGTCTT	CCTCAGGTTT	GGCTGCGGGG		
1501	TGGAGTTCTG	GATCTGTTGA	TTTTGACTCT	TTGTGGTTAC	CTTCCTGGGA	TCATCTATGC		
1561	TATCTGGGCC	ATCACCAAGT	GATGATCAGC	CACTCGTACT	TCATTTTCTG	TGGTTCGTACA		
1621	GATGTGAAGG	GCACATAAGG	CCTATGTAGT	TTTCACCGTT	GGATTGCATA	GTACTTTGTT		
1681	TGGTGTTAGC	CAATAATGTA	GTGCGTCGTT	TCTCCTTTGT	ATTTAGTTCA	TTGTGTTTCC		
1741	CTATCTTGTC	TATCTCTTGT	GACGGGTGGG	TGGGGTTTTG	GTTGGTATTA	TGGATTAATG		
1801	TCTCTTTAAA	CATTGATAAT	TTATTTAATT	ATTCTCAATG	TGGATTTGAT	TTAATTTTCA		
1861	AAAAAAAAAAAAAAAA							

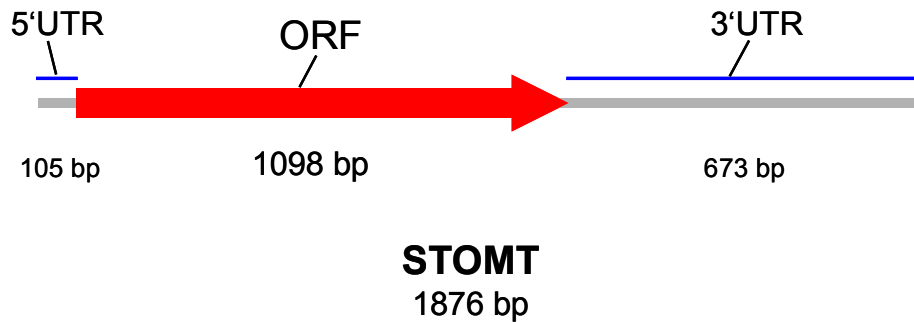


Abb. 25 Struktur der *STOMT*-cDNA mit der kodierenden Region (ORF) und den nichttranslatierten Bereichen (UTR).

Durch die Adenosin-reiche Region von Position 1331 bis 1350 mit einem Adenosinanteil von 75 % lässt sich die Entstehung der kleineren cDNA-Fragmente erklären, die als Klonierungsartefakte anzusehen sind und vermutlich während der Erststrangsynthese aufgrund des Bindungsvermögens des polyT-Primers entstanden sind.

Durch Vergleiche mit in der Genbank veröffentlichten Sequenzen (Blast-Search, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) konnten hohe Homologien zu pflanzlichen Kaffeesäure-OMTs festgestellt werden (Abb. 26). So zeigt STOMT 91 % Identität auf Proteinebene zu COMT PRUDU (Acc. Q43609) aus *Prunus amygdalus*. Ebenfalls hohe Ähnlichkeiten von STOMT lassen sich zu zahlreichen Vertretern der Familie der Weidengewächse (*Salicaceae*) feststellen, mit 87 % Identität zu COMT POPTM (Acc. Q00763) aus *Populus tremuloides* und je 86 % Identität zu HOMT1 (Acc. BAA08558) aus *Populus kitakamiensis*, POPOME (Acc. AAF60951) aus *Populus balsamifera* und COMT (Acc. AAF63200) aus *Populus tomentosa*. Auch wenn alle genannten Proteine als Kaffeesäure-OMTs bezeichnet werden, ist lediglich bei COMT POPTM die Funktionalität überprüft worden. Das rekombinante Protein wurde auf Aktivität gegenüber Kaffeesäure und 5-Hydroxyferulasäure getestet. Beide Substrate wurden umgesetzt, wobei mit 5-Hydroxyferulasäure eine höhere Methylierungsrate festgestellt werden konnte.

STOMT	MGSTGETQMT	PTHVSDEEAN	LFAMQLASAS	VLPMVLKAAI	ELDLLEIMAK	AGPGSFLSPS	60
COMT PRUDUQ.....V...T	
COMT POPTMQ.....HI..T..A...T.	
HOMT1Q.....HI..T..A...T.	
COMTQ.....HI..T..A...T.	
POPOMEQ.....HI..T..A...T.	
STOMT	DLASQLPTKN	PEAPVMLDRM	LRLLASYSIL	TCSLRTLDPG	KVERLYCLGP	VCKFLTKNED	120
COMT PRUDU	.I.....	.D.....Y...A..	...G.G.E	
COMT POPTM	EI..H....	.D.....IKD...	...G.A.	
HOMT1	EI..H....	.D.....IKD...	...G.A.	
COMT	EI..H....	.D.....IKD...	...G.A.	
POPOME	EI..H....	.D.....IKDH...	...G.A.	
STOMT	GVSIAALCLM	NQDKVLVESW	YHLKDAVLDG	GIPFNKAYGM	TAFDYHGTD	RFNKVFNKGM	180
COMT PRUDUP....L...LE.E.....R..	
COMT POPTM	...VSP...M...	.Y...I...E.....	
HOMT1	...VSP...M...	.Y...I.E.E.....	
COMT	...VSP...M...	.Y...I.E.E.....	
POPOME	...VSP...M...	.Y...I...E.....	
STOMT	ADHSTITMCK	ILETYKGFEG	LKSIVDVGGG	TGAVVNMIVS	KYPSIRGINF	DLPHVIEDAP	240
COMT PRUDUT.V.....	...L.....	
COMT POPTM	S.....T.L.....	...T.....	
HOMT1	S.....T.L.....	...T.....	
COMT	S.....T.L.....	...T.....	
POPOME	S.....T.L.....	...T.....	
STOMT	QYPGVQHVGG	DMFVSVPKGN	AIFMKWICH	WSDEHCIFL	KNCYAALPDD	GKVILAECIL	300
COMT PRUDUE....DL...	...N	...G...	
COMT POPTM	S...E...AD	.V.....	...A..L...	...D..EN	...V...	
HOMT1	S...E...NAD	.V.....	...A..L...	...D..EN	...V...	
COMT	S...E...AD	.V.....	...A..L...	...D..EN	...V...	
POPOME	S...E...AD	.V.....	...A..L...	...D..EN	...V...	
STOMT	PVAPDTSLAT	KGVVHMDVIM	LAHNPGGKER	TEQEFEALAK	GSGFQGIRVC	CDAFNITYVIE	360
COMT PRUDUS....I....Q....	.A...FN.A	.S.....	
COMT POPTMV...K...G...	.A...FE.M	.C...H...	
HOMT1V...K...G..N	.A...FE.M	.C...H...	
COMTV...K...G..N	.A...FE.M	.C...H...	
POPOMEI....K...G...	.A...FE.M	.C...H...	
STOMT	FLKKI	365					
COMT PRUDU	...N	365					
COMT POPTM	.R..A	365					
HOMT1	.R..A	365					
COMT	-----	360					
POPOME	LR.N-	364					

Abb. 26 Sequenzvergleich von STOMT zu fünf pflanzlichen OMT-Sequenzen. (COMT PRUDU aus *Prunus amygdalus*, Acc. Q43609; COMT POPTM aus *Populus tremuloides*, Acc. Q00763; HOMT1 aus *Populus kitakamiensis*, Acc. BAA08558; COMT aus *Populus tomentosa*, Acc. AAF63200 und POPOME aus *Populus balsamifera*). Identische Aminosäuren sind mit einem Punkt gekennzeichnet.

2.4 Gewebespezifische Expression von STOMT

Die Analyse der gewebespezifischen Expression von STOMT sollte einen ersten Anhaltspunkt über die Funktion des vermeintlichen Proteins geben. Hierfür wurde Gesamt-RNA aus verschiedenen Teilen der Erdbeerpflanze (Wurzel, Blätter, Stängel und Blüte) aber auch aus Früchten verschiedener Reifestadien (grün, weiß, rot-werdend und reif) isoliert. Als grüne Frucht wird der größer-werdende Blütenboden kurz nach dem Abfallen der Blütenblätter bezeichnet, wohingegen die weiße Frucht bereits deutlich an Volumen zugenommen hat, aber noch keine roten Pigmente aufweist. Jeweils 10 µg der RNA wurde in einem MEN-Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Der Abgleich der RNA erfolgte optisch durch die Intensität der Fluoreszenz von eingelagertem Ethidiumbromid unter UV-Licht. Als Sonde wurde die markierte cDNA von Klon MT 4 eingesetzt, da das untranslatierte 3'-Ende von *STOMT* unspezifische Hybridisierungen einzugehen vermag. Die Sequenz von MT 4 umfasst beinahe ausschließlich die kodierende Region, da sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende nur wenige Basenpaare vor und hinter dem ORF vorhanden sind.

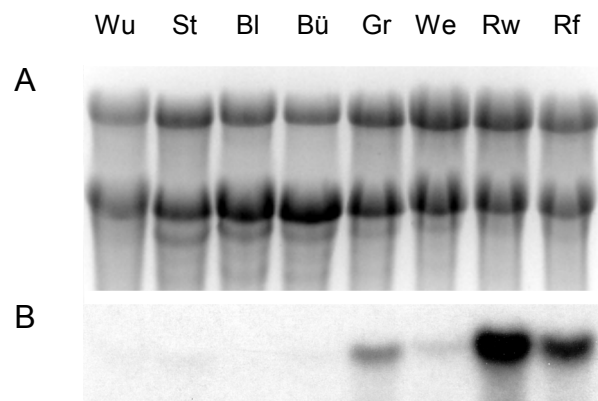


Abb. 27 Expressions-Analyse von *STOMT*-mRNA. A: Gelelektrophoretische Auftrennung von jeweils 10 µg Gesamt-RNA aus Wurzel (Wu), Stängel (St), Blatt (Bl), Blüte (Bü), grüner (Gr), weißer (We), rot-werdender (Rw) und reifer (Rf) Frucht. B: Zugehörige Autoradiographie nach Hybridisierung mit der MT 4-Sonde.

Wie aus Abb. 27 hervorgeht, erfolgt in der Wurzel, in grünen Geweben (Blätter und Stiel) und in der Blüte nahezu keine Expression von *STOMT*-mRNA. In den unterschiedlichen Reifestadien der Frucht hingegen lässt sich ein differenziertes Expressionsmuster erkennen. Zu Beginn der Fruchtreifung, wenn die Beere noch sehr klein und grün ist, ist eine geringe Expression von *STOMT*-mRNA festzustellen. Im nächsten Entwicklungsstadium, der weißen Frucht, sinken die Transkriptmengen auf ein sehr niedriges Niveau, die dann in der rot-werdenden Frucht ein Maximum erreichen. In der reifen Frucht wird *STOMT* ebenfalls stark exprimiert, doch im Vergleich zum vorhergehenden Reifestadium liegt eine geringere Konzentration an *STOMT*-mRNAs vor. Aus diesen Ergebnissen kann zweifelsohne geschlossen werden, dass *STOMT* fruchtspezifisch ist und während der Reifung induziert wird. Da es aber nicht möglich ist, nähere Informationen über die Funktionalität von *STOMT* aus den bisherigen Erkenntnissen zu ziehen,

wurde STOMT in *E. coli* Zellen exprimiert, um Aktivitätsbestimmungen mit dem rekombinanten Protein vorzunehmen.

2.5 Heterologe Expression von STOMT in *Escherichia coli*

Zur heterologen Expression des Methyltransferase-Proteins wurde das Expressionssystem mit dem Vektor pGEX-4T-2 (Pharmacia Biotech, Freiburg) gewählt. Dieser Vektor enthält die kodierende Sequenz einer Glutathion-S-transferase (GST), so dass nach erfolgreicher Expression ein GST-Fusionsprotein mit STOMT entsteht. Um die kodierende Sequenz in den Expressionsvektor zu klonieren, mussten unmittelbar vor dem Startcodon eine *Bam*HI-Schnittstelle und im Anschluss an das Stoppcodon eine *Xho*I-Schnittstelle inseriert werden. Beide Schnittstellen wurden durch PCR mit nachfolgenden Primern an die *STOMT*-Sequenz angefügt:

Sense-Primer MTs-BamH:

5'-A AAA GGA TCC **ATG** GGT TCC ACC GGC GAG AC-3'

*Bam*HI **Start** → ORF

Antisense-Primer MTas-Xho:

5'-A AAA CTC GAG CTA AGC CAA GTA GCT AGT ACT **CAG ATC TTC**-3'

*Xho*I

Stopp ← ORF

Das resultierende PCR-Produkt wurde in den pCR2.1-Vektor (Invitrogen; Groningen, Niederlande) kloniert, um anschließend die vollständige Restriktion mit den beiden Endonukleasen *Bam*HI und *Xho*I zu gewährleisten. Das so präparierte und gereinigte Fragment wurde mit dem linearisierten pGEX Vektor ligiert, wobei die kodierende Region der Methyltransferase sich direkt an die der Glutathion-S-transferase anschließt (pGEX-MT). Da beide Sequenzen im selben Leseraster liegen, entsteht bei der Expression ein Fusionsprotein aus GST und STOMT, wobei sich zwischen beiden Proteinsequenzen eine Schnittstelle für die Protease Thrombin befindet (Abb. 28). Zur einfacheren Überprüfung der resultierenden Sequenz wurde das Konstrukt zuerst in *E. coli* DH5 α -Zellen, anschließend in *E. coli* BL21-Zellen transformiert. Letztgenannte eignen sich besonders für heterologe Expressionen, da sie sich durch verminderte Proteaseaktivität auszeichnen und daher rekombinante Proteine nur in geringem Maße abbauen. Die Expression des Fusionsprotein wurde durch Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG) bei 16°C induziert, nachdem eine Mindestmenge an Zellen herangewachsen war. Die niedrige Expressionstemperatur war höheren Temperaturen (30°C und 37°C) vorzuziehen, da dadurch die Menge an verfügbarem Protein gesteigert werden konnte und dieses bedingt durch die langsamere Proteinsynthese in nativer und somit funktionell aktiver Konformation vorlag (Lilie und Mitarbeiter 1998).

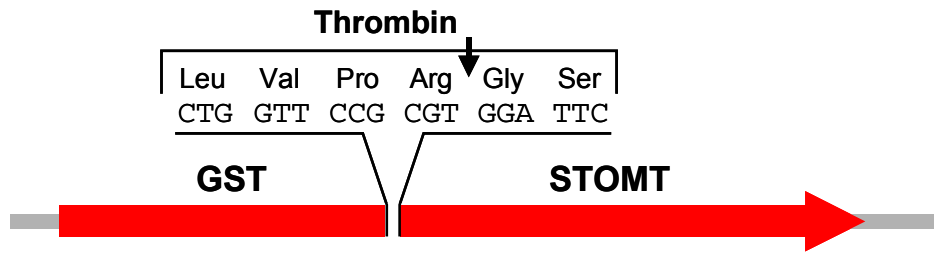


Abb. 28 Schematische Darstellung der kodierenden Region des Fusionsprotein. Die Thrombin-Spaltungsstelle ist mit einem Pfeil markiert.

Das Fusionsprotein lässt sich aufgrund der hohen Affinität der GST gegenüber Glutathion mittels GST-Affinitätschromatographie von den übrigen *E. coli* Proteinen abtrennen. Das rekombinante Protein wird an immobilisiertem Glutathion gebunden, wohingegen alle anderen Proteine in Lösung bleiben. Nach mehrmaligem Waschen lässt sich das Fusionsprotein durch Elution mit einer Glutathionlösung isolieren. Wie aus Abb. 29A ersichtlich ist, handelt es sich hierbei um ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 66 kDa, das sich aus der 26 kDa großen GST und der knapp 40 kDa großen STOMT zusammensetzt.

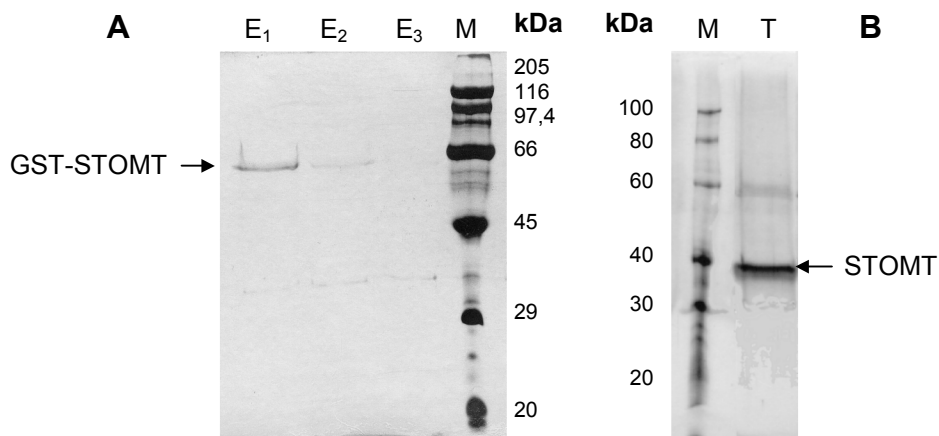


Abb. 29 SDS-PAGE Analytik des Fusionsproteins GST-STOMT (A) und der freien *O*-Methyltransferase STOMT (B). Die Proteine wurden durch Silberfärbung sichtbar gemacht. E₁ bis E₃: Glutathion-Eluat 1 bis 3, M: Molekulargewichtsmarker, T: Thrombin-Eluat.

Für Funktionsuntersuchungen war es jedoch nötig, die *O*-Methyltransferase von der GST abzuspalten, was durch Behandlung mit der Protease Thrombin bewerkstelligt wurde. Hierfür wurde das rekombinante Protein wie eben beschrieben von den restlichen Proteinen abgetrennt und mit Thrombin behandelt. Somit bleibt das GST-Protein weiterhin gebunden, wohingegen die *O*-Methyltransferase in Lösung geht. Die erfolgreiche Spaltung wurde durch SDS-PAGE Analytik kontrolliert und ist in Abb. 29B wiedergegeben. Das abgespaltene Protein weist, wie erwartet, ein Molekulargewicht von knapp 40 kDa auf und liegt in der resultierenden Lösung in einer Konzentration von 3 - 6 µg/100 µl vor. Diese Lösung konnte direkt für die folgenden Aktivitätsbestimmungen eingesetzt werden.

2.6 Aktivitätsbestimmung von STOMT

Zur Bestimmung der *O*-Methyltransferase-Aktivität wurde ein Radioassay unter Verwendung von *S*-Adenosyl-L-[*methyl*- ^{14}C]methionin (^{14}C -SAM) angewandt. Potentielle Substrate wurden der Proteinlösung zugesetzt und zusammen mit ^{14}C -SAM inkubiert. Durch ein funktionstüchtiges Enzym wurde die markierte CH_3 -Gruppe des SAM auf das Substrat übertragen. Da sich die Hydrophobizität der Substrate durch Bildung des Methylethers noch verstärkte, konnten die so entstandenen Produkte durch Einsatz organischer Lösungsmittel aus der wässrigen Phase isoliert werden, wohingegen restliches ^{14}C -SAM und dessen Folgeprodukt SAH in der polaren wässrigen Phase verblieben. Die organische Phase wurde anschließend im Szintillationszähler vermessen, wodurch sich die Umsatzrate des Enzyms ermitteln ließ. Bedingt durch das Extraktionsverfahren konnte auch ohne vorhandene Enzymaktivität eine geringe Menge an Radioaktivität in den organischen Phasen detektiert werden, welche bei der Auswertung der Messdaten als Blindwert berücksichtigt wurde.

Aufgrund der Sequenzhomologie von STOMT zu verschiedenen COMTs wurden erste Vorversuche mit Kaffeesäure vorgenommen, da eine erfolgreiche Umsetzung mit diesem Substrat zu erwarten war. Auf diese Weise wurden gleichzeitig die Reaktionsbedingungen ermittelt, die eine optimale Umsetzung versprachen. Zur Ermittlung des Temperaturoptimums wurde 1 mM Kaffeesäure jeweils 30 min bei 25, 30 und 37°C inkubiert. In Abb. 30 sind die blindwert-korrigierten Messergebnisse dargestellt. Die höchste Umsatzrate wurde wie bei vielen pflanzlichen Enzymen üblich bei 30°C erzielt, wohingegen bei 37°C eine nahezu vollständige Inaktivierung festgestellt werden konnte.

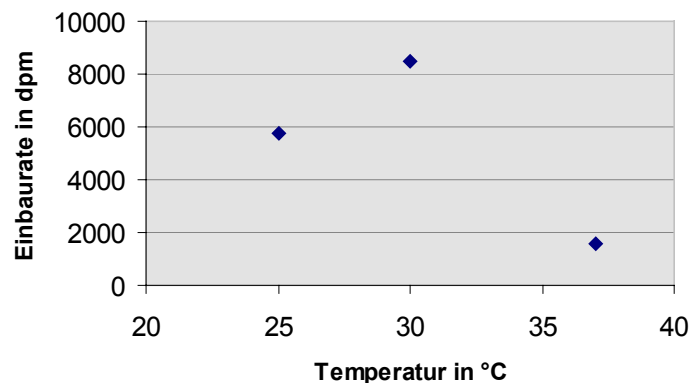


Abb. 30 Einbaureaten nach Inkubation von 1 mM Kaffeesäure mit $9,1 \mu\text{M}$ ^{14}C -SAM (55 mCi/mmol) für 30 min bei verschiedenen Temperaturen.

Zur kinetischen Charakterisierung von Enzymen ist es nötig, die Initialgeschwindigkeit der Umsetzung zu kennen. Enzymatische Reaktionen verlaufen anfänglich linear. Nach kurzer Zeit ist jedoch eine Abnahme der Umsetzungsgeschwindigkeit zu beobachten. Aus diesem Grund wurde der zeitliche Verlauf der enzymatischen Umsetzung untersucht, um einen Zeitpunkt zu bestimmen, an dem die Reaktion noch linear verläuft, aber dennoch so weit vorangeschritten ist, dass die Produktion einer ausreichend großen Menge an Methylderivaten gewährleistet ist.

Hierfür wurde 1 mM Kaffeesäure bei 30°C für 15 bis 120 min inkubiert. Wie Abb. 31 zu entnehmen ist, kann bis 30 min ein linearer Anstieg festgestellt werden. Erst nach 30 min ist ein deutliches Abflachen der Steigung zu erkennen. Alle folgenden enzymatischen Umsetzungen wurden daher 30 min inkubiert, um deutliche Unterschiede zu den Blindwerten zu erzielen.

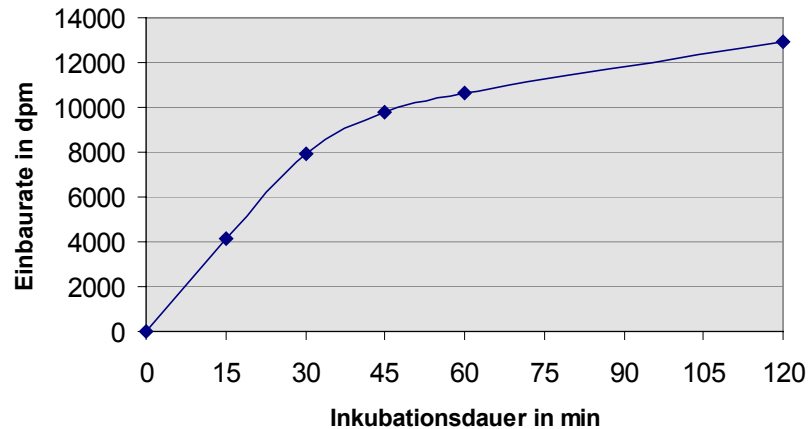


Abb. 31 Einbauraten nach Inkubation von 1 mM Kaffeesäure mit 9,1 μM ^{14}C -SAM (55 mCi/mmol) bei 30°C nach verschiedenen Zeitintervallen.

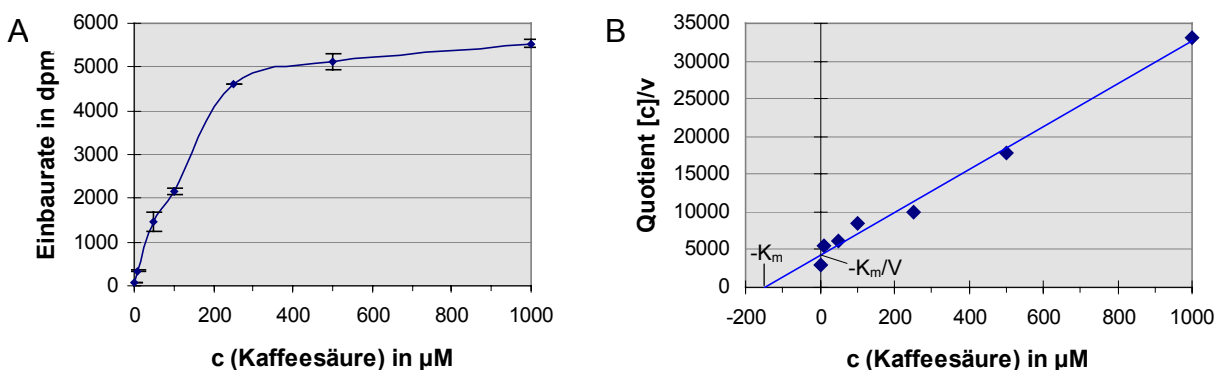


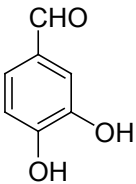
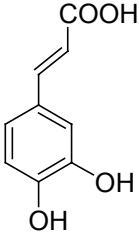
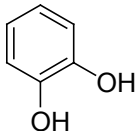
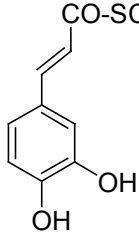
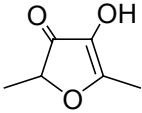
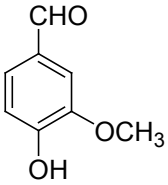
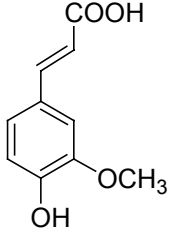
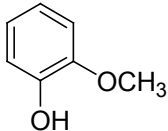
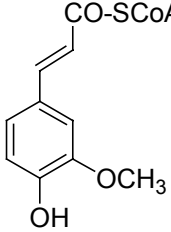
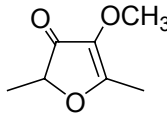
Abb. 32 Umsetzung mit Kaffeesäure. A: Einbauraten nach Inkubation verschiedener Kaffeesäure-Konzentrationen mit 9,1 μM ^{14}C -SAM (55 mCi/mmol) für 30 min. B: Auftragung der Umsetzungsgeschwindigkeit V und Substratkonzentration $[c]$ nach Hanes.

Um Einsicht in die funktionellen Eigenschaften von STOMT zu erlangen, wurde das rekombinante Protein bei optimalen Reaktionsbedingungen mit verschiedenen ortho-Diphenol-ähnlichen Substraten inkubiert. Einerseits wurden Verbindungen eingesetzt, die natürlicherweise in Erdbeeren vorkommen, wie etwa Kaffeesäure, Kaffeesäure-CoA-Ester und DMHF, aber auch Strukturanaloga, die bisher nicht in der Frucht detektiert wurden, wie Brenzcatechin oder 3,4-Dihydroxybenzaldehyd. Die Umsetzungsraten wurden für alle Substrate bei verschiedenen Konzentrationen ermittelt und die daraus resultierenden kinetischen Parameter bestimmt. Zur Überprüfung der enzymatischen Umsetzung wurden HPLC-Analysen der Produkte durchgeführt. Da bei allen Umsetzungen ^{14}C -SAM in konstanter Konzentration eingesetzt wurde, konnte die

Michaelis-Menten Gleichung herangezogen werden. Sie beschreibt Einsubstrat-Reaktionen und liefert die substratspezifischen Konstanten K_m und V_{max} . Die graphische Auswertung erfolgte nach der modifizierten Methode nach Hanes (Cornish-Bowden 1995) und ist exemplarisch für Kaffeesäure in Abb. 32 dargestellt.

Alle eingesetzten Verbindungen wurden von STOMT als Substrat akzeptiert und zu den jeweiligen Monomethylderivaten umgesetzt. Die ermittelten Ergebnisse sind in Tab. 7 zusammengefasst.

Tab. 7 Substratspezifische Konstanten nach Umsetzung mit $9,1 \mu\text{M}$ ^{14}C -SAM (55 mCi/mmol). Jeweils 1,7 bis 3,8 μg STOMT-Protein wurden mit 1 μM - 1 mM der phenolischen Verbindungen oder 0,1 - 10 mM DMHF inkubiert. K_m : Michaelis-Menten-Konstante, V_{max} : Maximale Umsetzungsgeschwindigkeit.

Substrat	3,4-Dihydroxybenzaldehyd	Kaffeesäure	Brenzcatechin	Kaffeeoyl-CoA	DMHF
					
K_m (μM)	99,5	146	169,5	66	440
V_{max} (pkat/mg)	32,6	19,2	1,3	0,7	0,5
					
Produkt	Vanillin	Ferulasäure	Guajakol	Feruloyl-CoA	DMMF

Für alle phenolischen Substanzen wurden K_m -Werte im Bereich von 66 - 170 μM festgestellt. Am besten setzte STOMT 3,4-Dihydroxybenzaldehyd und Kaffeesäure um. Für beide Substrate konnte eine spezifische Aktivität von 32,6 bzw. 19,2 pkat/mg abgeleitet werden. Brenzcatechin und Kaffeesäure-CoA, die beiden phenolischen Verbindungen mit dem höchsten bzw. niedrigsten K_m -Wert werden relativ langsam umgesetzt und erreichen Maximalgeschwindigkeiten um 1 pkat/mg. Deutlich differenziert stellt sich die Methylierung von DMHF dar. Anfänglich lässt sich wie bei den diphenolischen Verbindungen der typische Verlauf einer Michaelis-Menten-Umsetzung beobachten, bei der bis zu einer DMHF-Konzentration von 10 mM die Methylierungsgeschwindigkeit ansteigt. Bei weiterer Substraterhöhung (≥ 15 mM)

hingegen ist ein Abnahme der Enzymaktivität festzustellen (Abb. 33). Somit scheinen entweder hohe Substratkonzentrationen oder steigende Produktkonzentrationen die Enzymaktivität von STOMT gegenüber DMHF zu inhibieren. Eine weitere Ursache für die abnehmende Aktivität könnte auch der Säurecharakter von DMHF sein, wodurch die Pufferkapazität der Inkubationslösung erschöpft wird.

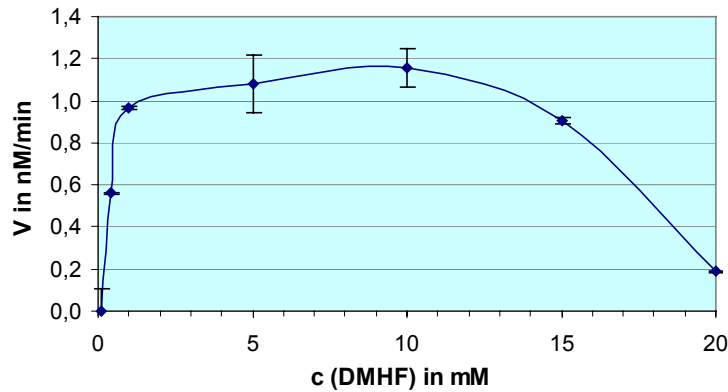


Abb. 33 Kinetischer Verlauf der Umsetzung von DMHF zu DMMF.

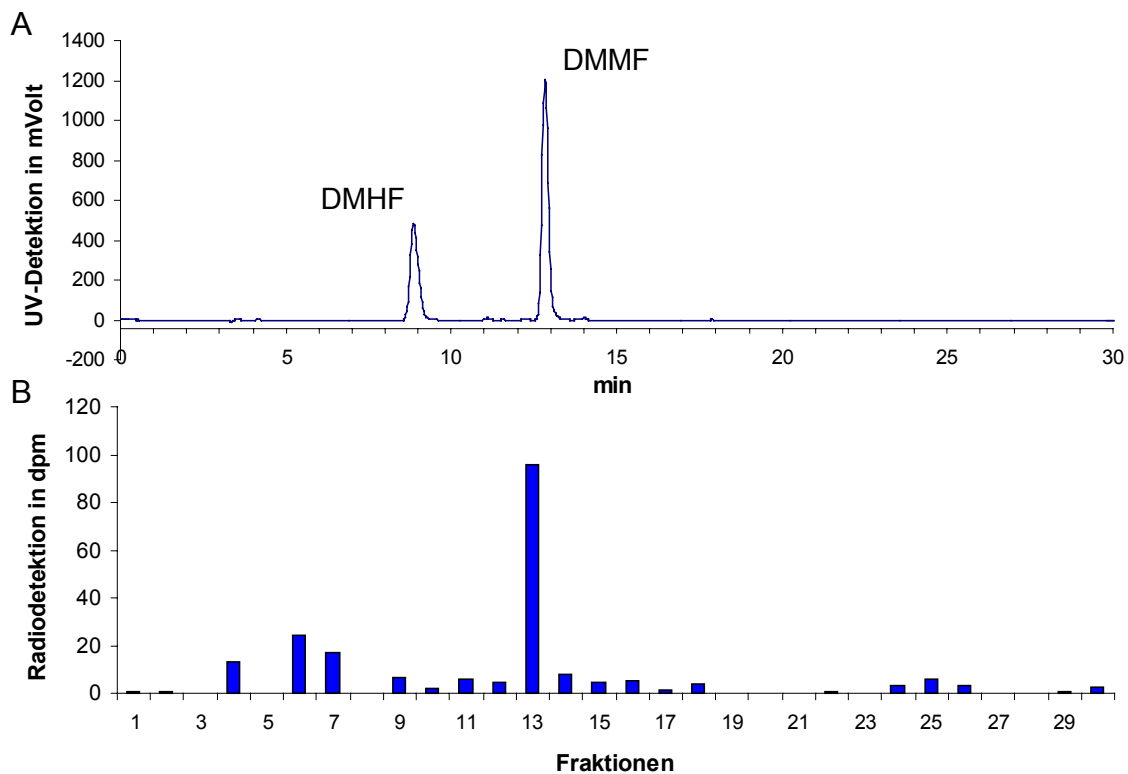


Abb. 34 HPLC-Analytik der Umsetzung von DMHF (HPLC 1-1b). A: Trennung der Referenzverbindungen DMHF ($R_t = 9$ min) und DMMF ($R_t = 13$ min) mit UV-Detektion bei 284 nm. B: Trennung der DMHF-Umsetzung (10 mM, 30 min) nach Extraktion mit Diethylether. Jeweils 1 ml Eluat wurde fraktioniert und anschließend mittels Flüssigszintillationszähler (LSC 2) analysiert. Von den dargestellten Messergebnissen wurde jeweils der Blindwert abgezogen.

Im Gegensatz zu den phenolischen Substraten ist bei DMHF eine deutlich höhere Michaelis-Menten-Konstante zu erkennen. Unter Berücksichtigung der strukturellen Eigenschaften von DMHF ist der K_m -Wert von 440 μM jedoch nicht überraschend, da vermutlich nur das dienolische Tautomer von der Methyltransferase umgesetzt werden kann und dieses nur zu einem geringen Anteil vorliegt. Auch die maximale Umsatzrate von 0,5 pkat/mg ist verglichen mit den anderen Substraten verhältnismäßig gering. Die HPLC-Chromatogramme zeigen aber, dass die Bildung von DMMF eindeutig nachweisbar ist (Abb. 34). Somit lässt sich vermuten, dass der Prozess der DMMF-Bildung in der Erdbeere relativ langsam verläuft.

2.7 Diskussion

Mit Hilfe einer COMT-spezifischen Sonde ist es gelungen, 24 OMT Transkripte aus einer Erdbeer-cDNA-Bibliothek zu isolieren. Trotz dieser vergleichsweise hohen Anzahl an cDNAs verschiedener Größen konnte für alle Klone eine identisch kodierende Region ausgemacht werden. Das abgeleitete Protein (STOMT) mit einer Größe von 365 Aminosäuren zeigte große Ähnlichkeiten zu pflanzlichen Kaffeesäure-OMTs. Die von Joshi und Chiang (1998) vorgeschlagenen SAM-Motive sind zu nahezu 100 % in STOMT vorhanden; lediglich in Motiv B konnte eine Nichtübereinstimmung festgestellt werden. Ausgehend von der Gesamtgröße des Proteins und den Abständen zwischen den SAM-Konsensusbereichen lässt sich eine Zugehörigkeit zu den Pl-OMT II Enzymen annehmen, die eine große Substratvariabilität aufweisen und keine Metallionen benötigen.

Heterologe Expressionen ergaben, dass STOMT als multifunktionelles Enzym angesehen werden kann. Alle fünf getesteten Substrate wurden von STOMT umgesetzt, obwohl diese verschiedenen Substanzklassen angehören. Neben den klassischen COMT Substraten Kaffeesäure und deren CoA-Ester, wurden auch einfachere phenolische Verbindungen wie Dihydroxybenzaldehyd und Brenzcatechin, aber auch DMHF, ein Furanonderivat zu den entsprechenden Methylderivaten metabolisiert. Die Fähigkeit, strukturell verschiedene Substrate zu akzeptieren, wurde bereits bei einigen anderen OMTs beobachtet (Gauthier und Mitarbeiter 1998, Frick und Kutchan 1999).

Die meisten bisher untersuchten Kaffeesäure-O-Methyltransferasen sind wichtige Bestandteile der Ligninbiosynthese. Auch STOMT ist in der Lage, Kaffeesäure effektiv zu Ferulasäure, einem Monolignol-Vorläufer, umzusetzen (vgl. Abb. 7). Aus diesem Grund kann auch für dieses Enzym eine Beteiligung an der Bildung von Lignin angenommen werden, zumal die Aktivitätsmaxima der Phenylalaninammoniaklyase (PAL), das Enzym, das die Ligninbiosynthese initiiert (vgl. Abb. 7), dem Expressionsmuster von STOMT entsprechen (Cheng und Breen 1991). Auffällig ist allerdings, dass die Substrataffinität gegenüber Kaffeesäure, ausgedrückt als K_M , mit 146 μM deutlich höher ist als bei Lignin-spezifischen OMTs aus Hölzern (Dixon und Mitarbeiter 2001). Wie auch bei einigen anderen COMTs bevorzugt STOMT die freie Kaffeesäure gegenüber dem CoA-Ester. (Inoue und Mitarbeiter 2000, Maury

und Mitarbeiter 1999). Auch wenn im Fruchtfleisch der Erdbeere kaum Lignin auftritt ist, so bestehen die aufsitzenden Samen (Nüsschen, Achenen) überwiegend aus dem komplexen Polymer. Über Leitbündel sind diese mit dem Inneren der Erdbeere verbunden (Suutarinen und Mitarbeiter 1998). In Northern Analysen konnte gezeigt werden, dass STOMT hauptsächlich in der reif-werdenden und reifen Frucht exprimiert wird. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die Nüsschen in den letzten Reifestadien lignifiziert werden und die benötigten Monolignole bzw. deren Vorläufer über die Leitbündel zur Verfügung gestellt werden. Der erste Anstieg an *STOMT*-Transkripten in der grünen Frucht könnte im Zusammenhang mit der Volumenzunahme der Frucht stehen. Zu Beginn der Fruchtreifung nimmt der Blütenboden kontinuierlich an Größe zu (Woodward 1972). Da sich aber das Leitbündelgewebe, das ebenfalls in hohem Maße neu gebildet werden muss, neben Cellulosefasern, Proteinen und Pektin auch aus Lignin zusammensetzt (Suutarinen und Mitarbeiter 1998), dürfte STOMT in diesem frühen Reifestadium an der Lignifizierung der Leitbündel beteiligt sein.

Obwohl DMHF nicht über die sonst notwendige Dihydroxyphenolstruktur verfügt, wurde dieses Substrat von STOMT zu dem Methylderivat DMMF umgesetzt. Beide Verbindungen sind wichtige Aromakomponenten der Erdbeere (Pyysalo und Mitarbeiter 1979, Larsen und Poll 1992). Zwar verfügt DMHF über ein heteroaromatisches Ringsystem mit zwei vicinalen Hydroxygruppen, allerdings nur als tautomere Zwischenform. Dies erklärt die relativ geringen Umsetzungsraten im Vergleich zum vermuteten, primären Substrat Kaffeesäure. Der DMHF-Gehalt in Erdbeeren variiert von Sorte zu Sorte und wird mit bis zu 55 mg/kg angegeben (Larsen und Mitarbeiter 1992). Dies entspricht einer molaren Konzentration von maximal 430 μM und ist somit in der selben Größenordnung anzusiedeln wie der für DMHF ermittelte K_M -Wert von 440 μM . Da aber die äußeren, rotgefärbten Schichten der Erdbeere eine nahezu doppelt so hohe DMHF-Konzentration aufweisen, wie die inneren Bereiche bzw. die gesamte Frucht (Sen und Mitarbeiter 1991), ist in den entsprechenden Kompartimenten mit Konzentrationen zu rechnen, die den K_M -Wert sogar übersteigen. Aus diesem Grund ist es sehr wahrscheinlich, dass STOMT für die Bildung von DMMF in der Frucht verantwortlich ist. Auch wenn die Methylierung von DMHF verhältnismäßig langsam abläuft, kann sie *in vitro* eindeutig durch STOMT-Aktivität nachgewiesen werden. DMHF ist somit Vorläufer von DMMF. Hierdurch wird die Tatsache begründet, dass das letztgenannte Furanonderivat, obwohl die *O*-Methylierung keine Tautomerisierung mehr zulässt, wie DMHF nur als Racemat isoliert werden kann (Bruche und Mitarbeiter 1991, Fischer und Hammerschmidt 1992). Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit der von Roscher und Mitarbeitern (1997) veröffentlichten Hypothese, die das Vorhandensein einer *O*-Methyltransferase in Erdbeeren aufgrund von *in vivo* Fütterungsstudien postuliert, und widersprechen der Forderung nach zwei unabhängigen Biosynthesewegen von DMHF und DMMF (Bruche und Mitarbeiter 1995).

Erdbeeren weisen eine hohe Zahl an aromawirksamen Substanzen auf. Würde die Biosynthese jeder Verbindung das Einwirken eines einzelnen Enzyms erfordern, müsste die Pflanze eine Unmenge an Energie für die Proteinbiosynthese aufbringen. Aus diesem Grund vermuten Zabetakis und Holden (1997), dass die Diversität der Aromakomponenten auf einen Mangel an Spezifität der beteiligten Enzyme zurückzuführen ist. Diesen Vorstellungen entsprechend ist

STOMT als multifunktionelles Enzym primär in den Phenylpropanoid-Metabolismus und mit einer Nebenaktivität in die Aromastoffbiosynthese involviert. Ähnliches trifft auch für eine kürzlich aus Erdbeeren isolierte Alkoholacyl-CoA-transferase (SAAT) zu. Dieses Enzym zeigt ebenfalls ein breites Substratspektrum und ist daher in der Lage eine Vielzahl an Fruchtestern zu bilden, die das Aroma der Erdbeere mitbestimmen (Aharoni und Mitarbeiter 2000).

Von den fünf getesteten Substraten wurde 3,4-Dihydroxybenzaldehyd am besten umgesetzt, eine Verbindung, die allerdings noch nicht in Erdbeeren identifiziert wurde. Lediglich das Methylierungsprodukt Vanillin (3-Methoxy-4-hydroxybenzaldehyd) wurde bisher in einigen Kulturvarietäten und in Walderdbeeren (*Fragaria vesca* L.) in geringen Mengen (0,2 - 1 mg/kg) nachgewiesen (Hirvi 1982, Pyysalo und Mitarbeiter 1979). Da ein möglicher Vanillin-Biosyntheseweg ausgehend von Zimtsäure über p-Cumarsäure und p-Hydroxybenzaldehyd zu 3,4-Dihydroxybenzaldehyd führt, könnte STOMT auch an der Bildung von Vanillin in Erdbeeren beteiligt sein (Havkin-Frenkel und Mitarbeiter 1999).

Ausschließen kann man die Beteiligung von STOMT an der Methylierung von phenolischen Verbindungen, wie sie für eine CCOMT aus Walderdbeeren vorgeschlagen wird (Nam und Mitarbeiter 1999). Erdbeeren zeichnen sich zwar durch hohe Gehalte phenolischer Inhaltsstoffe aus (Kähkönen und Mitarbeiter 2001), doch sind diese, abgesehen von den vernetzten Ligninbestandteilen, nicht methyliert (Häkkinen und Mitarbeiter 1999). Auch die stark vertretenen Anthocyanidine, mit Pelargonidin als Hauptbestandteil, besitzen keine Methoxygruppen. Obwohl mit Cyanidin ein denkbare Substrat verfügbar wäre, konnte dessen Methylderivat Päonidin in keiner bisher untersuchten Erdbeersorte nachgewiesen werden (Nyman und Kumpulainen 2001, Goiffon und Mitarbeiter 1991/1999). Lediglich in Erdbeerkallus-Kulturen wurde vor allem unter wachstumshemmenden Bedingungen die Methylierung von Cyanidin-3-glucosid zu Päonidin-3-glucosid beobachtet (Nakamura und Mitarbeiter 1998).

D MATERIAL UND METHODEN

1 Material

1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, in p.a.-Qualität von den Firmen Sigma, Aldrich, Fluka (alle Deisenhofen) und ICN (Eschwege) bezogen. Lösungsmittel wurden zusätzlich über Füllkörperkolonnen rektifiziert. Die Identifizierung erfolgte mittels Referenzverbindungen; neben den selbst synthetisierten Substanzen wurden die in der Referenzsammlung des Arbeitskreises vorhandenen Vergleichsproben verwendet.

Folgende Verbindungen wurden von externen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt:

- 1,6-Dichloro-1,6-dideoxyfructose (Sam Molinary, Tate and Lyle PLC; London, UK)
- Kaffeeoyl-CoA (Till Beuerle und Eran Pichersky, University of Michigan, Department of Biology; Ann Arbor, Michigan, USA)

Tab. 8 Isotopenmarkierte Verbindungen

Verbindung	Markierungsgrad [%]	Vertrieb
[U- ² H ₄]Acetaldehyd	99 Atom % ² H	Promochem (Wesel)
D-[1- ¹³ C]Fructose	99 Atom % ¹³ C	Omicron Biochemicals (USA)
D-[U- ¹³ C ₆]Fructose	99 Atom % ¹³ C	Omicron Biochemicals (USA)
D-[1- ² H ₁]Fructose	98 Atom % ² H	Omicron Biochemicals (USA)
D-[6,6- ² H ₂]Fructose	98 Atom % ² H	Omicron Biochemicals (USA)
L-[1- ¹³ C]Ascorbinsäure	99 Atom % ¹³ C	Omicron Biochemicals (USA)
D-[1- ¹³ C]Glucose	99 Atom % ¹³ C	Omicron Biochemicals (USA)
D-[1- ² H]Glucose	98 Atom % ² H	Omicron Biochemicals (USA)
D-[2- ² H]Glucose	98 Atom % ² H	Omicron Biochemicals (USA)
D-[4- ² H]Glucose	98 Atom % ² H	Omicron Biochemicals (USA)
D-[6,6- ² H ₂]Glucose	98 Atom % ² H	Omicron Biochemicals (USA)
[6- ¹³ C]-6-Desoxy-D-fructose (46 %)/ [6- ¹³ C]-6-Desoxy-D-glucose (51 %)	99 Atom % ¹³ C	Omicron Biochemicals (USA)
N-[¹³ C]Methyl-N-nitroso-4-toluolsulfonamid	99 Atom % ¹³ C	Promochem (Wesel)
LiAl[² H ₄]	99 Atom % ² H	Fluka (Deisenhofen)

Tab. 9 Radioaktive Verbindungen

Verbindung	spezifische Aktivität	Vertrieb
<i>S</i> -Adenosyl-L-[<i>methyl</i> - ¹⁴ C]methionin	55 mCi/mmol	Biotrend (Köln)
[α - ³² P]dCTP	>3000 Ci/mmol (10 μ Ci/ μ l)	ICN Chemikalien (Eschwege)

1.2 Enzyme

Triosephosphatisomerase, Type III-S (from Rabbit Muscle); 2,8 mg Protein/ml, 5600 Units/mg (Sigma, Deisenhofen)

Fructose-1,6-bisphosphat-D-glycerinaldehyd-3-phosphatlyase (FDP-Aldolase); lyophilisiert, 10,2 Units/mg (Sigma, Deisenhofen)

Thrombin; 500 U, >7500 U/mg (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg), in 500 μ l PBS lösen bzw. 117 NIH Units, 1720 NIH Units/mg (Sigma, Deisenhofen), in 585 μ l PBS lösen

Restriktionsendonukleasen:

*Bam*HI, 10 U/ μ l, 4000 U (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)

*Eco*RI, 10 U/ μ l, 5000 U (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)

*Xho*I, 10 U/ μ l, 2000 U (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)

T4 DNA Ligase, 1 U/ μ l (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)

Taq DNA Polymerase, Biotherm, 1000 U (Diagonal, Münster)

RNaseA, 100 mg, (Roth, Karlsruhe)

1.3 Pflanzenmaterial

Für biochemische Untersuchungen wurden Freilanderdbeeren der Art *Fragaria ananassa*, cv. Elsanta bzw. cv. White D und *Fragaria vesca* L. benutzt. Die Früchte wurden mit Stängel von der Mutterpflanze abgeschnitten und bis zur Applikation in Leitungswasser gelagert.

Alle molekularbiologischen Studien wurden mit Erdbeeren der Art *Fragaria ananassa*, cv. Elsanta durchgeführt. Die Pflanzen wurden im Gewächshaus kultiviert. Die verschiedenen Gewebe wurden von der Pflanze abgetrennt, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

1.4 Medien und Pufferlösungen

LB Nährmedium: (Luria-Bertani)	1 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 1 % NaCl
LB _{Amp} :	LB-Medium 50 µg/ml Ampicillin (steril)
LB-Nähragar:	LB-Medium 1,5 % Agar vor dem Erstarren 50 µg/l Ampicillin (steril) zugeben
10 × SSC:	1,5 M NaCl 0,15 M Na-Citrat mit 5 N NaOH auf pH 7 einstellen
SM-Puffer:	100 mM NaCl 0,2 % MgSO ₄ · H ₂ O 50 mM Tris/HCl, pH 7,5 0,01 % Gelatine
PBS-Puffer:	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄

1.5 Säulenchromatographie

Umkehrphase: Lichroprep[®] RP 18, Korngröße 43 - 47 µm (Merck), Glassäule Ø 3 cm, 20 cm
Das RP-18 Material wird mit Methanol gereinigt und mit Wasser konditioniert.
Elution erfolgt mit jeweils 100 ml 0 %, 10 %, 20 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %
und 50 % Methanol in Wasser bei leichtem Überdruck.

Festphase: Amberlite[®] XAD-2, Korngröße 0,3 - 1 mm (Serva), Glassäule Ø 1,8 cm, 15 cm
Vor Gebrauch wird das Material in einer Soxhlet-Apparatur zunächst mit Diethyl-
ether und anschließend mit Methanol erschöpfend extrahiert. In einer Methanol-
Suspension wird das Material auf die Chromatographie-Säulen aufgegeben und mit
Wasser konditioniert.

2 Geräte

2.1 Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (HRGC-MS)

Gerät :	Fisons Instruments MD 800 (Fisons Instruments, Mainz)
GC :	Fisons Instruments GC 8060
Autosampler :	Fisons AS 800
Injektor :	Split-Splitless-Injektor (1:20), Temperatur : 250°C
Trennsäule :	J&W DB-Wax 20M (30 m × 0,25 mm i.D. ; df = 0,25 µm) (J&W, Folsom)
Trärgas:	Helium 5.0, 1 ml/min (bei 50°C)
Temperaturprogr.:	50°C (3 min isotherm) - 4°C/min - 240°C
Massenbereich:	41 - 250 u
Scandauer:	0,45 s + 0,05 s delay
Temperaturen:	Ionenquelle: 210°C, Kopplungsteile: 250°C
Ionisation:	Elektronenstoßionisierung (EI+), 70 eV
Kathodenstrom:	1,8 mA
Quellendruck:	10 nbar
Photomultiplier:	1800 V
Datenaufnahme und -auswertung:	Mass-Lab für Windows (Fisons Instruments, Mainz)

2.2 Isotopenverhältnismassenspektrometrie (HRGC-IRMS)

HRGC

Gerät:	Hewlett Packard 6890 Series (Agilent Technologies, Waldbronn)
Autosampler:	CTC A 200 S (Zwingen, Schweiz); Spüllösung: Ethanol abs.
Injektor:	Split/Splitless-Injektor, Temp. 250°C 1 µl Splitless-Injektion
Trennsäule:	J&W DB-Wax (60 m × 0,32 mm i.D.; df = 0,25 µm) (J&W, Folsom)
Trärgas:	Helium 5.3, 3 ml/min
Temperaturprogr.:	50°C - 5°C/min - 220°C (10 min isotherm)

Interface

Oxidationsreaktor:	Al ₂ O ₃ 320 mm × 1,5 mm, 0,5 mm i.D. Drähte: Kupfer, Nickel, Platin jeweils 240 mm × 0,125 mm Temp: 960°C
Thermoelement:	Pt/Rh/Pt
Reduktionsreaktor:	Al ₂ O ₃ 320 mm × 1,5 mm, 0,5 mm i.D. drei gedrehte Kupferdrähte: 240 mm × 0,125 mm Temp: 600°C
Kopplung:	offene Kopplung via „open split“

Massenspektrometer

Gerät:	Finnigan MAT Delta ^{plus} XL (ThermoQuest, Egelsbach)
Transferkapillaren:	unbeheizt, 1,5 m × 0,1 mm (Probe); 1,5 m × 0,05 mm (Referenzgas)
Ionenquelle:	Elektronenstoßionisierung (EI+), 70 eV Temp: ~70°C
Kathodenspannung:	3 kV
Massenbereich:	2 - 70 u
Detektor:	Kollektorsystem (Faraday Cups) zur Detektion der Massen m/z 44, 45 und 46; CO ₂
Datenaufnahme und -auswertung:	Isodat 6.2 für Real 32 (ThermoQuest, Egelsbach)

2.3 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

HPLC 1:	Analytische HPLC Maxi-Star (Knauer, Berlin)
Pumpensystem:	HPLC Maxi Star Niederdruckpumpe mit analytischem Pumpenkopf, Degasser und Dynamic Mixing Chamber (Knauer, Berlin)
Autosampler:	Basic Marathon (Spark, Emmen)
Injektor:	Vier-Wege-Ventil Nr. 7125 (Rheodyne), Probenschleife 20 bzw. 100 µl
Trennsäule 1-1:	Eurospher 100 C-18 (250 × 4,6 mm; 5 µm) (Knauer, Berlin)
Fließmittel 1-1:	A: Acetonitril B: 0,05 % Ameisensäure in Wasser Fluss: 1 ml/min
Gradient 1-1a:	0 - 25 min: 0 - 100 % A; 25 - 27 min: 100 % A
Gradient 1-1b:	0 - 30 min: 5 - 100 % A, 30 - 40 min : 100 % A
Säule 1-2:	Nucleosil 100-10 SB (250 × 4 mm, 10 µm) (Macherey & Nagel, Düren)
Fließmittel 1-2:	A: 1 M NH ₄ CHOO, pH 3-4 B: Wasser Fluss: 1 ml/min
Gradient 1-2:	0 - 35 min: 0 - 20 % A; 35 - 40 min: 20 % A; 40 - 41 min : 20 - 0 % A
Detektor :	UV-Detektor Nr. 29815 mit variabler Wellenlänge (Knauer) und/oder Verdampfungs-Lichtstreu-Detektor (ELSD, <u>E</u> vaporative <u>L</u> ight <u>S</u> cattering <u>D</u> etector), Modell Sedex 55 (Sedere, Frankreich); Temperatur: 45°C, Druck 2,4 atm
Datenaufnahme und -auswertung:	Eurochrom 2000 (Knauer, Berlin)

2.4 Hochleistungsflüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie (HPLC-MS/MS)

HPLC 2:	Hochdruckgradientenanlage (Applied Biosystems)
Pumpe:	140B Spritzenpumpe für binäre Hochdruckgradienten (Applied Biosystems, Bensheim)
Autosampler:	Triathlon, μ l-Pick-up Modus für automatische Injektion, 5 μ l Injektionsvolumen (Spark, Emmen)
Injektor:	Rheodyne 8125 Probenventil, Probenschleife 5 μ l (Rheodyne)
Trennsäule 2:	Eurospher 100-18 (100 \times 2 mm, 5 μ m) (Knauer, Berlin)
Fließmittel 2:	A: 0,05 % TFA in Wasser B: Acetonitril Fluss: 0,2 ml/min
Gradient 2:	0 - 10 min: 0 - 40 % A, 10 - 12 min: 40 - 70 % A, 12 - 15 min : 70 - 100 % A
Detektor :	UV-Spektralphotometer, analytische Messzelle (10 mm) (Knauer, Berlin)
Lösungsmittel- splitting:	PEEK-Mikrosplitter (Upchurch, Oak)

Tandemmassenspektrometer:

Spektrometer:	Finnigan TSQ 7000 Triple-Stage-Quadrupol-Tandemmassenspektrometer (Finnigan MAT, Bremen) mit ESI- oder ACPI-Interface
ESI-	
Koppelkapillare:	Deaktivierte Fused Silica Kapillare (50 μ m i.D.) (J & W, Folsom)
Sheathgas:	Stickstoff 5.0, 60 psi
Hilfsgas:	Stickstoff 5.0, 10 Skalenteile
Kollisionsgas:	Argon 5.0, Kollisionsgasdruck 270 mPa (2,0 mTorr)
Kollisionsenergie:	15 eV
Ionenquelle:	Atmosphärendruck, Raumtemperatur
Eingangskapillare:	240 bis 250°C
Kapillarspannung:	3,0 bis 4,0 kV
Datenaufnahme und -auswertung:	DEC 5000/33 Workstation (Digital Equipment, Unterföhring) ICIS 8.1 Softwarepaket (Finnigan MAT, Bremen)

2.5 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Gerät:	Bruker WM 400 (400 MHz bzw. 100 MHz)
Standard:	3-(Trimethylsilyl)-2,2,3,3-d ₄ -propionsäure (TPS) $\delta = 0,00$ ppm oder das jeweilige NMR-Lösungsmittel
Lösungsmittel:	D ₂ O, CDCl ₃ , Aceton-D ₆ , DMSO-D ₆
Auswertung:	WINNMR (Bruker, Rheinstetten)

2.6 Flüssigszintillationszähler (LSC)

LSC 1: Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Analyzer (Meriden, USA)
Messzeit: 4 min; Vials: 5 ml (Packard)

LSC 2: LKB Rackbeta 1214 (Pharmacia, Freiburg)
Messzeit: 10 min; Vials: 15 ml (Zinsser)

Szintillationscocktail: Emulsifier-Safe (Packard BioScience; Groningen, Niederlande)

2.7 Photometer

UV 1: GeneQuant II RNA/DNA Calculator (Pharmacia Biotech, Freiburg)

UV 2: V 2101 PC UV-Vis Scanning Spektralphotometer (Shimadzu, Duisburg)

2.8 Sonstige Geräte

Rotavapor: Büchi Rotavapor und Büchi Vakuum System B-173 (Büchi, Konstanz)

Kühlzentrifugen: Centrikon T-124, Kontron Instruments (Italien); Rotor: A 8.24 und A 6.14
Sorvall RC-5B (DuPont Instruments; Wilmington, USA); Rotor: CS-3

Lyophilisator: Christ Alpha 1-4; 0,1 mbar (Christ, Osterode)

Ultraschallsonde: Branson Sonifier Model S 125 (Branson; Danbury, USA)

pH-Meter: pH-Meter CG 820 (Schott Geräte, Hofheim)

3 Methoden

3.1 Darstellung stabil markierter Monosaccharide

3.1.1 [^{13}C]-1-Desoxy-D-fructose

3.1.1.1 Synthese von D-Arabinose-di-n-butylmercaptal

Nach Zinner und Mitarbeiter 1956

12 g (80 mmol) D-Arabinose werden in 7,2 g (80 mmol) Butanthiol (8,55 ml) gelöst. Nach langsamem Zutropfen von 12 ml konz. Salzsäure im Eisbad werden 2 g wasserfreies Zinkchlorid zugegeben und 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend bleibt der Reaktionsansatz 20 min stehen, bis eine rot-schwarze Färbung auftritt. Nach Zugabe von 80 ml Wasser kristallisiert das Mercaptal sofort aus. Der Niederschlag wird abfiltriert und anschließend lyophilisiert.

Ausbeute: 8,41 g

HPLC 1-1a: R_t : 17,95 min

3.1.1.2 Synthese von 2,3,4,5-Tetra-O-acetyl-D-arabinose-di-n-butylmercaptal

Das getrocknete Mercaptal (8,4 g, 27 mmol) wird in 24 ml wasserfreiem Pyridin gelöst, mit 32 ml (339 mmol) Acetanhydrid versetzt und 16 Std. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Lösung wird in 160 ml Eiswasser gegossen und drei Mal mit Diethylether ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden jeweils drei Mal mit 10 % HCl, gesätt. NaHCO_3 -Lösung und Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nachdem das Lösungsmittel abrotiert ist, verbleibt ein zähflüssiges gelb-braun gefärbtes Öl.

Ausbeute: 12,4 g

HPLC 1-1a: R_t : 24,83 min

3.1.1.3 Synthese von 2,3,4,5-Tetra-O-acetyl-D-arabinose

Nach Wolfrom und Mitarbeiter 1941

Dem Arabinosemercaptal-tetraacetat (12,4 g, 26 mmol), gelöst in 43,2 ml Aceton, werden 24 g fein gepulvertes CdCO_3 und 4,8 ml Wasser zugegeben. 28,32 g HgCl_2 werden in 43,2 ml Aceton gelöst und unter starkem Rühren dem Reaktionsansatz hinzugefügt. Die Suspension wird nach 20 Std. starkem Rühren in einen Kolben filtriert, der mit 2,4 g CdCO_3 bestückt ist und sorgfältig mit Aceton gewaschen. Der Inhalt des Kolbens wird mit dem CdCO_3 abrotiert und der verbleibende Rest drei Mal mit warmem Chloroform ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden so oft mit einer KJ-Lösung gewaschen bis keine Rotfärbung mehr sichtbar ist.

Anschließend wird die Lösung drei Mal mit Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und abrotiert.

Das gelbe Öl (ca. 8 g) wird in wenig Methanol gelöst und mittels Säulenchromatographie (Umkehrphase) von Reaktionsnebenprodukten gereinigt. Fraktionen von 50 ml werden gesammelt und mittels HPLC (HPLC 1-1a) kontrolliert. Fraktionen die frei von Nebenprodukten sind, werden vereinigt, abrotiert und lyophilisiert.

Ausbeute: 4 g

HPLC 1-1a: R_t: 12,2 min

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 9,47 (1H, s, H-1); 5,70-5,67 (1H, dd, H-2); 5,39-5,38 (1H, d, H-3); 5,28-5,24 (1H, m, H-4), 4,20-4,16 (2H, m, H-5); 2,20 (3H, s, C-2-CO-CH₃); 2,07 (12H, s, C-3,4,5-CO-CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 193,75 (C-1); 170,38; 169,77; 169,47; 169,39 (C-2,3,4,5-CO-CH₃); 96,61 (C-2); 75,89 (C-4); 68,20 (C-3); 61,55 (C-5); 20,66; 20,54; 20,36; 20,19 (C-2,3,4,5-CO-CH₃).

3.1.1.4 Synthese von 3,4,5,6-Tetra-*O*-acetyl[1-¹³C]-1-desoxy-D-fructose

Nach De Boer und Backer 1956

Etwa 100 mg der 2,3,4,5-Tetra-*O*-acetyl-D-arabinose (0,3 mmol) werden in 200 ml Chloroform gelöst. In einem Dreihalskolben wird eine Lösung aus einem Teil Methanol und zwei Teilen Diethylether mit KOH versetzt. Der Kolben wird luftdicht verschlossen, wobei ein Glasrohr aus dem Kolben direkt in die Chloroform-Lösung taucht. Nach Zugabe von *N*-[¹³C]Methyl-*N*-nitroso-4-toluolsulfonamid entsteht unter ständigem Rühren gasförmiges ¹³C-Diazomethan, das durch Einleiten von Stickstoff in die Chloroform-Lösung getrieben wird. Der Vorgang wird bis zur vollständigen Gelbfärbung der Chloroform-Lösung fortgesetzt und nach dem Entfärben mehrmals bis zur vollständigen Methylierung wiederholt.

Das Chloroform wird am Rotationsverdampfer abgezogen und der verbleibende Feststoff in wenigen Milliliter Methanol aufgenommen. Anschließend wird das Methylierungsprodukt über Säulenchromatographie (Umkehrphase) aufgereinigt. Fraktionen von 10 ml werden gesammelt und mittels HPLC (HPLC 1-1a) überprüft. Fraktionen, die das reine Reaktionsprodukt enthalten, werden vereinigt, das Lösungsmittel abgezogen und lyophilisiert.

Ausbeute: ca. 33 mg

HPLC 1-1a: R_t: 15,6 min

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 5,69-5,66 (1H, dd, H-3); 5,26-5,26 (1H, d, H-4); 5,25-5,22 (1H, m, H-5); 4,31-4,27 (1H, dd, H-6); 4,17-4,13 (1H, dd, H-6); 2,22 (3H, s, H-1); 2,18 (3H, s, C-3-CO-CH₃); 2,08; 2,07 und 2,06 (je 3H, s, C-4,5,6-CO-CH₃).

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 201,33 (C-2); 170,42; 170,04; 169,47 und 169,36 (C-3,4,5,6-CO- CH_3); 75,85 (C-3); 68,46 (C-5); 68,13 (C-4); 61,71 (C-6); 26,67 (C-1); 20,66; 20,58 und 20,37 (C-3,4,5,6-CO- CH_3).

3.1.1.5 Synthese von [1- ^{13}C]-1-Desoxy-D-fructose

Zur Abspaltung der Acetylgruppen werden 50 mg (0,15 mmol) 3,4,5,6-Tetra-*O*-acetyl[1- ^{13}C]-1-desoxy-D-fructose in 2 ml Methanol gelöst und mit 6 ml Wasser und 2 ml 10 %iger Ammoniaklösung versetzt. Die Lösung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 2 N Essigsäure neutralisiert. Zum Abtrennen des Ammoniumacetats wird die [1- ^{13}C]-1-Desoxy-D-fructose mehrmals lyophilisiert.

Ausbeute: ca. 20 mg

1-Desoxy-D-fructose liegt in wässriger Lösung zu 75 % als β -Pyranose vor (Angyal und Mitarbeiter 1976). Die Angaben der NMR-Auswertung beziehen sich auf diese Konformation. Die Signale der anderen Konformationen (α -Pyranose, α - und β -Furanose und offen-kettig) sind ebenfalls vorhanden, werden aber nicht im Einzelnen angegeben.

^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O): δ 98,51 (C-2); 72,45 (C-3); 69,94 (C-4); 69,62 (C-5); 63,63 (C-6); 25,00 (C-1).

3.1.2 [6- $^2\text{H}_1$]-6-Desoxy-D-glucose

3.1.2.1 Synthese von Methyl-6-*O*-tosyl- α -D-glucopyranosid

Nach Cramer und Mitarbeiter 1959

15 g (77 mmol) Methyl- α -D-glucopyranosid, gelöst in 135 ml Pyridin, werden im Eisbad unter Rühren langsam mit einer Lösung aus 15,75 g (83 mmol) *p*-Toluolsulfonsäurechlorid in 37,5 ml Pyridin versetzt. Der Reaktionsansatz wird zwei Tage bei Raumtemperatur gehalten. Das Pyridin wird bei 40°C im Vakuum am Rotationsverdampfer abgezogen. Etwa 50 % des zähen, braunen Rückstands werden in wenig Methanol gelöst und über Säulenchromatographie (Umkehrphase) aufgereinigt. Fraktionen von ca. 8 ml werden gesammelt und mittels HPLC überprüft. Insgesamt können vier Substanzen detektiert werden. Die entsprechenden Fraktionen werden vereinigt, das Lösungsmittel wird abrotiert, lyophilisiert und mittels NMR charakterisiert.

Ausbeute: 2,6 g

HPLC 1-1a: R_t : 14,7 min

^1H -NMR (400 MHz, Aceton- D_6): δ 7,83-7,81 (2H, d, ArH); 7,50-7,48 (2H, d, ArH); 4,58-4,57 (1H, d, H-1); 4,36-4,33 (1H, d, H-6); 4,20-4,16 (2H, dd, H-6); 3,7-3,65 (1H, dd, H-5); 3,59-3,55 (1H, t, H-3); 3,32-3,29; 3,29 und 3,28-3,23 (5H, t,s,t, H-2, O- CH_3 , H-4).

¹³C-NMR (100 MHz, Aceton-D₆): δ 130,74 (C₆H₄ a); 128,72 (C₆H₄ b); 100,90 (C-1); 75,05 (C-3); 73,20 (C-5); 71,07 (C-2); 70,84 (C-4); 70,60 (C-6); 55,43 (C-1'); 21,49 (Ar-CH₃).

3.1.2.2 Synthese von Methyl[6-²H₁]-6-desoxy-α-D-glucopyranosid

Nach Haque und Mitarbeiter 1987

300 mg (0,95 mmol) Methyl-6-*O*-tosyl-α-D-glucopyranosid und 172 mg (4,1 mmol) LiAl[²H₄] werden in 35 ml Tetrahydrofuran (THF) 16 Std. unter Rückfluss gekocht. Überschüssiges Reagenz wird durch langsames Zutropfen (wenige Tropfen) gesättigter Na₂SO₄-Lösung zerstört. Das ausgefallene Produkt wird durch Filtration isoliert, in ca. 15 - 20 ml 1 N HCl gelöst und mit NaHCO₃ auf pH 4-5 eingestellt. Das Reaktionsprodukt wird über Säulenchromatographie (Umkehrphase) aufgereinigt (Elution nur mit 100 % Wasser) und die vereinigten wässrigen Phasen am Rotationsverdampfer auf ca. 10 ml eingeengt.

HPLC 1-1a: R_t: 7,3 min

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, Aceton-D₆): δ 4,71-4,70 (1H, d, H-1); 3,71-3,64 (1H, m, H-5); 3,59-3,50 (2H, m, H-4, H-2); 3,36 (3H, s, O-CH₃); 3,12-3,08 (1H, t, H-3); 1,24-1,23 (3H, d, H-6). Die Signale entsprechen der unmarkierten Verbindung.

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O, Aceton-D₆): δ 99,55 (C-1); 75,40 (C-4); 73,16 (C-3); 71,81 (C-2); 67,81 (C-5); 55,32 (O-CH₃); 16,89 (C-6).

3.1.2.3 Synthese von [6-²H₁]-6-Desoxy-D-glucose

Die wässrige Lösung mit Methyl[6-²H₁]-6-desoxy-α-D-glucopyranosid wird mit 350 μl Trifluoressigsäure (TFA) eine Stunde unter Rückfluss gekocht. Das Hydrolysat wird anschließend lyophilisiert, wobei die leichtflüchtige TFA entfernt werden kann.

Ausbeute: 16 mg

¹H-NMR (400 MHz, D₂O):

α-Pyranose (ca. 35 %): δ 5,16-5,15 (1H, d, H-1); 3,91-3,84 (1H, dq, H-5); 3,66-3,61 (1H, t); 3,54-3,50 (1H, dd, H-2); 3,13-3,10 (1H, t); 1,25-1,23 (3H, d, H-6).

β-Pyranose (ca. 65 %): δ 4,62-4,60 (1H, d, H-1); 3,50-3,46 (1H, dq, H-5); 3,44-3,39 (1H, t); 3,25-3,20 (1H, dd, H-2); 3,16-3,12 (1H, t); 1,27-1,26 (3H, d, H-6).

Die Signale entsprechen den unmarkierten Verbindungen.

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): δ 98,83 (C-1, β); 95,07 (C-1, α); 78,62; 78,18 und 78,01 (C-2, C-4, β und C-2, α); 77,53 (C-3, β); 75,96; 75,63; 74,95 und 74,58 (C-5, β und C-4, C-3, C-5, α); 70,55 (C-5, α); 19,58; 19,38 (C-6, α und C-6, β).

3.1.3 [5,6,6,6-²H₄]-6-Desoxyhexulose-1-phosphat

3.1.3.1 Synthese von α -Hydroxy[²H₄]propionnitril

Nach Serianni und Mitarbeiter 1979/1982

Eine Lösung von 196 mg (4 mmol) NaCN in 13 ml Wasser wird in einem 25 ml Dreihalskolben, der im Wasserbad auf 25°C temperiert wird, vorgelegt. Die Kolbenhäse werden mit Kunststoffsepten verschlossen und der pH-Wert im Reaktionsverlauf mittels pH-Elektrode überprüft. Mit einer Spritze werden 10 ml Luft aus dem Kolben entfernt, um einen geringen Unterdruck anzulegen. Mit 3 M Essigsäure wird die Lösung auf pH 8,5 eingestellt. Unter ständigem Rühren werden langsam 192 mg (4 mmol) [U-²H₄]Acetaldehyd in 6 ml Wasser zugegeben. Bei Bedarf wird mit 1 N NaOH oder 3 M Essigsäure der ursprüngliche pH Wert erneut eingestellt. Nach ca. 2 Std. wird die Reaktion beendet in dem durch Zugabe von Essigsäure der pH auf 4,2 herabgesetzt wird. Diese Lösung, die das α -Hydroxy[²H₄]propionnitril enthält, wird direkt ohne weitere Aufarbeitung für die folgende Reduktion verwendet.

3.1.3.2 Synthese von [2,3,3,3-²H₄]Lactaldehyd

In einem 250 ml Kolben werden 248 mg Pd/BaSO₄ (62 mg je mmol Nitril) in 10 ml Wasser suspendiert und mit der α -Hydroxypropionnitril-Lösung versetzt. Nach zweimaliger Evakuierung des Kolbens wird das Nitril über Nacht in einer H₂-Atmosphäre (Luftballon mit H₂ gefüllt) reduziert. Abschließend wird die Suspension durch Celite filtriert.

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): δ 213,21 (C-1); 69,18 (C-2); 15,82 (C-3); weitere Signale: Essigsäure 177,90 (C-1); 20,95 (C-2).

3.1.3.3 Synthese von [5,6,6,6-²H₄]-6-Desoxyhexulose-1-phosphat

Nach Durrwachter und Mitarbeiter 1986

Die Lactaldehyd-Lösung wird in einen Dreihalskolben überführt und mit 1 N NaOH neutralisiert (pH 7). Nach Zugabe von 436 mg (1,3 mmol) D-Fructose-1,6-bisphosphat wird der Kolben verschlossen (eine kleine Öffnung für den Gasaustritt muss gewährleistet sein) und die Lösung mit Argon entgast. Anschließend werden 128 U Triosephosphatisomerase (15680 U/ml) und 67 Units FDP-Aldolase (10,2 U/mg) hinzugefügt und 22 Std. leicht gerührt. Die Lösung wird in ein 250 ml-Becherglas überführt, mit 641 mg BaCl₂ versetzt und mit 1 N NaOH auf pH 8,2 eingestellt. Nach Zugabe von 39 ml Aceton wird die Lösung über Nacht gekühlt, um das Barium-Salz der [5,6,6,6-²H₄]-6-Desoxyhexulose-1-phosphat auszufällen. Die Suspension wird in Teflon-Zentrifugenröhrchen zentrifugiert (10 min, 2000 × g), der Niederschlag mit Aceton gewaschen und getrocknet. Das Produkt wird in Wasser gelöst und mittels HPLC fraktioniert (HPLC 1-2, Detektion: ELSD). Die vereinigten Fraktionen werden mehrmals lyophilisiert.

Ausbeute: ca. 50 mg

HPLC 1-2: R_t : 16,50 min

HPLC-MS: ESI negativ; loop-Injektion

unmarkiert: MS: m/z 243 $[M-H]^-$

MS/MS (Prekursorion m/z 243, 15 eV): m/z 243 $[M-H]^-$, 169 $[M-C_3O_2H_7]^-$, 149, 97 $[H_2PO_4]^-$; 79 $[HPO_3]^-$

deutert: MS: m/z 247 $[M-H]^-$

MS/MS (Prekursorion m/z 247, 15 eV): m/z 247 $[M-H]^-$, 169 $[M-C_3O_2H_3^2H_4]^-$, 97 $[H_2PO_4]^-$; 79 $[HPO_3]^-$

^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O): δ 214,59 (C-2); 78,24; 77,13 und 75,39 (C-3, C-4 und C-1); 67,26 (C-5); 14,53 (C-6).

3.2 Applikationsversuche mit Erdbeeren

3.2.1 Applikation

Mit einem Skalpell werden Stängel und Kelchblätter von der Frucht entfernt. Das jeweilige Monosaccharid wird in 50 μ l Leitungswasser gelöst und mit einer GC-Spritze (10 μ l) in das Fruchttinnere injiziert. Jede Frucht wird einzeln auf Präparategläschen gesetzt und mit einigen Tropfen Wasser benetzt. Die so behandelten Früchte verbleiben drei Tage im Tageslicht (Fensterbrett), wobei die Früchte wiederholt benetzt werden, um ein zu starkes Austrocknen zu verhindern. Nach drei Tagen werden die Erdbeeren eingefroren oder direkt aufgearbeitet.

3.2.2 Aufarbeitung

Die frischen oder gefrorenen Erdbeeren werden mit einem Ultra-Turrax und 10 - 15 ml Wasser zerkleinert und homogenisiert. Das Homogenat wird 15 min bei $2000 \times g$ zentrifugiert und der Überstand nach Filtration durch Glaswolle auf eine konditionierte XAD-Festphasen-Säule gegeben. Der Rückstand wird erneut mit 20 ml Wasser aufgeschlämmt, zentrifugiert, filtriert und auf die Festphasen-Säule gespült. Die Säule wird mit 50 ml Wasser gewaschen und anschließend im Stickstoff-Strom trocken geblasen. Anschließend wird die Säule mit 50 ml Diethylether (Aromaextrakt) und 80 ml Methanol (Glykosidextrakt) eluiert. Die methanolische Phase wird am Rotationsverdampfer auf ca. 0,5 ml eingengt, in 1,5 ml HPLC-Gläschen gespült und bei $-20^\circ C$ gelagert. Der Aromaextrakt wird an einer Vigreuxkolonne (Wasserbad, $40^\circ C$) vorsichtig auf ca. 0,4 ml einkonzentriert, in 1,5 ml GC-Gläschen überführt und sofort über HRGC-MS vermessen. Der Glykosidextrakt wird mittels HPLC-MS/MS (HPLC 2) analysiert.

3.3 Verfahren mit Ribonukleinsäuren (RNA)

3.3.1 Isolierung von RNA

3.3.1.1 Isolierung der Gesamt-RNA

nach Manning 1991

Da Erdbeeren einen hohen Anteil an Polysacchariden aufweisen, erfolgt die RNA-Isolierung über eine differentielle Butoxyethanol-Fällung (Ethylenglykol-monobutylether, 2-BE). Dabei werden zuerst selektiv Polysaccharide ausgefällt und anschließend durch steigende 2-BE-Konzentrationen auch die Nukleinsäuren präzipitiert. Die Trennung der RNA von DNA erfolgt durch Lithiumchloridfällung.

TBE-Puffer: 200 mM Borsäure
 200 mM Tris/HCl (pH 7,6)
 10 mM Na₂EDTA

Extraktionspuffer: 96 ml TBE-Puffer
 2 ml β-Mercaptoethanol
 2 ml 25 % SDS

Phenol-Chloroform: 250 ml Phenol-Lösung; gesättigtes Phenol Typ I, pH 6,6/7,9 (Biometra, Göttingen)
 200 ml TBE-Puffer
 250 ml Chloroform (enthält 10 ml Amylalkohol)
gut mischen und Phasen über Nacht trennen lassen. Im Folgenden wird nur die untere Phase verwenden.

2 - 10 g gefrorenes Erdbeergewebe werden in einem mit flüssigen Stickstoff gekühlten Mörser fein gemahlen. Das Pulver wird in zwei Zentrifugenröhrchen überführt, die mit jeweils 10 ml Extraktionspuffer und 10 ml Phenol-Chloroform bestückt sind. Die Gefäße werden im Wasserbad erwärmt und mehrmals geschüttelt. Nach Zentrifugation bei 20000 × g (10 min; RT) wird die obere wässrige Phase abgetrennt und die verbleibende untere und Interphase erneut mit 10 ml Extraktionspuffer extrahiert. Die ersten und zweiten wässrigen Phasen werden vereinigt und mit dem gleichen Volumen an Phenol-Chloroform wie zuvor behandelt. Die vereinigten wässrigen Phasen werden mit Wasser auf das 2,5 fache Volumen verdünnt. Durch Zugabe von 1 M Natriumacetat (pH 4,5) wird die Na-Konzentration auf 80 mM eingestellt. (Den Beitrag an Na⁺ aus dem Extraktionspuffer berücksichtigen!) Die Lösung wird mit 0,4 Volumen 2-BE gemischt und für mind. 30 min auf Eis inkubiert. Die ausgefällten Polysaccharide werden bei 20000 × g sedimentiert (0 - 4°C, 15 min) und das Zentrifugat mit weiteren 0,6 Volumen 2-BE (gekühlt) versetzt. Die Lösung wird mind. 30 min auf Eis inkubiert und anschließend wie zuvor zentrifugiert. Das durchsichtige Nukleinsäurepräzipitat wird sukzessive mit Extraktionspuffer/2-BE (1:1, v/v), Ethanol/0,1 M Kaliumacetat (pH 6,0) (70:30, v/v) und Ethanol gewaschen und kurz getrocknet. Die Nukleinsäuren werden in max. 4 ml Wasser gelöst (Konz. > 1 mg/ml) und mit 12 M Lithiumchloridlösung eine LiCl-Konzentration von 3 M eingestellt. Nach einigen

RNA-Ladungspuffer: 720 μ l Formamid
160 μ l 10 \times MEN
260 μ l 37 % Formaldehyd
180 μ l Wasser, bidest.
100 μ l 80 % Glycerin
80 μ l 2 % Bromphenolblau-Lösung
3 μ l 1 % Ethidiumbromidlösung

Für qualitative Kontrollen werden jeweils 1 μ g, für Northern Blots werden jeweils 10 μ g Gesamt-RNA in gleichen Volumina Wasser gelöst, mit 1/5 Vol. RNA-Ladungspuffer versetzt und 5 min bei 65°C denaturiert. Nach 2 min auf Eis werden die Proben im denaturierenden 1 \times MEN-Agarosegel bei einer Spannung von 70 - 80 V aufgetrennt. Gegebenenfalls wird zusätzlich zu den zu untersuchenden Proben ein RNA-Größenstandard (RNA Ladder, New England BioLabs, Frankfurt) aufgetragen. Die Visualisierung der RNA erfolgt durch Fluoreszenz des eingelagerten Ethidiumbromids unter UV-Licht.

3.3.3 Transferverfahren für RNA

Der Transfer von RNA-Molekülen aus einem Agarosegel auf eine Membran, auch Northern-Blot genannt, erfolgt über Kapillarkräfte.

10 \times SSC-Puffer: 1,5 M NaCl
0,15 M Na₃-Citrat (pH 7,0)

Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung wird das Gel mit den offenen Taschen nach oben orientiert, luftblasenfrei auf eine mit Transferpuffer (10 \times SSC) getränkte Nylonmembran (Hybond-N, Amersham Life Science, Freiburg) gelegt. Diese befindet sich auf einem Stapel (10-15 cm) aus saugfähigem Zellstoffpapier, der von zwei Lagen getränktem Filterpapier (Whatman 3MM) bedeckt wird. Sowohl die Membran als auch das Filter- und Zellstoffpapier werden vorher in der Größe des Gels ausgeschnitten. Auf das Gel wird ein etwa 20 cm langer Filterpapierstreifen (Whatman 3MM) gelegt, der auf einer Seite in ein Reservoir aus 10 \times SSC-Puffer taucht. Der Transfer erfolgt über Nacht vertikal von oben nach unten. Durch abschließendes Bestrahlen mit UV-Licht (120000 μ Joule) wird die RNA kovalent auf der Membran fixiert.

3.4 Verfahren mit Desoxyribonukleinsäuren (DNA)

3.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Dem verwendeten Verfahren zur Isolierung von Plasmid-DNA liegt ein alkalischer Aufschluss der Bakterien zugrunde. Die bakterielle genomische DNA lässt sich neben unerwünschten Proteinen selektiv durch Erniedrigung des pH-Werts aus dem Lysat ausfällen, so dass die Plasmid-DNA im Überstand verbleibt.

P1 (Resuspensionspuffer): 50 mM Tris/HCl (pH 8)
10 mM EDTA
100 µg/ml RNaseA

P2 (Lysepuffer): 0,2 M NaOH
1 % SDS

P3 (Neutralisationspuffer): 3 M Kaliumacetat (pH 5,5)

Die Bakterienkultur mit dem entsprechenden rekombinanten Plasmid wird über Nacht in 3 ml LB_{Amp}-Medium bei 37°C und 300 Upm in einem Schüttelinkubator angezogen. 1,5 ml der Übernachtskultur werden in ein Eppendorf-Gefäß überführt und 30 sek. bei Raumtemperatur mit 14000 Upm (12000 × g) sedimentiert. Der Überstand wird verworfen und das Sediment in 300 µl Puffer P1 resuspendiert. Die Zellen werden durch Zugabe von 300 µl Puffer P2 und vorsichtigem Invertieren innerhalb von 5 min aufgeschlossen. Die Suspension wird durch Zugabe von 300 µl Puffer P3 neutralisiert und 10 min auf Eis inkubiert. Die präzipitierte genomische DNA und bakterielle Proteine werden durch Zentrifugation (10 min, 12000 × g) abgetrennt und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der Lösung werden anschließend 600 µl Isopropanol zugesetzt, um die Plasmid-DNA auszufällen. Nach Zentrifugation (15 min, 12000 × g) wird das Präzipitat mit 500 µl gekühltem 70 % Ethanol gewaschen (10 min, 12000 × g) und anschließend an der Luft getrocknet. Die DNA wird in 30 µl Wasser gelöst und bei -20°C gelagert.

3.4.2 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Um weitere Manipulationen oder Charakterisierungen an der DNA vornehmen zu können, muss die Plasmid-DNA mit Hilfe von spezifischen Restriktionsendonukleasen gespalten werden. Die DNA wird in einem Endvolumen von 0,1 µg/µl gelöst und mit mindestens einem Unit Restriktionsenzym je Mikrogramm DNA versetzt. Die Zusammensetzung des Reaktionspuffers wird entsprechend den Vorgaben der Herstellerfirma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) variiert. In der Regel erfolgt der enzymatische Verdau bei 37°C innerhalb von 60 min und wird durch Zugabe eines Stopp-Puffers (z.B. DNA-Ladungspuffer) beendet. Die erfolgreiche Restriktion lässt sich anschließend durch Gelelektrophorese überprüfen.

3.4.3 Auftrennung von DNA

3.4.3.1 Elektrophoretische Auftrennung

DNA-Fragmente lassen sich durch Elektrophorese in Abhängigkeit ihrer Größe in Agarosegelen auftrennen. Je nach zu erwartender Fragmentgröße werden 1 %ige (Fragment > 500 bp) oder 2 %ige Agarosegele (Fragment < 500 bp) eingesetzt.

50 × TAE-Puffer : 2 M Tris/Essigsäure (pH 8,0)
 0,05 M EDTA (pH 8,0)

Ladungspuffer 1: 2,0 % Ficoll
5 × PP 0,5 % SDS
 0,05 M EDTA
 0,2 % Orange G
 10 % Glycerin
 mischen und steril filtrieren

Ladungspuffer 2: 50 % Glycerin
6 × PP 7,5 mM EDTA
 0,4 % Xylenyanol
 0,4 % Bromphenolblau

Zur Herstellung der Elektrophoresegele wird die notwendige Menge Agarose mit 1 × TAE-Puffer aufgekocht und nach kurzem Abkühlen mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die DNA-Lösungen werden mit der entsprechenden Menge Ladungspuffer versehen und parallel mit einem DNA-Größenstandard (1 kb DNA-Leiter; Gibco BRL, Eggenstein) aufgetragen. Als Puffersystem fungiert 1 × TAE-Puffer, wobei die Gelelektrophorese bei einer Spannung von 5-10 V/cm durchgeführt wird. DNA-Banden können nach Beendigung der Elektrophorese unter UV-Licht durch Fluoreszenz des eingelagerten Ethidiumbromids sichtbar gemacht werden und als Grafik-Datei oder Polaroidbild dokumentiert werden (Image Master VDS; Pharmacia Biotech, Freiburg).

3.4.3.2 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die unter UV-Licht sichtbar gemachten DNA-Banden werden mit dem umgebenden Agarosegel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Reinigung der DNA von dem anhaftenden Gel und dem Ethidiumbromid erfolgt mit dem QIAEX[®] II Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden). QIAEX II Partikel adsorbieren effektiv Nukleinsäuren aus Lösungen mit hoher Salzkonzentration und einem pH-Wert ≤ 7,5. Verunreinigende Bestandteile wie Agarose, Proteine, Salz oder Ethidiumbromid werden in zwei Waschschrritten entfernt. Die gereinigte DNA wird anschließend mit Wasser eluiert.

Die genaue Durchführung ist dem Herstellerprotokoll zu entnehmen.

3.4.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Durch den Einsatz Sequenz-spezifischer Primer lassen sich DNA-Fragmente mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifizieren. Die Komponenten für eine PCR-Reaktionen werden in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß im Eisbad zusammengestellt:

PCR-Ansatz (50 µl):

- 10 ng DNA-Matrize
- 2 µl Primer 1 (10 µM)
- 2 µl Primer 2 (10 µM)
- 2 µl dNTPs (5 mM)
- 2,5 µl MgCl₂ (50 mM)
- 5 µl 10 × Reaktionspuffer
- 0,2 µl Taq-Polymerase (5U/µl)
- x µl Wasser, Endvolumen 50 µl

Die PCR-Reaktionen werden in einem Thermocycler (Hybaid, Heidelberg) bei folgenden Bedingungen durchgeführt:

	cDNA-Kontrolle	OMT-Sonde	Klonierung
Primer	T3 / T7	MTs I / MTas II	MTsBamH / MTasXho
DNA-Vorlage	Phagen	Phagen	MT4-Fragment*
Vordenaturierung	94°C / 3 min	94°C / 3 min	94°C / 3 min
Denaturierung	94°C / 30 sek	94°C / 30 sek	94°C / 45 sek
Annealing	35× 50°C / 30 sek	50°C / 30 sek	55°C / 30 sek
Amplifikation	72°C / 30 sek	72°C / 20 sek	72°C / 60 sek
Verlängerung	72°C / 4 min	72°C / 4 min	72°C / 10 min

* Zum Einsatz kam das durch *EcoRI*- und *XhoI*-Restriktion gewonnene Fragment des MT 4-Klons. Aufgrund der *BamHI*-Schnittstelle im pBluescript-Vektor lagerte sich der MtsBamH-Primer an der falschen Position an und führte zu einem verlängerten Fragment.

Der komplette Reaktionsansatz wird im Agarosegel aufgetrennt und das entsprechende Fragment aus dem Gel geschnitten. Dient die PCR nur der Kontrolle, so werden 10 % des Ansatz aufgetragen.

3.4.5 Klonierung von DNA-Fragmenten

3.4.5.1 Klonierung von PCR-Produkten

Die *Taq*-Polymerase weist eine matrizenunabhängige terminale Transferaseaktivität für dATP auf, die ein einzelnes Desoxyadenosin (A) an das 3'-Ende eines PCR-Produkt anhängt. Diese Eigenschaft macht sich das „Topo TA Cloning“ System (Invitrogen; Groningen, NL) zunutze. In diesem Kit wird ein linearisierter Vektor (pCR[®]2.1 TOPO) bereit gestellt, der über einzelne Desoxythymidin-Überhänge an den 3'-Enden verfügt und somit eine effiziente Ligation mit PCR-Produkten zulässt. Da an den freien Ende des Vektors eine Topoisomerase konjugiert ist, wird die Durchführung der Ligation bei Raumtemperatur innerhalb von fünf Minuten ermöglicht. Das Prinzip der TOPO TA-Klonierung ist in Abb. 35 dargestellt.

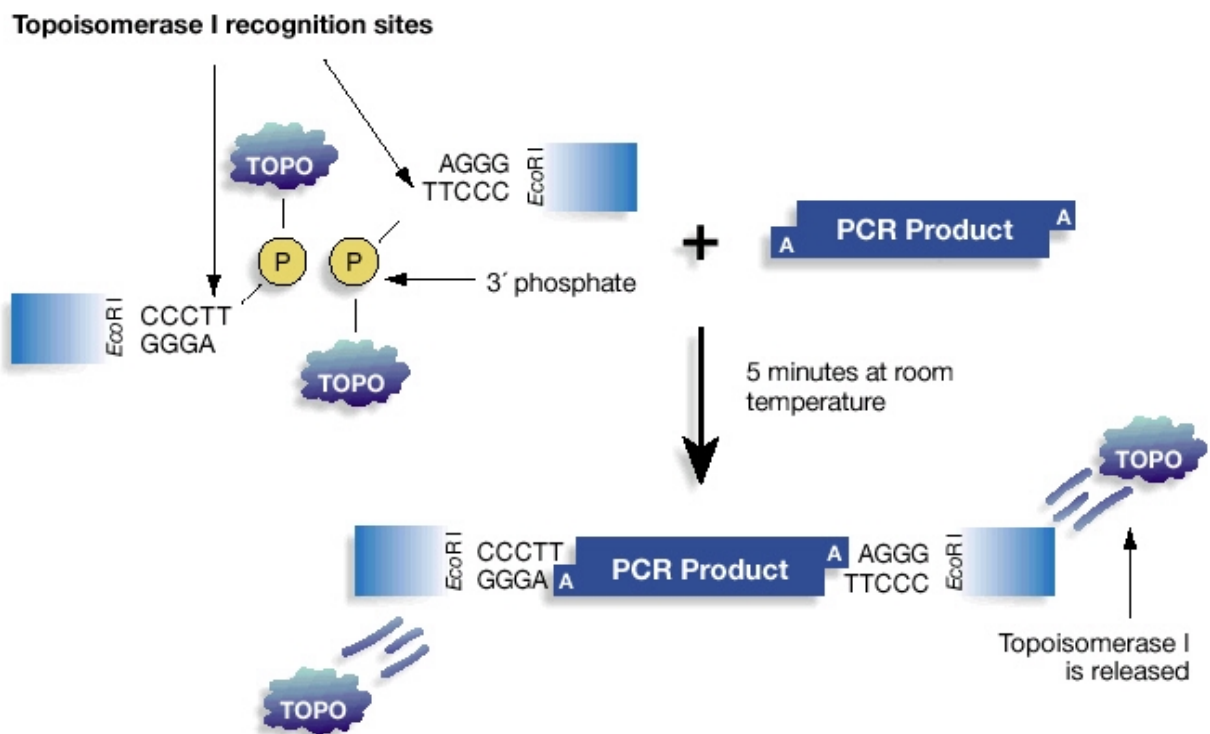


Abb. 35 Schematische Darstellung des Klonierungsprinzips mit dem pCR[®]2.1-TOPO-Vektor (Invitrogen; Groningen, Niederlande) (Quelle: www.invitrogen.com).

Die Polylinkerregion des pCR[®]2.1-Vektors weist unterschiedliche Restriktionsschnittstellen und vier verschiedene Primersequenzen auf, die die Sequenzierung des inserierten DNA-Fragments erlauben (vgl. Kap. F 3.2). Des Weiteren enthält der Vektor die Resistenzgene gegen die Antibiotika Ampicillin und Kanamycin, die zur Selektion herangezogen werden können.

Die Ligrationsreaktion wird dem Herstellerprotokoll entsprechend angesetzt und nach 5 min abgestoppt. Sie kann unmittelbar für die Transformation in die ebenfalls mit dem Kit gelieferten *E. coli* One Shot[®] TOP10 bzw. TOP10F' Zellen eingesetzt werden.

3.4.5.2 Standardverfahren mittels Ligase

Bei einer Ligationsreaktion beeinflusst das molare Verhältnis von linearisiertem Vektor zu cDNA die Effizienz der gewünschten Ligation. Ein Missverhältnis fördert die Religation des Vektors und die Bildung von cDNA-Concatemeren. Für eine optimale Ligation sollte ein Konzentrationsverhältnis [V] Insertion zu Vektor von 3 : 1 vorliegen. Die Berechnung der benötigten Menge an cDNA in Relation zur eingesetzten Menge an Vektor-DNA erfolgt nach folgender Formel:

$$x \text{ ng cDNA} = \frac{V \times \text{Länge der cDNA [bp]} \times \text{ng Vektor}}{\text{Länge des Vektors [bp]}}$$

Ein Ligationsansatz enthält folgende Komponenten:

1,5 µl 10 × T4 Ligase Puffer
 x ng cDNA
 200 ng Vektor
 1 µl T4 Ligase (1U/µl)
 x µl Wasser, Endvolumen 15 µl

Die Reaktion wird über Nacht bei 16°C inkubiert (alternativ zwei Stunden bei Raumtemperatur) und durch Inaktivierung der T4 Ligase (5 min, 75°C) beendet. 2,5 µl des Reaktionsansatzes werden für die nachfolgende Transformation in den *E. coli* Stamm DH5α eingesetzt.

3.4.5.3 Transformation von *Escherichia coli*

SOC-Medium: 20 g Trypton
 5 g Hefeextrakt
 0,5 g NaCl
 10 ml 250 mM KCl
 5 ml 2 M MgCl₂
 mit Wasser auf 980 ml auffüllen und autoklavieren
 20 ml 1 M Glucose (steril)

Die Hitzeschock-Transformation erfolgt unabhängig von den verwendeten Zellen nach folgendem Schema:

Die kompetenten Zellen werden gefroren auf Eis inkubiert und mit dem Plasmid/der Ligation (max. 10 % der Zellen) vorsichtig vermischt. Nach 30 min auf Eis, werden die Zellen einem kurzen Hitzeschock (30 sec.) bei 42°C ausgesetzt und sofort wieder im Eisbad gekühlt. Die Bakteriensuspension wird mit SOC-Medium vermischt und eine Stunde bei 37°C mit 225 Upm geschüttelt. Ein Teil der Suspension wird auf LB_{Amp}-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Eingesetzte Mengen und Volumina:

	TOP10/TOP10F'	DH5α	BL21
komp. Zellen	50 μ l	25 - 50 μ l	250 μ l
Vektor-DNA	oder	100 ng	500 ng
Ligation	2 μ l	2,5-5 μ l	
SOC-Medium	250 μ l	300 μ l	1 ml
ausplatt. Vol/Platte	20-50 μ l	60-100 μ l	200 μ l*

*Die Suspension wird kurz sedimentiert und 800 μ l des Überstands verworfen.

3.4.6 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA erfolgte im Rahmen des SFB 251 und wurde von Susanne Michel durchgeführt.

Die Sequenzen werden nach der Kettenabbruchmethode (Sanger-Coulson-Methode) ermittelt, wobei der „Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP-Kit“ der Firma Amersham (Freiburg) und der DNA Analyzer Gene Reader 4200 (LI-COR, MWG-Biotech GmbH, Ebersberg) zum Einsatz kommen.

3.5 Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren

Zur Herstellung einer radioaktiv markierten Sonde wird das „Ready-To-GoTM“-DNA Labelling System (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) eingesetzt, dem die Methode des „Oligolabelling“ von Feinberg und Vogelstein (1984) zugrunde liegt. Eine Mischung aus Oligonukleotiden, die alle statistisch möglichen Nukleotidsequenzen abdecken, dient als Primer für eine DNA-Polymerase („Klenow-Fragment“). Durch Zusatz eines markierten Nukleotids (3000 Ci/mmol) ist die Synthese einer DNA mit hoher spezifischen Aktivität ($>10^9$ dpm/ μ g) möglich. Das System stellt ein Lyophilisat aus dATP, dGTP, dTTP, Puffersalzen, Klenow Fragment FPLCpureTM (7-12 Units) und Zufallsprimern zur Verfügung.

25-50 ng DNA werden in 45 μ l Wasser gelöst, 2-3 min bei 95-100°C denaturiert und auf Eis inkubiert. Das Lyophilisat wird in der DNA-Lösung aufgelöst, mit 5 μ l [α -³²P]dCTP gemischt und 15-30 min bei 37°C inkubiert. Nicht eingebaute Nukleotide werden anschließend über eine Sephadex G-50 Säule (ProbeQuantTM G-50; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) abgetrennt. 1 μ l der markierten DNA-Lösung werden zur Bestimmung der eingebauten Radioaktivität im Szintillationszähler (LSC 1) vermessen. Die DNA wird bei 95-100°C für 2 min denaturiert und auf Eis inkubiert.

3.6 Hybridisierung von Nukleinsäuren

Die Membran mit der fixierten RNA (siehe Kap. D 3.3.3) wird in eine Hybridisierungsröhre gelegt, mit etwa 10 ml Hybridisierungslösung (Roti-Hybri-Quick; Roth Chemikalien, Karlsruhe) bedeckt und mindestens 30 min in einem Hybridisierungsinkubator bei 68°C vorhybridisiert. Nach Zugabe der denaturierten Sonde erfolgt die Hybridisierung bei 68°C über Nacht. Um die unspezifisch gebundene Sonde zu entfernen, wird die Membran in zwei Schritten mit steigender Stringenz (Waschlösung 1: 1 × SSC, 0,1 % SDS; Waschlösung 2: 0,1 × SSC, 0,1 % SDS) bei 68°C gewaschen. Die Membran wird kurz an der Luft angetrocknet, in Folie eingeschweißt und in eine lichtdichte Kassette auf einen Röntgenfilm (X-Ray Retina; Fotochemische Werke, Berlin) gelegt. Der Film wird eine angemessene Zeit bei -80°C belichtet und anschließend mit speziellen Entwicklungs- und Fixierlösungen entwickelt.

3.7 Herstellung einer cDNA-Bibliothek

Die Herstellung der cDNA-Bibliothek erfolgt mit dem cDNA Synthesis Kit (Kat-Nr. #200400, Version #200401-12, Stratagene; La Jolla, USA), der sich aus dem ZAP-cDNA[®] Synthesis Kit und dem ZAP-cDNA[®] Gigapack[®] III Gold Cloning Kit zusammensetzt. Das System erlaubt die gerichtete Klonierung einer cDNA Population in den Uni-ZAP[®] XR Vektor.

3.7.1 Synthese der cDNA

Das Prinzip der cDNA-Synthese ist in Abb. 36 dargestellt. In einem ersten Schritt wird mit Hilfe eines polyT-Linkerprimers und der MMLV reversen Transkriptase eine komplementäre Kopie der mRNA hergestellt, wobei ein DNA/RNA-Hybrid entsteht. Nun wird der mRNA-Strang partiell mit RNase H verdaut und die verbleibenden mRNA-Fragmente als Primer für die Zweitstrangsynthese genutzt. Durch Modifikationen an den cDNA Enden (Adapter Addition und *Xho*I-Verdau) entstehen spezifische Überhänge, die die direkte Ligation mit den Phagenarmen (Uni-ZAP XR Vektor System) ermöglichen.

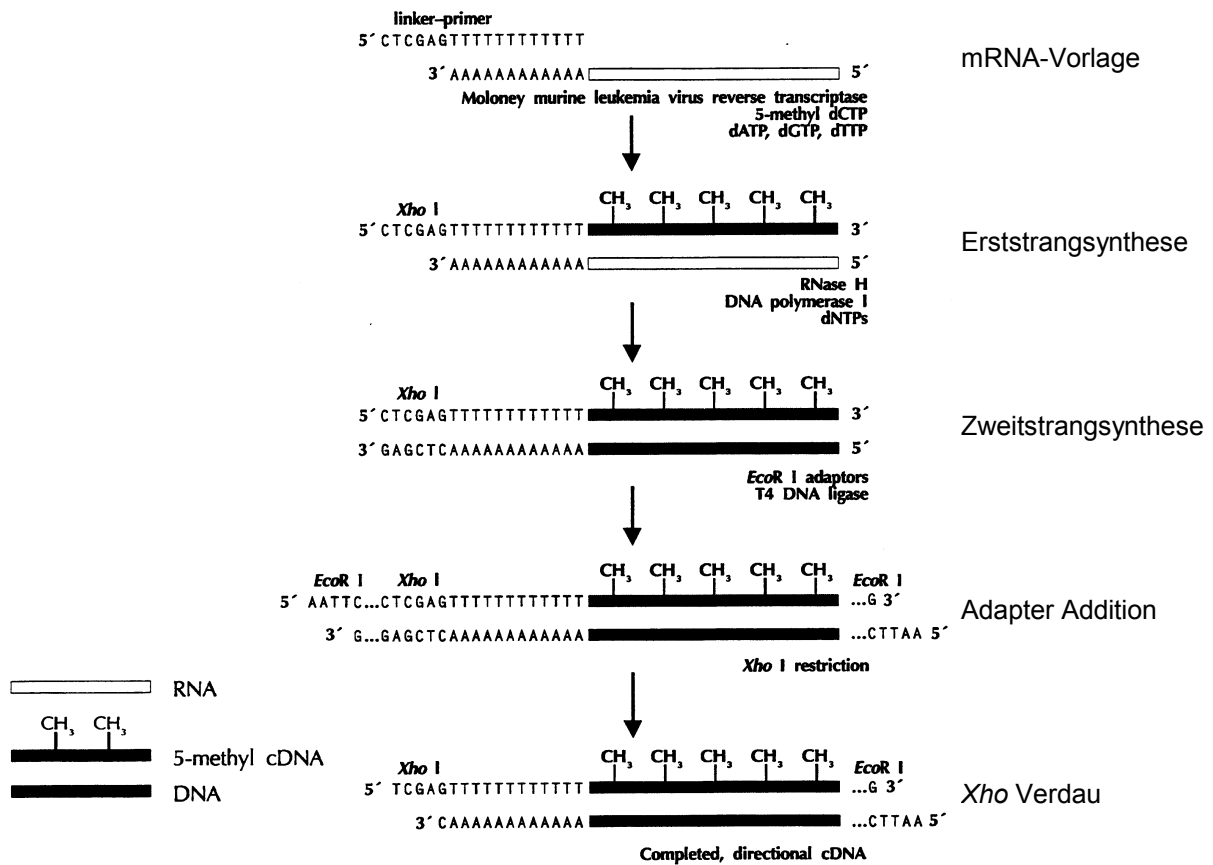


Abb. 36 Schematische Darstellung der cDNA-Synthese (Quelle: www.stratagene.com).

Alle Schritte der cDNA Synthese werden entsprechend dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Zum Einsatz kommen 3,6 µg mRNA aus roten und rot-werdenden Erdbeeren. Jeweils 10 % der Erst- und Zweitstrangsynthese werden separat mit 0,5 µl [α -³²P]dCTP inkubiert, um nachfolgend die Größenverteilung der entstandenen cDNAs dokumentieren zu können. Beide Reaktionsansätze werden zusammen mit einem Größenstandard im Agarosegel aufgetrennt. Das Gel wird im Vakuum getrocknet und in Folie eingeschweißt. Die Exposition des Röntgenfilms erfolgt bei -80°C.

Auf die Größenfraktionierung mittels einer Sepharose CL-2B Säule wird verzichtet. Stattdessen werden vor der Ligation in den Uni-Zap XR Vektor überschüssige Adapterfragmente durch Einsatz des QIAquick PCR Purification Kits (QIAGEN, Hilden) entfernt, da diese ebenfalls mit dem Vektor ligiert werden können und somit die Effizienz erheblich beeinträchtigen können.

Das cDNA-Präzipitat nach der *Xho*I Restriktion wird in 5 µl Wasser gelöst. 3,5 µl werden nach Vorschrift des QIAquick PCR Purification Kits behandelt und erneut gefällt. Die cDNA wird in 2,5 µl Wasser aufgenommen vollständig für die nachfolgende Ligation verwendet.

3.7.2 *In vitro* Verpackung und Titerbestimmung

Es werden zwei Verpackungsreaktionen entsprechend den Herstelleranweisungen durchgeführt, wobei jeweils 1 bzw. 2,5 µl der Ligationslösung zum Einsatz kommen. Insgesamt steht somit ein Milliliter der primären Phagensuspension zur Verfügung.

NZY Agar (je Liter): 5 g NaCl
 2 g MgSO₄ × 7 H₂O
 5 g Hefeextrakt
 10 g NZ Amin (Casein-Hydrolysat)
 15 g Agar

NZY Topagar: 5 g NaCl
(je Liter) 2 g MgSO₄ × 7 H₂O
 5 g Hefeextrakt
 10 g NZ Amin (Casein-Hydrolysat)
 7 g Agarose

Die Titerbestimmung wird mit dem Wirtstamm *E. coli* XL1-Blue MRF' durchgeführt. Die Wirtszellen werden in LB-Medium, das 0,2 % Maltose und 10 mM MgSO₄ enthält, bis zur einer OD₆₀₀ von 1,0 vermehrt. Anschließend werden die Zellen sedimentiert und in 10 mM MgSO₄-Lösung bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 verdünnt. 10 µl bzw. 50 µl der verdünnten Phagensuspension (1:10) werden mit 200 µl Wirtszellen gemischt und 15 min bei 37°C inkubiert. Die Suspension wird mit 3 ml flüssigem NZY-Topagar vermischt, auf vorgewärmte NZY-Agarplatten ausgestrichen und 6-8 Std. bei 37°C inkubiert. Die Anzahl an sichtbaren Plaques ergibt den Phagentiter je µl bzw. je 5 µl.

Zur Überprüfung des prozentualen Anteils an rekombinanten Phagen werden zehn willkürlich ausgesuchte Phagenplaques mit einer Pipette ausgestochen und in 150 µl Phagenpuffer (SM Puffer) suspendiert. 2 µl der Phagensuspension werden als DNA-Vorlage für die PCR (siehe Kap. D 3.4.4) eingesetzt.

3.7.3 Amplifikation der cDNA-Bibliothek

Da primäre Phagenlösungen instabil sein können, werden diese durch Amplifikation in eine stabilere Kopie mit einem größeren verfügbaren Endvolumen überführt. Die einzelnen Amplifikationsschritte werden gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Es werden zweimal 300 µl Phagensuspension eingesetzt. Die Wirtszellen werden entgegen dem Protokoll mit 10 mM MgSO₄-Lösung auf eine OD₆₀₀ von 1,0 verdünnt.

Der Titer der amplifizierten cDNA-Bibliothek wird nach dem oben beschriebenen Verfahren ermittelt. Insgesamt stehen nach erfolgreicher Amplifikation 2 × 9 ml Suspension mit 8,5 × 10⁹ PFU/ml zur Verfügung.

3.7.4 Screeningverfahren

Zur Herstellung der Sonde wird eine PCR mit den Primern MTs I und MTas II und 2 µl Phagensuspension durchgeführt. Das PCR-Produkt wird im Agarosegel aufgetrennt, ausgeschnitten und gereinigt. Um die Sequenz des resultierenden Fragments bestimmen zu können, wird das PCR-Produkt in den pCR2.1 TOPO Vektor kloniert. Die Markierung der Sonde erfolgt wie in Kap. D 3.5 dargestellt.

Die Phagensuspension wird, wie unter „Performing Plaque Lifts“ (cDNA Synthesis Kit Instruction Manual; Stratagene, La Jolla, USA) beschrieben, ausplattiert und auf Nylonmembranen (Hybond-N; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) übertragen. Entgegen dem Protokoll werden die Wirtszellen auf eine OD₆₀₀ von 2,0 eingestellt. Die Membranen werden 2 Std. bei 65°C in Hybridisierungslösung (0,5 M NaPi (pH 7,2), 7 % SDS, 1 % BSA, 1 mM EDTA) vorhybridisiert. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht in verschließbaren Kunststoffdosen bei 65°C im Schüttelbad. Die Membranen werden sukzessive mit 2 × SSC/0,1 % SDS und 1 × SSC/0,1 % SDS gewaschen und auf Filterpapier leicht getrocknet. Jede Membran wird einzeln in Folie eingeschweißt und auf ein Filterpapier aufgeklebt. Ein Röntgenfilm wird mehrere Stunden (u. U. bis zu zwei Tage) mit den Membranen bei -80°C exponiert und anschließend entwickelt.

Plaques, die auf dem Röntgenfilm ein positives Signal ergeben, werden mit dem dicken Ende einer Pasteurpipette ausgestochen und in 500 µl SM Puffer (mit 20 µl Chloroform) suspendiert. 7 µl dieser neuen Phagensuspension werden erneut ausplattiert und der Vorgang aus Plaquetransfer und Hybridisierung wiederholt. Diese Behandlung wird bei Bedarf noch ein bis zwei Mal wiederholt. Sobald die Signale auf dem Röntgenfilm einzelnen, isolierten Plaques zugeordnet werden können, werden diese mit der dünnen Seite der Pasteurpipette ausgestochen und in 400 µl SM Puffer (mit 15 µl Chloroform) resuspendiert.

3.7.5 *In vivo* Exzision

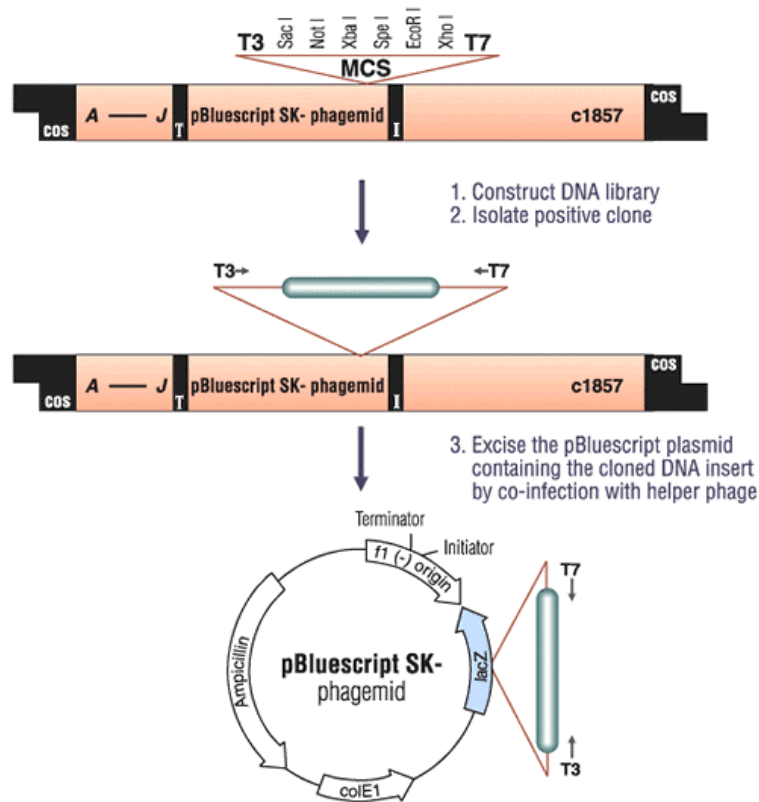


Abb. 37 Schematische Darstellung der *in vivo* Exzision des pBluescript Phagemids (Quelle: www.stratagen.com).

Bei diesem Verfahren wird aus dem lambda Phagen Genom (Uni-ZAP XR Vector) selektiv die Sequenz des pBluescript SK Phagemids einschließlich einer vorhandenen Insertion entfernt und zum Phagemid rezykliert (Abb. 37). Ein Ausschnitt aus der Polylinker-Region des pBluescript Phagemids ist im Anhang abgebildet.

Das sogenannte „Single-Clone Excision Protocol“ (siehe cDNA Synthesis Kit Instructual Manual; Stratagene, USA) wird bei jeder durch das Screening Verfahren gewonnenen Phagensuspension angewandt. Die Vorgehensweise ist dem Herstellerprotokoll zu entnehmen. Die *E. coli* Zellen (Stamm SOLR), die das jeweilige Phagemid tragen, werden abschließend ausplattiert. Von jeder Platte wird eine einzelne Kolonie gewählt und das Plasmid, wie in Kap. D 3.4.1 beschrieben, isoliert.

3.8 Heterologe Expression

Epicurian Coli BL21(DE3) Zellen, die den Vektor pGEX-MT tragen, werden in 400 ml LB_{Amp}-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 vermehrt. Die Expression wird durch Zugabe von 0,3 M IPTG induziert und 16 Std. bei 16-18°C mit 150 Upm geschüttelt. Alle folgenden Schritte werden entweder unter Eiskühlung oder bei 4°C durchgeführt. Die Zellen werden 10 min bei 3000 × g sedimentiert. Der Niederschlag wird in 20 ml gekühltem Extraktionspuffer (EB-Puffer: PBS, 5 mM β-Mercaptoethanol, 5 % Glycerin) resuspendiert und 6 × 5 sek. sonifiziert (Verstärkerstufe 4). Die Zelltrümmer werden 15 min bei 15000 × g abgetrennt. Das Zentrifugat wird mit 100 µl GST-Affinity Resins (Stratagene; La Jolla, USA) versetzt und 90 min bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Resins werden 5 min bei 500 g sedimentiert und vier bis fünf Mal mit 1-2 ml EB-Puffer gewaschen, um anschließend mit 200 µl EB-Puffer und 10 µl Thrombin-Lösung (0,2 NIH Units) versetzt zu werden. Nach Inkubation über Nacht wird die Suspension 5 min bei 500 × g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Proteinextrakt kann direkt für alle weiteren Untersuchungen eingesetzt werden. Die Isolierung des Fusionsproteins erfolgt mit einer 5 mM Glutathionlösung.

3.9 Verfahren mit Proteinen

3.9.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Kontrolle des gewonnenen Proteinextrakts wird eine Auftrennung im 10 %igen Polyacrylamid-Gel durchgeführt, das sich folgendermaßen zusammensetzt (nach Neville 1971):

Trenngel: 424 mM Tris/HCl (pH 9,18), 10 % Polyacrylamid, 0,1 % SDS, 0,045 % TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin), 0,06 % APS (Ammoniumpersulfat)

Sammelgel: 54 mM Tris/H₂SO₄ (pH 6,1), 6 % Polyacrylamid, 0,1 % SDS, 0,1 % TEMED, 0,1 % APS

Unterpuffer: 424 mM Tris/HCl (pH 9,18)

Oberpuffer: 41 mM Tris/Borsäure (pH 8,64), 0,1 % SDS

10 µl der Proteinlösung werden mit 5 µl 25 % SDS versetzt und 10 min bei 100°C denaturiert. Nach kurzem Abkühlen werden die Proben mit 5 µl Proteinauftragungspuffer (Roti[®]-Load 1; Roth, Karlsruhe) gemischt und bei konstanter Stromstärke (30 mA) im Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Molekulargewichtsmarker dienen Roti[®]-Mark 10-100 (Roth, Karlsruhe) oder SDS-Protein-Standard (Sigma, Deisenhofen).

Die Detektion erfolgt durch Coomassie- oder Silberfärbung.

Coomassie-Färbung:

Lösung 1: 120 ml Methanol
 24 ml Essigsäure
 0,33 g Coomassie Blau
 120 ml Wasser

Lösung 2: 10 % Methanol
 7 % Essigsäure

Das Gel wird ca. eine Stunde in Lösung 1 gefärbt, mehrmals mit Wasser gewaschen (u.U. kurz in der Mikrowelle aufkochen) und über Nacht in Lösung 2 entfärbt.

Silber-Färbung (nach Blum und Mitarbeiter 1987):

Das Protein-Gel wird nach folgendem Schema behandelt:

Vorgang	Lösung	Dauer
Fixieren	50 % Methanol, 12 % Essigsäure, 37 % Formaldehyd (0,5 ml/l)	≥ 60 min
Waschen	50 % Methanol	3 × 20 min
Vorbehandeln	Na ₂ S ₂ O ₃ · 5 H ₂ O (0,2 g/l)	1 min
Waschen	H ₂ O	3 × 20 sek.
Imprägnieren	AgNO ₃ (2 g/l), 37 % Formaldehyd (0,75 ml/l)	20 min
Waschen	H ₂ O	2 × 20 sek.
Entwickeln	Na ₂ CO ₃ (60 g/l), 37 % Formaldehyd (0,5 ml/l), Na ₂ S ₂ O ₃ · 5 H ₂ O (4 mg/l)	bis zu 10 min
Waschen	H ₂ O	2 × 2 min
Abstoppen	50 % Methanol, 12 % Essigsäure	10 min
Waschen	50 % Methanol	≥ 20 min

3.9.2 Konzentrationsbestimmung

(modifiziert nach Eckert und Kartenbeck 1997)

Bradford-Lösung: 20 mg Coomassie Brilliantblau G
9,4 ml Ethanol
20 ml Phosphorsäure, mind. 85 % ig
mindestens 3 Std. rühren, mit Wasser auf 200 ml auffüllen und filtrieren

50 µl der Proteinlösung werden mit 650 µl Bradford-Lösung gemischt und mindestens 5 min (max. 30 min) bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion wird bei 595 nm gegen den Leerwert bestimmt (Gerät: UV 2).

Zur Aufnahme der Eichgeraden (Abb. 38) werden 0,5 - 6,0 µg BSA (Rinderserumalbumin Fraktion V; Sigma, Deisenhofen) in 100 µl Extraktionspuffer (siehe Kap. D 3.8) gelöst und wie oben beschrieben vermessen. Für den Leerwert wird Extraktionspuffer eingesetzt.

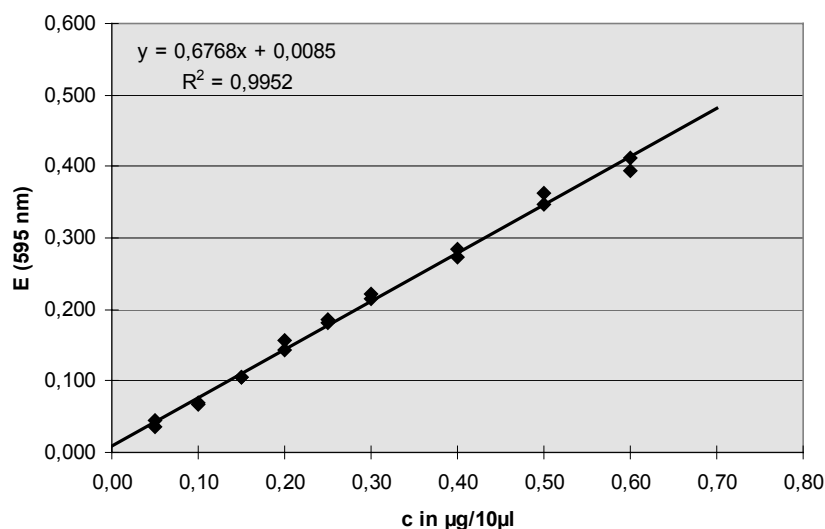


Abb. 38 Eichgerade zur Proteinbestimmung. Als Standard wurde Rinderserumalbumin (BSA) eingesetzt.

Die Proteinextrakte werden direkt vermessen, wobei Extraktionspuffer mit Thrombin als Leerwert eingesetzt werden.

3.10 Aktivitätsassay

3.10.1 Durchführung

50 μl des Proteinextrakts werden mit 1 μM - 1 mM (bzw. 0,1 - 20 mM) Substrat und 9,1 μM ^{14}C -SAM (1 μl) 30 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wird mit 6 μl 6 N HCl gestoppt und der Ansatz zwei Mal mit je 800 μl Ethylacetat extrahiert (nur 600 μl abnehmen). Die organischen Phasen werden vereinigt, mit 4 ml Szintillationscocktail versehen und im Szintillationszähler (LSC 1) analysiert.

Inkubationen mit Kaffeeoyl-CoA werden wie folgt aufgearbeitet (Meng und Campbell 1998): Zur Hydrolyse des CoA-Esters werden 11 μl 5 N NaOH zugesetzt und 15 min bei 40°C inkubiert. Anschließend wird mit 13 μl 6 N HCl angesäuert und wie oben beschrieben mit Ethylacetat extrahiert.

3.10.2 Produkt-Analyse

Nach der enzymatischen Umsetzung wird die Reaktion wie oben dargestellt abgestoppt bzw. hydrolysiert. Die Reaktionsprodukte werden zwei Mal mit je 800 μl Diethylether extrahiert (600 μl abnehmen), über Na_2SO_4 getrocknet und im Stickstoffstrom abgeblasen. Die Produkte werden in 100 μl Wasser aufgenommen und über HPLC getrennt (HPLC 1-1b, UV-Detektor: 284 nm). Fraktionen von jeweils einer Minute werden gesammelt, mit 10 ml Szintillationscocktail gemischt und im Szintillationszähler (LSC 2) analysiert.

E LITERATURVERZEICHNIS

- Acree, T.E.** (1993). Bioassays for Flavor. In: Flavor Science, Sensible Principles and Techniques. T.A. Acree und R. Teranishi (Hrsg.); American Chemical Society, Washington, DC, 1-20.
- Aharoni, A., Keizer, L.C.P., Bouwmeester, H.J., Sun, Z., Alvarez-Huerta, M., Verhoeven, H.A., Blaas, J., van Houwelingen, A.M.M.L., de Vos, R.C.H., van der Voet, H., Jansen, R.C., Guis, M., Mol, J., Davis, R.W., Schena, M., van Tunen, A.J. und O'Connell, A.P.** (2000). Identification of the *SAAT* Gene Involved in Strawberry Flavor Biogenesis by Use of DNA Microarrays. *Plant Cell* **12**, 647-661.
- Angyal, S.J., Bethell, G.S., Cowley, D.E. und Pickles, V.A.** (1976). Equilibria Between Pyranoses and Furanoses. IV 1-Deoxyhexuloses and 3-Hexuloses. *Aust. J. Chem.* **29**, 1239-47.
- Blank, I., Sen, A. und Grosch, W.** (1992). Potent Odorants of the Roasted Powder and Brew of Arabica Coffee. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **195**, 239-245.
- Blum, H., Beier, H. und Gross, H.J.** (1987). Improved Silver Staining of Plant Proteins, RNA and DNA in Polyacrylamide Gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99.
- Bruche, G., Dietrich, A. und Mosandl, A.** (1995). Stereoisomeric Flavour Compounds LXXI: Determination of the Origin of Aroma-active Dihydrofuranones. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **201**, 249-252.
- Bruche, G., Schmarr, H.-G., Bauer, A., Mosandl, A., Rapp, A., und Engel, L.** (1991). Stereoisomere Aromastoffe. LI: Stereodifferenzierung chiraler Furanone. Möglichkeiten und Grenzen der herkunftsspezifischen Aromastoff-Analyse. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **193**, 115-118.
- Bugos, R.C., Chiang, V.L.C. und Campbell, W.H.** (1991). cDNA Cloning, Sequence Analysis and Seasonal Expression of Lignin-Bispecific Caffeic Acid/5-Hydroxyferulic Acid *O*-Methyltransferase of Aspen. *Plant Mol. Biol.* **17**, 1203-1215.
- Busam, G., Junghanns, K.T., Kneusel, R.E., Kassemeyer, H.-H. und Matern, U.** (1997). Characterization and Expression of Caffeoyl-Coenzyme A 3-*O*-Methyltransferase Proposed for the Induced Resistance Response of *Vitis vinifera* L. *Plant Physiol.* **115**, 1039-1048.
- Buttery, R.G., Takeoka, G.R., Krammer, G.E. und Ling, L.C.** (1994). Identification of 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone (Furaneol) and 5-Methyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone in Fresh and Processed Tomato. *Lebensm.-Wiss. Technol.* **27**, 592-594.
- Buttery, R.G.; Takeoka, G.R. und Ling, L.C.** (1995). Furaneol: Odor Threshold and Importance to Tomato Aroma. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 1638-1640.
- Chen, C.-W., Shu, C.-K. und Ho, C.-T.** (1996). Photosensitized Oxidative Reaction of 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 2361-2365.

- Cheng, G.W. und Breen, P.J.** (1991). Activity of Phenylalanine Ammonia-Lyase (PAL) and Concentrations of Anthocyanins and Phenolics in Developing Strawberry Fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **116**, 865-869.
- Christensen, A.B., Gregersen, P.L., Olsen, C.E. und Collinge, D.B.** (1998). A Flavonoid 7-O-Methyltransferase is Expressed in Barley Leaves in Response to Pathogen Attack. *Plant Mol. Biol.* **36**, 219-227.
- Cornish-Bowden, A.** (1995). Fundamentals of Enzyme Kinetics. Portland Press Ltd., London.
- Cramer, F., Otterbach, H. und Springmann, H.** (1959). Eine Synthese der 6-Desoxy-6-amino-glucose. *Chem. Ber.* **92**, 384-391.
- De Boer, T.J. und Backer, H.J.** (1956). Diazomethane. *Org. Synt.* **36**, 16-19.
- Dirinck, P.J., De Pooter, H.L., Willaert, G.A. und Schamp, N.M.** (1981). Flavor Quality of Cultivated Strawberries: The Role of the Sulfur Compounds. *J. Agric. Food Chem.* **29**, 316-321.
- Dixon, R.A., Chen, F., Guo, D. und Parvathi, K.** (2001). The Biosynthesis of Monolignols: A "Metabolic Grid", or Independent Pathways to Guaiacyl and Syringyl Units? *Phytochem.* **57**, 1069-1084.
- Douillard, C. und Guichard, E.** (1989). Comparison by Multidimensionnal Analysis of Concentrations of Volatile Compounds in Fourteen Frozen Strawberry Varieties. *Sci. Aliments* **9**, 53-76.
- Durrwachter, J.R., Drucekhammer, D.G., Nozaki, K., Sweers, H.M. und Wong, C.-H.** (1986). Enzymatic Aldol Condensation/Isomerization as a Route to Unusual Sugar Derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 7812-7818.
- Eckert, W.A. und Kartenbeck, J.** (1997). Proteine: Standardmethoden der Molekular- und Zellbiologie. Springer Verlag, Berlin.
- Fauman, E.B., Blumenthal, R.M. und Cheng, X.** (1999). Structure and Evolution of AdoMet-Dependent Methyltransferases. In: S-Adenosylmethionine-Dependent Methyltransferases: Structure and Functions. X. Cheng und R.M. Blumenthal (Hrsg.); World Scientific Publishing, Singapore, 1-38.
- Fay, L.B., Huynh-Ba, T. und Blank, I.** (1997). Study of the Fragmentation of 3(2H)-Furanones by Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 4057-4064.
- Feinberg, A.P. und Vogelstein, B.** (1984). A Technique for Radiolabeling DNA Restriction Endonuclease Fragments to High Specific Activity. Addendum. *Anal. Biochem.* **137**, 266-267.
- Fischer, N. und Hammerschmidt, F.-J.** (1992). A Contribution to the Analysis of Fresh Strawberry Flavour. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* **14**, 141-148.
- Flath, R.A. und Forrey, R.R.** (1970). Volatile Components of Smooth Cayenne Pineapple. *J. Agric. Food Chem.* **18**, 306-309.

-
- Forney, C.F. und Breen, P.J.** (1986). Sugar Content and Uptake in the Strawberry Fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **111**, 241-247.
- Frick, S. und Kutchan, T.M.** (1999). Molecular Cloning and Functional Expression of *O*-Methyltransferases Common to Isoquinoline Alkaloid and Phenylpropanoid Biosynthesis. *Plant J.* **17**, 329-339.
- Gauthier, A., Gulick, P.J. und Ibrahim, R.K.** (1996). cDNA Cloning and Characterization of a 3[′]/5[′]-*O*-Methyltransferase for Partially Methylated Flavonols from *Chrysosplenium americanum*. *Plant. Mol. Biol.* **32**, 1163-1169.
- Gauthier, A., Gulick, P.J. und Ibrahim, R.K.** (1998). Characterization of Two cDNA Clones Which Encode *O*-Methyltransferases for the Methylation of both Flavonoid and Phenylpropanoid Compounds. *Arch. Biochem. Biophys.* **351**, 243-249.
- Georgilopoulos, D.N. und Gallois, A.N.** (1987). Aroma Compounds of Fresh Blackberries (*Rubus laciniata* L.). *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **184**, 374-380.
- Giraud, M.-F. und Naismith, J.H.** (2000). The Rhamnose Pathway. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 687-696.
- Goiffon, J.-P., Brun, M. und Bourrier, M.-J.** (1991). High-Performance Liquid Chromatography of Red Fruit Anthocyanins. *J. Chromatogr.* **537**, 101-121.
- Goiffon, J.-P., Mouly, P.P. und Gaydou, E.M.** (1999). Anthocyanic Pigment Determination in Red Fruit Juices, Concentrated Juices and Syrups Using Liquid Chromatography. *Anal. Chim. Acta* **382**, 39-50.
- Gunata, Y.Z., Bayonove, C.L., Baumes, R.L. und Cordonnier, R.E.** (1985). The Aroma of Grapes. I. Extraction and Determination of Free and Glycosidically Bound Fractions of Some Grape Aroma Components. *J. Chromatogr.* **331**, 83-90.
- Häkkinen, S., Heinonen, M., Kärenlampi, S., Mykkänen, H., Ruuskanen, J. und Törrönen, R.** (1999). Screening of Selected Flavonoids and Phenolic Acids in 19 Berries. *Food Res. Int.* **32**, 345-353.
- Hallis, T.M. und Liu, H.-W.** (1999). Learning Nature's Strategies for Making Deoxy Sugars: Pathways, Mechanisms, and Combinatorial Applications. *Acc. Chem. Res.* **32**, 579-588.
- Hancock, J.F.** (1999). Crop Production Science In Horticulture 11: Strawberries. CABI Publishing, Oxon, UK.
- Haque, M.E., Kikuchi, T., Kanemitsu, K. und Tsuda, Y.** (1987). Selective Deoxygenation via Regioselective Thioacylation of Non-protected Glycopyranosides by the Dibutyltin Oxide Method. *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 1016-1029.
- Havkin-Frenkel, D., Podstolski, A., Witkowska, E., Molecki, P. und Mikolajczyk, M.** (1999). Vanillin Biosynthetic Pathways. In: Plant Cell Tissue Cult. Prod. Food Ingredients. T.-J. Fu, G. Singh und W.R. Curtis (Hrsg.); Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

- Hecquet, L., Sancelme, M., Bolte, J. und Demuynck, C.** (1996). Biosynthesis of 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone by *Zygosaccharomyces rouxii*. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 1357-1360.
- Henry, D.W. und Silverstein R.M.** (1966). A Rational Synthesis of 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone, a Flavor Component of Pineapple. *J. Org. Chem.* **31**, 2391-2394.
- Hirvi, T.** (1982). Mass Fragmentographic and Sensory Analyses in the Evaluation of the Aroma of Some Strawberry Varieties. *Lebensm.-Wiss. Technol.* **16** (3), 157-161.
- Hirvi, T. und Honkanen, E.** (1982). The Volatiles of Two New Strawberry Cultivars, „Annelie“ and „Alaska Pioneer“, Obtained by Backcrossing of Cultivated Strawberries with Wild Strawberries, *Fragaria vesca*, Rügen and *Fragaria virginiana*. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **175**, 113-116.
- Hirvi, T., Honkanen, E. und Pyysalo, T.** (1980). Stability of 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone and 2,5-Dimethyl-4-methoxy-3-(2H)-furanone in Aqueous Buffer Solutions. *Lebensm.-Wiss. Technol.* **13**, 324-325.
- Hodge, J.E.** (1960). Novel Reductones and Methods of Making Them. US-Patent 2.936.308.
- Hofmann, A. und Eugster, C.H.** (1966). Synthese von 2,5-Dimethyl-3-hydroxy- Δ^2 -furenidon-(4), einer Aromakomponente der Ananasfrucht. *Helv. Chim. Acta* **49**, 53-56.
- Honkanen, E. und Hirvi, T.** (1990). The Flavour of Berries. In Food Flavours Part C. The Flavour of Fruits. I.D. Morton und A.J. Macleod (Hrsg); Elsevier: New York, 125-193.
- Honkanen, E., Pyysalo, T. und Hirvi, T.** (1980). The Aroma of Finnish Wild Raspberries, *Rubus idaeus*, L. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **171**, 180-182.
- Huber, S.C.** (1986). Fructose 2,6-bisphosphate as a Regulatory Metabolite in Plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **37**, 233-246.
- Hunter, G.L.K., Bucek, W.A. und Radford, T.** (1974). Volatile Components of Canned Alphonso Mango. *J. Food Sci.* **39**, 900-903.
- Ibrahim, R.K. und Muzac I.** (2000). The Methyltransferase Gene Superfamily: A Tree with Multiple Branches. *Recent Adv. Phytochem.* **34** (Evolution of Metabolic Pathways), 349-384.
- Ibrahim, R.K., Bruneau, A. und Bantignies, B.** (1998). Plant O-Methyltransferases: Molecular Analysis, Common Signature and Classification. *Plant Mol. Biol.* **36**, 1-10.
- Inoue, K., Parvathi, K. und Dixon, R.A.** (2000). Substrate Preferences of Caffeic Acid/5-Hydroxyferulic Acid 3/5-O-Methyltransferases in Developing Stems of Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Arch. Biochem. Biophys.* **375**, 175-182.
- Inoue, K., Sewalt, V.J.H., Ballance, G.M., Ni, W., Stürzer, C. und Dixon, R.A.** (1998). Developmental Expression and Substrate Specificities of Alfalfa Caffeic Acid 3-O-Methyltransferase and Caffeoyl Coenzyme A 3-O-Methyltransferase in Relation to Lignification. *Plant Physiol.* **117**, 761-770.

-
- Johnson, D.A. und Liu, H.-W.** (1999). Deoxysugars: Occurrence, Genetics, and Mechanisms of Biosynthesis. *Compr. Nat. Prod. Chem.* **3**, 311-365. B.M. Pinot (Hrsg.); Elsevier Science B.V., Amsterdam.
- Jones, A.R. und Morin, C.** (1995). Inhibition of Glycolysis in Boar Spermatozoa by 1,6-Dichloro-1,6-dideoxy-D-fructose. *Biochim. Biophys. Acta* **1244**, 141-146.
- Joshi, C.P. und Chiang, V.L.** (1998). Conserved Sequence Motifs in Plant S-Adenosyl-L-methionine-Dependent Methyltransferases. *Plant Mol. Biol.* **37**, 663-674.
- Kähkönen, M.P., Hopia, A.I. und Heinonen, M.** (2001). Berry Phenolics and Their Antioxidant Activity. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 4076-4082.
- Kallio, H.** (1976). Identification of Vacuum Steam-Distilled Aroma Compounds in the Press Juice of Arctic Bramble, *Rubus, arcticus* L. *J. Food Sci.* **41**, 555-562.
- König, T., Gutsche, B., Hartl, M., Hübscher, R., Schreier, P. und Schwab, W.** (1999). 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone (Sotolon) Causing an Off-Flavor: Elucidation of Its Formation Pathways during Storage of Citrus Soft Drinks. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 3288-3291.
- Larsen, M. und Poll, L.** (1992). Odour Thresholds of Some Important Aroma Compounds in Strawberries. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **195**, 120-123.
- Larsen, M., Poll, L. und Olsen, C.E.** (1992). Evaluation of the Aroma Composition of Some Strawberry (*Fragaria ananassa* Duch) Cultivars by Use of Odour Threshold Values. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **195**, 536-539.
- Ledl, F. und Schleicher, E.** (1990). Die Maillard-Reaktion in Lebensmitteln und im menschlichen Körper – neue Ergebnisse zu Chemie, Biochemie und Medizin. *Angew. Chem.* **102**, 597-626.
- Li, L., Osakabe, Y., Joshi, C.P. und Chiang, V.L.** (1999). Secondary Xylem-Specific Expression of Caffeoyl-Coenzyme A 3-O-Methyltransferase Plays an Important Role in the Methylation Pathway Associated with Lignin Biosynthesis in Loblolly Pine. *Plant Mol. Biol.* **40**, 555-565.
- Li, L., Popko, J.L., Umezawa, T. und Chiang, V.L.** (2000). 5-Hydroxyconiferyl Aldehyde Modulates Enzymatic Methylation for Syringyl Monolignol Formation, a New View of Monolignol Biosynthesis in Angiosperms. *J. Biol. Chem.* **275**, 6537-6545.
- Li, L., Popko, J.L., Zhang, X.-H., Osakabe, K., Tsai, C.-J., Joshi, C.P. und Chiang, V.L.** (1997). A Novel Multifunctional O-Methyltransferase Implicated in a Dual Methylation Pathway Associated with Lignin Biosynthesis in Loblolly Pine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 5461-5466.
- Lilie, H., Schwarz, E. und Rudolph, R.** (1998). Advances in Refolding of Proteins Produced in *E. coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**, 497-501.
- Maarse, H. und Visscher, C.A.** (Hrsg.) (1992). Volatile Compounds in Food. Qualitative and Quantitative Data. TNO Biotechnology and Chemistry Institute, Zeist, The Netherlands. 3. Ergänzungsband zur 6. Auflage 1989.

- Manning, K.** (1991). Isolation of Nucleic Acids from Plants by Differential Solvent Precipitation. *Anal. Biochem.* **195**, 45-50.
- Martinez-Barajas, E., Luethy, M.H. und Randall, D.D.** (1997). Molecular Cloning and Analysis of Fructokinase Expression in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) *Plant Sci.* **125**, 13-20.
- Martz, F., Maury, S., Pinçon, G. und Legrand, M.** (1998). cDNA Cloning, Substrate Specificity and Expression Study of Tobacco Caffeoyl-CoA 3-*O*-Methyltransferase, a Lignin Biosynthetic Enzyme. *Plant Mol. Biol.* **36**, 427-437.
- Maury, S., Geoffroy, P. und Legrand, M.** (1999). Tobacco *O*-Methyltransferase Involved in Phenylpropanoid Metabolism. The Different Caffeoyl-Coenzyme A/5-Hydroxyferuloyl-Coenzyme A 3/5-*O*-Methyltransferase and Caffeic Acid/5-Hydroxyferulic Acid 3/5-*O*-Methyltransferase Classes Have Distinct Substrate Specificities and Expression Patterns. *Plant Physiol.* **121**, 215-223.
- Maxwell, C.A., Edwards, R. und Dixon, R.A.** (1992). Identification, Purification, and Characterization of *S*-Adenosyl-L-methionine: Isoliquiritigenin 2'-*O*-Methyltransferase from Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Arch. Biochem. Biophys.* **293**, 158-166.
- Mayerl, F., Näf, R. und Thomas A.F.** (1989). 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanone Glucoside: Isolation from Strawberries and Synthesis. *Phytochem.* **28**, 631-633.
- Meng, H. und Campbell, W.H.** (1998). Substrate Profiles and Expression of Caffeoyl Coenzyme A and Caffeic Acid *O*-Methyltransferases in Secondary Xylem of Aspen During Seasonal Development. *Plant Mol. Biol.* **38**, 513-520.
- Mertens, E.** (1991). Pyrophosphate-Dependent Phosphofructokinase, an Anaerobic Glycolytic Enzyme? *FEBS Lett.* **285**, 1-5.
- Milo, C. und Reineccius, G.A.** (1997). Identification and Quantification of Potent Odorants in Regular-Fat and Low-Fat Mild Cheddar Cheese. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 3590-3594.
- Muzac, I., Wang, J., Anzellotti, D., Zhang, H. und Ibrahim, R.K.** (2000). Functional Expression of an *Arabidopsis* cDNA Clone Encoding a Flavonol 3'-*O*-Methyltransferase and Characterization of the Gene Product. *Arch. Biochem. Biophys.* **375**, 385-388.
- Nakamura, M., Seki, M. und Furusaki, S.** (1998). Enhanced Anthocyanin Methylation by Growth Limitation in Strawberry Suspension Culture. *Enzyme Microb. Technol.* **22**, 404-408.
- Nam, Y.-W., Tichit, L., Leperlier, M. Cuerq, B., Marty, I. und Lelièvre, J.-M.** (1999). Isolation and Characterization of mRNAs Differentially Expressed During Ripening of Wild Strawberry (*Fragaria vesca* L.) Fruits. *Plant Mol. Biol.* **39**, 629-636.
- Neville, D.M.** (1971). Molecular Weight Determination of Protein-Dodecyl Sulfate Complexes by Gel Electrophoresis in a Discontinuous Buffer System. *J. Biol. Chem.* **246**, 6328-6334.
- Nunomura, N., Sasaki, M. Asao, Y. und Yokotsuka, T.** (1976). Studies on Flavor Components in Shoyu. II. Isolation and Identification of 4-Hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2*H*)-furanone, as a Flavor Component in Shoyu (Soy Sauce). *Agric. Biol. Chem.* **40**, 491-495.

- Nunomura, N., Sasaki, M. und Yokotsuka, T.** (1980). Studies on Flavor Components in Shoyu. Part VI. Shoyu (Soy Sauce) Flavor Components: Acidic Fractions and the Characteristic Flavor Component. *Agric. Biol. Chem.* **44**, 339-351.
- Nyman, N.A. und Kumpulainen, J.T.** (2001). Determination of Anthocyanidins in Berries and Red Wine by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem* **49**, 4183-4187.
- Ohloff, G.** (1969). Chemie der Geruchs- und Geschmacksstoffe. *Fortschr. Chem. Forsch.* **12**, 185-253.
- Osakabe, K., Tsao, C.C., Li, L., Popko, J.L., Umezawa, T., Carraway, D.T., Smeltzer, R.H., Joshi, C.P. und Chiang, V.L.** (1999). Coniferyl Aldehyde 5-Hydroxylation and Methylation Direct Syringyl Lignin Biosynthesis in Angiosperms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 8955-8960.
- Parvathi, K., Chen, F., Guo, D., Blount, J.W. und Dixon, R.A.** (2001). Substrate Preferences of *O*-Methyltransferases in Alfalfa Suggest New Pathways for 3-*O*-Methylation of Monolignols. *Plant J.* **25**, 193-202.
- Pellegrini, L., Geoffroy, P., Fritig, B. und Legrand, M.** (1993). Molecular Cloning and Expression of a New Class of Ortho-Diphenol-*O*-Methyltransferases Induced in Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) Leaves by Infection or Elicitor Treatment. *Plant Physiol.* **103**, 509-517.
- Pérez, A.G., Olías, R., Sanz, C. und Olías, J.M.** (1996). Furanones in Strawberries: Evolution during Ripening and Postharvest Shelf Life. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 3620-3624.
- Pérez, A.G., Olías, R., Olías, J.M. und Sanz, C.** (1999). Biosynthesis of 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone and Derivatives in in Vitro Grown Strawberries. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 655-658.
- Pickenhagen, W., Velluz, A., Passerat, J.-P. und Ohloff, G.** (1981). Estimation of 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanone (FURANEOL[®]) in Cultivated and Wild Strawberries, Pineapples and Mangoes. *J. Sci. Food Agric.* **32**, 1132-1134.
- Pisarnitskii, A.F., Demechenko, A.G., Egorov, I.A. und Cvelesiani, R.K.** (1992). Methylpentoses are Probable Precursors of Furanones in Fruits. *Appl. Biochem. Microbiol.* **28**, 97-100.
- Preininger, M. und Grosch, W.** (1994). Evaluation of Key Odorants of the Neutral Volatiles of Emmentaler Cheese by the Calculation of Odour Activity Values. *Lebensm.-Wiss. Technol.* **27**, 237-244.
- Preininger, M. und Grosch, W.** (1995). Determination of 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone (HDMF) in Cultures of Bacteria. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **201**, 97-98.
- Pyysalo, T., Honkanen, E. und Hirvi, T.** (1979). Volatiles of Wild Strawberries, *Fragaria vesca* L., Compared to Those of Cultivated Berries, *Fragaria × ananassa* cv. Senga Sengana. *J. Agric. Food Chem.* **27**, 19-22.

- Rapp, A., Knipser, W., Engel, L., Ullemeyer, H. und Heimann, W.** (1980). Fremdkomponenten im Aroma von Trauben und Weinen interspezifischer Rebsorten. I. Die Erdbeernote. *Vitis* **19**, 13-23.
- Ravanel, S., Gakière, B., Job, D. und Douce, R.** (1998). The Specific Features of Methionine Biosynthesis and Metabolism in Plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 7805-7812.
- Re, L., Maurer, B. und Ohloff, G.** (1973). A Simple Synthesis of 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone (Furaneol) an Important Aroma Component of Pineapple and Strawberry. *Hel. Chim. Acta* **56**, 1882-1894.
- Rodin, J.O., Himel, C.M., Silverstein, R.M., Leeper, R.W. und Gortner, W.A.** (1965). Volatile Flavor and Aroma Components of Pineapple. I. Isolation and Tentative Identification of 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanone. *J. Food Sci.* **30**, 280-285.
- Roscher, R.** (1998). Biosynthese und Metabolismus von 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3[2*H*]-furanon (Furaneol[®]). Dissertation, Universität Würzburg.
- Roscher, R., Herderich, M., Steffen, J.-P., Schreier, P. und Schwab, W.** (1996). 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanone 6'-*O*-malonyl- β -D-glucopyranoside in strawberry fruits. *Phytochem.* **43**, 155-159.
- Roscher, R., Bringmann, G., Schreier, P. und Schwab, W.** (1998). Radiotracer Studies on the Formation of 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanone in Detached Ripening Strawberry Fruits. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 1488-1493.
- Roscher, R., Schreier, P. und Schwab, W.** (1997). Metabolism of 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanone in Detached Ripening Strawberry Fruits. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 3202-3205.
- Ross, J.R., Nam, K.H., D'Auria, J. und Pichersky, E.** (1999). *S*-Adenosyl-L-Methionine:Salicylic Acid Carboxyl Methyltransferase, an Enzyme Involved in Floral Scent Production and Plant Defense, Represents a New Class of Plant Methyltransferases. *Arch. Biochem. Biophys.* **367**, 9-16.
- Rothe, M. und Thomas, B.** (1963). Aromastoffe des Brotes. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **119**, 302-310.
- Sanz, C., Richardson, D.G. und Pérez, A.G.** (1995). 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanone and Derivatives in Strawberries During Ripening. In: Fruit Flavors, Biogenesis, Characterization, and Authentication. R.L. Rouseff und M.M. Leahy (Hrsg.); ACS Symposium Series No. 596, American Chemical Society, Washington DC, 268-275.
- Schieberle, P.** (1994). Heat-Induced Changes in the Most Odour-Active Volatiles of Strawberries. In: Trends in Flavour Research; H. Maarse und D.J. Van der Heij (Hrsg.); Elsevier: Amsterdam, S. 345-351.
- Schieberle, P. und Hofmann, T.** (1997). Evaluation of the Character Impact Odorants in Fresh Strawberry Juice by Quantitative Measurements and Sensory Studies on Model Mixtures. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 227-232.

-
- Schmidt, H.-L. und Schmelz, E.** (1980). Stabile Isotope in Chemie und Biowissenschaften. *ChiuZ* **14**, 25-34.
- Schmitt, D., Pakusch, A.-E. und Matern, U.** (1991). Molecular Cloning, Induction, and Taxonomic Distribution of Caffeoyl-CoA 3-*O*-Methyltransferase, an Enzyme Involved in Disease Resistance. *J. Biol. Chem.* **266**, 17416-17423.
- Schreier, P.** (1980). Quantitative Composition of Volatile Constituents in Cultivated Strawberries, *Fragaria ananassa* cv. Senga Sengana, Senga Litessa and Gourmella. *J. Sci. Food Agric.* **31**, 487-494.
- Schwab, W.** (1998). Application of Stable Isotope Ratio Analysis Explaining the Bioformation of 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanone in Plants by a Biological Maillard Reaction. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 2266-2269
- Schwab, W. and Roscher, R.** (1997). 4-Hydroxy-3(2*H*)-furanones: Natural and Maillard Products. *Recent Res. Devel. in Phytochem.* **1**, 643-673.
- Sen, A., Schieberle, P. und Grosch, W.** (1991). Quantitative Determination of 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanone and its Methyl Ether Using a Stable Isotope Dilution Assay. *Lebensm.-Wiss. Technol.* **24**, 364-369.
- Serianni, A.S., Nunez, H.A. und Barker, R.** (1979). Carbon-13-Enriched Carbohydrates. Preparation of Aldononitriles and their Reduction with Palladium Catalyst. *Carbohydr. Research* **72**, 71-78.
- Serianni, A.S., Nunez, H.A., Hayes, M.L. und Barker, R.** (1982). Chemical Synthesis of Monosaccharides Enriched with Carbon Isotopes. *Methods Enzymol.* **89**, 64-73.
- Seskar, M., Shulaev, V. und Raskin, I.** (1998). Endogenous Methyl Salicylate in Pathogen-Inoculated Tobacco Plants. *Plant Physiol.* **116**, 387-392.
- Sundt, E.** (1970). The Development and Future of Flavour Research. *Næringsmiddelindustrien* **23**, 5-13.
- Suutarinen, J., Änäkäinen, L. und Autio, K.** (1998). Comparison of Light Microscopy and Spatially Resolved Fourier Transform Infrared (FT-IR) Microscopy in the Examination of Cell Wall Components of Strawberries. *Lebensm.-Wiss. Technol.* **31**, 595-601.
- Takeoka, G.R., Güntert, M., Flath, R.A., Wurz, R.E. und Jennings, W.** (1986). Volatile Constituents of Kiwi Fruit (*Actinidia chinensis* Planch.). *J. Agric. Food Chem.* **34**, 576-578.
- Takeshita, N., Fujiwara, H., Mimura, H., Fitchen, J.H., Yamada, Y. und Sato, F.** (1995). Molecular Cloning and Characterization of *S*-Adenosyl-L-Methionine:Scoulerine-9-*O*-Methyltransferase from Cultured Cells of *Coptis japonica*. *Plant Cell Physiol.* **36**, 29-36.
- Ullrich, F. und Grosch, W.** (1987). Identification of the Most Intense Volatile Flavour Compounds Formed During Autoxidation of Linoleic Acid. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **184**, 277-282.
- Ulrich, D., Rapp, A. und Hoberg, E.** (1995). Analyse des Erdbeeraromas – Quantifizierung der flüchtigen Komponenten in Kulturerdbeervarietäten und der Walderdbeere. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **200**, 217-220.

- Vernon, D.M. und Bohnert, H.J.** (1992). A Novel Methyl Transferase Induced by Osmotic Stress in the Facultative Halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *EMBO J.* **11**, 2077-2085.
- Vidgren, J., Svensson, L.A. und Liljas, A.** (1994). Crystal Structure of Catechol *O*-Methyltransferase. *Nature* **368**, 354-358.
- Wang, J. und Pichersky, E.** (1999). Identification of Specific Residues Involved in Substrate Discrimination in Two Plant *O*-Methyltransferases. *Arch. Biochem. Biophys.* **368**, 172-180.
- Weilacher, T., Gleixner, G. und Schmidt, H.-L.** (1996). Carbon Isotope Pattern in Purine Alkaloids a Key to Isotope Discriminations in C₁ Compounds. *Phytochem.* **41**, 1073-1077.
- Werner, R.A.** (1998). Entwicklung neuer Verfahren für die on-line ¹⁸O/¹⁶O- und ²H/¹H- Isotopenverhältnismessung und ihre Anwendung zur Authentizitäts- und Herkunftsbestimmung bei Naturstoffen. Dissertation. Technische Universität München.
- Willem, R., Malaisse-Lagae, F., Ottinger, R. und Malaisse, W.J.** (1990). Phosphogluco-Isomerase-Catalysed Interconversion of Hexose Phosphates. *Biochem J.* **265**, 519-524.
- Willhalm, B., Stoll, M. und Thomas, A.F.** (1965). 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-2,3-dihydrofuran-3-one. *Chem. Ind.* **18**, 1629-1630.
- Wintoch, H., Krammer, G. und Schreier, P.** (1991). Glycosidically Bound Aroma Compounds from Two Strawberry Fruit Species, *Fragaria vesca* f. *semperflorens* and *Fragaria* × *ananassa*, cv. Korona. *Flavour Fragrance J.* **6**, 209-215.
- Wolfrom, M.L., Weisblat, D.I., Zophy, W.H. und Waisbrot, S.W.** (1941). The Action of Diazomethane upon Acyclic Sugar Derivatives. *J. Amer. Chem. Soc.* **63**, 201-203.
- Wolfrom, M.L., Thompson, A. und Evans, E.F.** (1945). The Action of Diazomethane upon Acyclic Sugar Derivatives. VII. D- Psicose. *J. Amer. Chem. Soc.* **67**, 1793-1797.
- Woodward, J.R.** (1972). Physical and Chemical Changes in Developing Strawberry Fruits. *J. Sci. Food Agric.* **23**, 465-473.
- Wrolstad, R.E. und Shallenberger, R.S.** (1981). Free Sugars and Sorbitol in Fruits – A Compilation from the Literature. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **64**, 91-103.
- Wu, Q., Preisig, C.L. und VanEtten, H.D.** (1997). Isolation of the cDNAs Encoding (+)6a-Hydroxymaackiain 3-*O*-Methyltransferase, the Terminal Step for the Synthesis for the Phytoalexin Pisatin in *Pisum sativum*. *Plant Mol. Biol.* **35**, 551-560.
- Ye, Z.-H., Kneusel, R.E., Matern, U. und Varner, J.E.** (1994). An Alternative Methylation Pathway in Lignin Biosynthesis in *Zinnia*. *Plant Cell* **6**, 1427-1439.
- Zabetakis, I.** (1997). Enhancement of Flavour Biosynthesis from Strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) Callus Cultures by *Methylobacterium* Species. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **50**, 179-183.
- Zabetakis, I. und Gramshaw, J.W.** (1998). 1,2-Propanediol in Strawberries and its Role as a Flavour Precursor. *Food Chem.* **61**, 351-354.

-
- Zabetakis, I. und Holden, M.A.** (1995). A Study of Strawberry Flavour Biosynthesis. In: Bioflavour 95: Analysis - Precursor studies - Biotechnology. P. Etievant und P. Schreier (Hrsg.); INRA Editions, Paris, 211-216.
- Zabetakis, I. und Holden, M.A.** (1996). The Effect of 6-Deoxy-D-fructose on Flavour Bioformation from Strawberry (*Fragaria x ananassa*, cv. Elsanta) Callus Culture. *Plant Cell, Tissue Org. Cult.* **45**, 25-29.
- Zabetakis, I. und Holden, M.A.** (1997). Strawberry Flavour: Analysis and Biosynthesis. *J. Sci. Food Agric.* **74**, 421-434.
- Zabetakis, I., Grawshaw, J.W. und Robinson, D.S.** (1996). The Biosynthesis of 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-2*H*-furan-3-one and its Derivatives in Strawberry. In: Flavour Science - Recent Developments. A.J. Taylor und D.S. Mottram (Hrsg.); The Royal Soc. Chem., Cambridge, 90-93.
- Zabetakis, I., Moutevelis-Minakakis, P. und Gramshaw, J.W.** (1999). The Role of 2-Hydroxypropanal in the Biosynthesis of 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-2*H*-furan-3-one in Strawberry (*Fragaria x ananassa*, cv. Elsanta) Callus Cultures. *Food Chem.* **64**, 311-314.
- Zhang, B.L., Yunianta, Martin, M.L.** (1995). Site-specific Isotope Fractionation in the Characterization of Biochemical Mechanisms. *J. Biol. Chem.* **270**, 16023-16029.
- Zinner, H., Brandner, H. und Rembarz, G.** (1956). Derivate der Zucker-mercaptale, II. Mitteil.: Acyl- und Tritylverbindungen der D-Lyxose- und der D-Arabinose-mercaptale. *Chem. Ber.* **89**, 800-813.

F ANHANG

1 Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren

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

2 Oligonukleotide

Name	Nukleotidsequenz	T _m	Verw.
T3	5'-AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG-3'	53,2°C	P,S
T7	5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'	53,2°C	P,S
M13 universal	5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3'	53,7°C	S
MTs I	5'-GTI GA(C/T) GTI GGI GGI GGI ACI GGI GC-3'	67,2°C	P
MTas II	5'-GGI GC(A/G) TC(CT) TCI ATI AC(A/G) TGI GG-3'	61,5°C	P
MTas IV	5'-CA(A/G) TGI (G/T)C(A/G) TCI (G/C)IC CA(A/G) TC(A/G) TG-3'	61,5°C	P
MT3a	5'-CTG ACC ACT CCA CC-3'	49°C	S
MTs-BamH	5'-AAA AGG ATC CAT GGG TTC CAC CGG CGA GAC-3'	70,9°C	P
MTas-Xho	5'-AAA ACT CGA GCT AAG CCA AGT AGC TAG TAC TCA GAT CTT C-3'	70,5°C	P
Yeast-Forward	5'-GTA CTT GAA ATC CAG CAA GTA TAT AGC-3'	60,4°C	S

Abkürzungen: I: Inosin, T_m: Schmelztemperatur, Verw.: Verwendung, P: PCR, S: Sequenzierung

3 Eingesetzte Vektoren

3.1 pBluescript SK

Phagemidvektor der ZAP cDNA (Stratagene; La Jolla, USA)

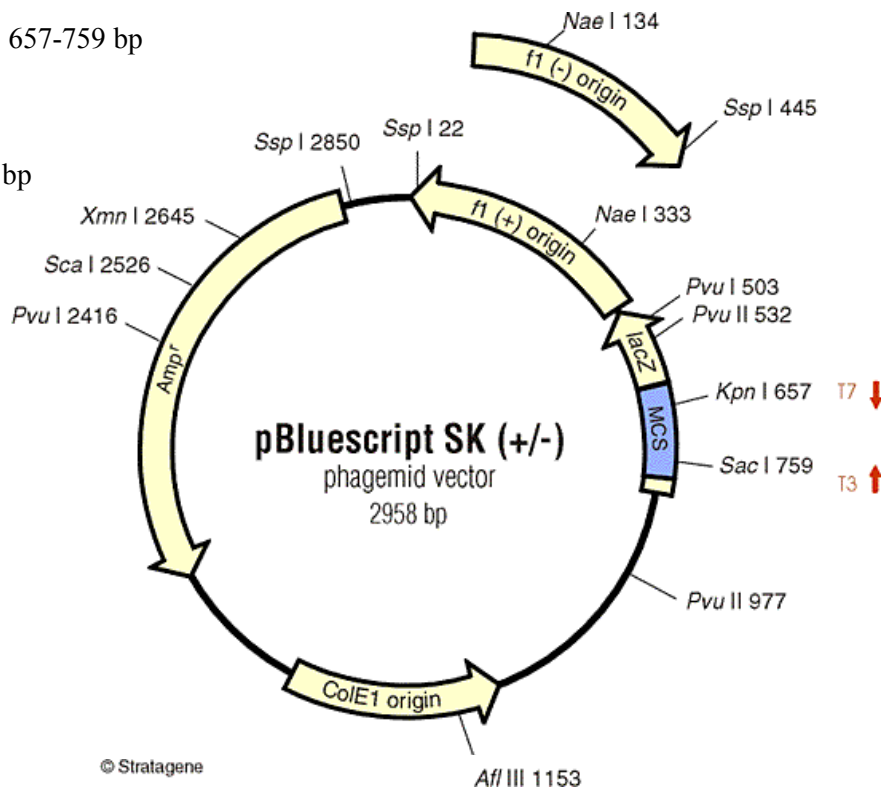
f1 (+/-) origin 6-462 bp

Multiple Cloning Site (MCS) 657-759 bp

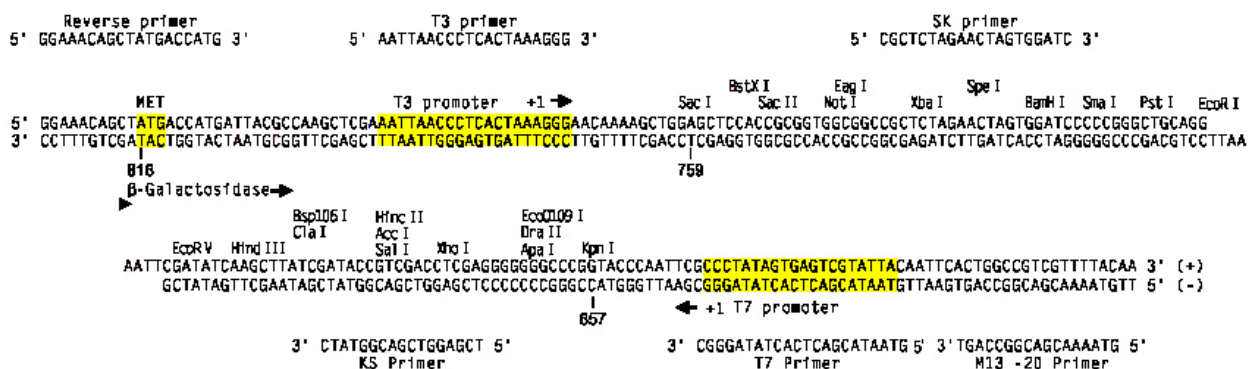
lac Promoter 816-938 bp

ColE1 origin 1032-1912 bp

Ampicillin (ORF) 1975-2832 bp



Region der Multiple Cloning Site (MCS), dargestellt von 601 bis 826 bp:



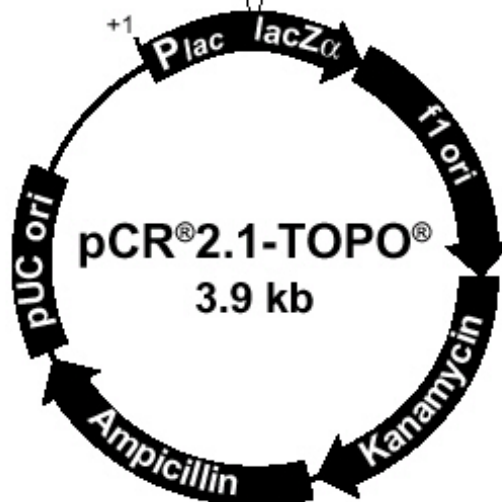
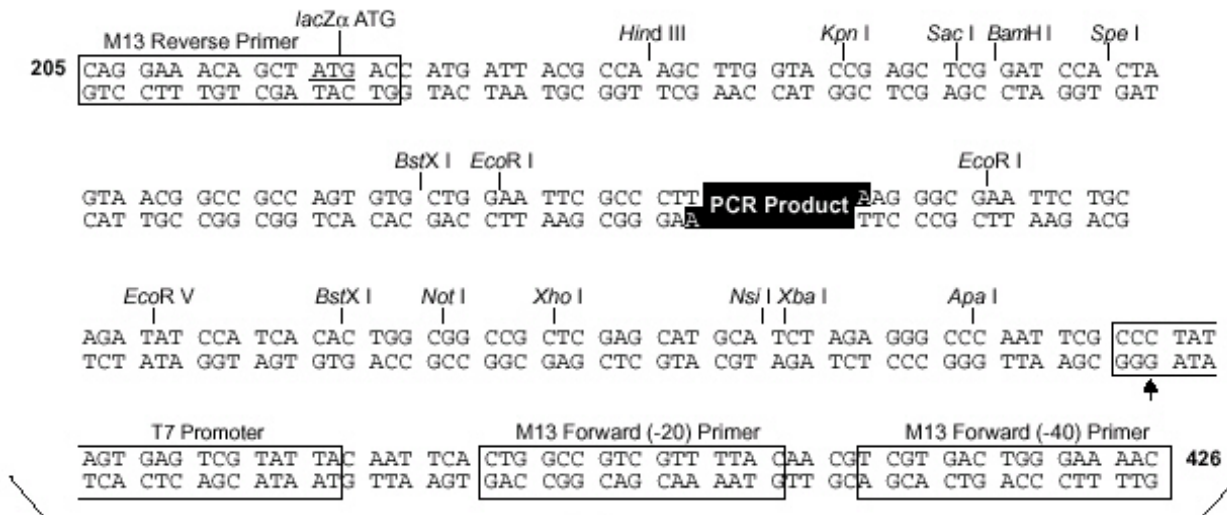
GenBank® #52325 [SK(+)] #52324 [SK(-)]

Quelle: <http://www.stratagene.com>

3.2 pCR[®]2.1-TOPO[®]

Klonierungsvektor des Topo TA Cloning Systems (Invitrogen; Groningen, NL)

Multiple Cloning Site dargestellt von 205 bis 426 bp:



LacZα Fragment 1-571 bp

Multiple Cloning Site 234-357 bp

f1 Origin 548-962 bp

Kanamycin Resistenz ORF 1296-2090 bp

Ampicillin Resistenz ORF 2108-2968 bp

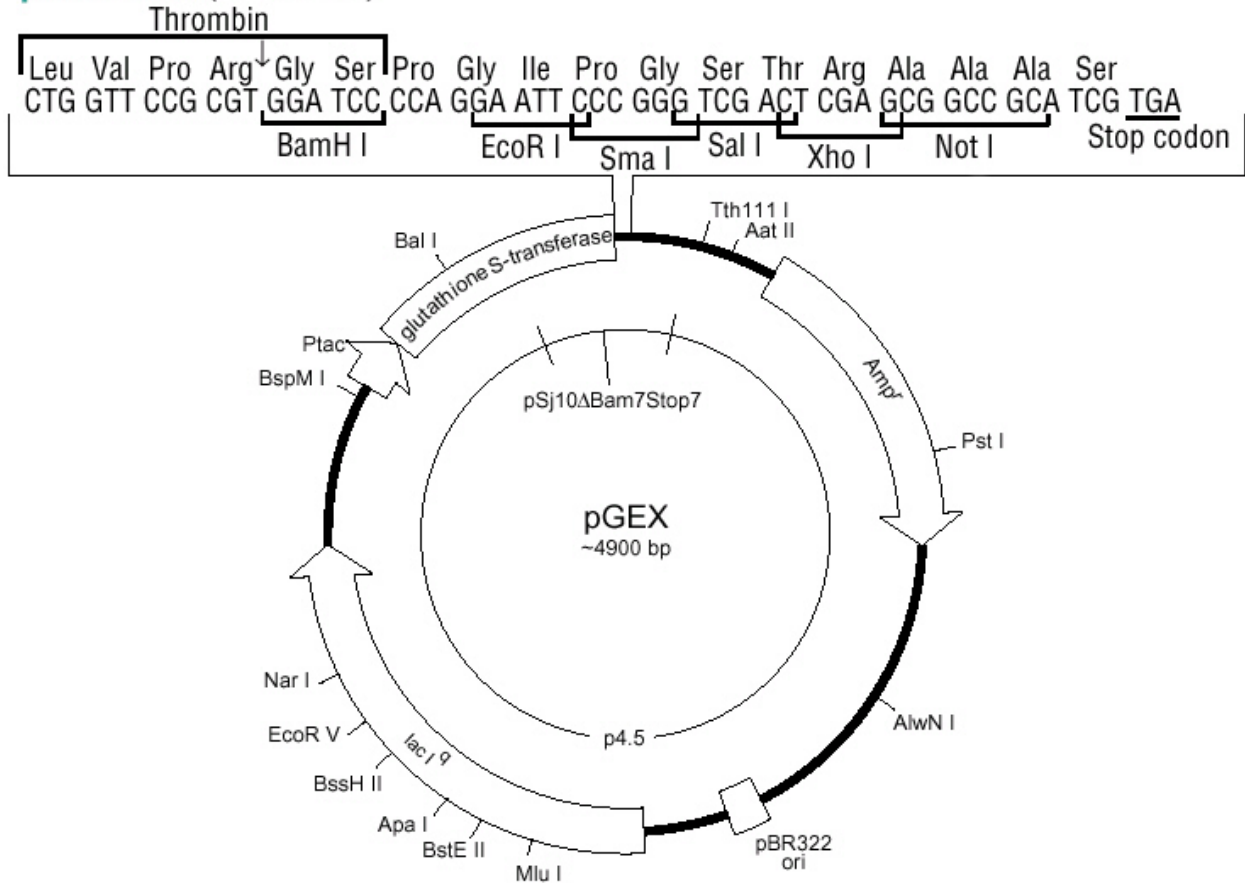
pUC Origin 3113-3786 bp

Quelle: <http://www.invitrogen.com>

3.3 pGEX

GST Fusionsvektor (Pharmacia Biotech, Freiburg)

pGEX-4T-2 (27-4581-01)



Glutathion-S-transferase ORF 258-967 bp

5'-Sequenzierprimer ("Yeast Forward") 869-891 bp

Thrombin-Schnittstelle 918-935 bp

Multiple Cloning Site 930-967 bp

Ampicillin Resistenz ORF 1378-2236 bp

LacI^q Region 3319-4399 bp

GenBank® #U13854

Quelle: <http://www.apbiotech.com>

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Martina Wein
Anschrift: Elsa-Brandström-Str. 6, 97218 Gerbrunn
Geboren: 29. Dezember 1972 in Erlangen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schul Ausbildung

Sept. 1979 - Juli 1983 Grundschule Erlangen-Büchenbach
Sept. 1983 - Juli 1992 Albert-Schweitzer-Gymnasium, Erlangen
Schulabschluss: Allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung

Nov. 1992 - Nov. 1996 Studium der Lebensmittelchemie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Abschluss: 1. Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker am 29. November 1996
Feb. 2001 - Jul. 2001 Lebensmittelchemisches Praktikum am Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Nordbayern in Erlangen
Abschluss: 2. Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker im Juli 2001

Auslandspraktikum

Jan. 1997 - Dez. 1997 Molekularbiologisches Praktikum am Centre for Plant Breeding and Reproduction Research (CPRO-DLO) in Wageningen, Niederlande

Promotion

seit Jan. 1998 am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie, Universität Würzburg, betreut von PD Dr. W. Schwab