
7 Zusammenfassung

Das Ziel der Arbeit war die Klärung der Frage, ob der letzte Schritt der Betalainbiosynthese, die Kondensation der Betalaminsäure mit Aminosäuren/Aminen (die Aldiminbildung), eine enzymatisch katalysierte oder eine spontan ablaufende Reaktion ist.

Als experimentelle Systeme dienten Betalain-bildende Hairy-Root-Kulturen der Gelben Rübe und Hypokotyle der Futterrübe (*Beta vulgaris*). Um das experimentelle System umfassend zu charakterisieren, wurden die Betalainmuster der transgenen Hairy-Roots der Gelben Rübe während des Wachstums analysiert und seine Komponenten strukturell aufgeklärt. Neben den bereits bekannten Verbindungen Betanin, Betalaminsäure und Miraxanthin V konnten die Dopamin-abgeleiteten Betacyane (2-Descarboxy-betanidin, sein 5-*O*-glucosid und das entsprechende 6'-*O*-Malonylkonjugat) erstmalig identifiziert und damit ein neuer Zweig der Betalainbiosynthese nachgewiesen werden. Ein Screening verschiedener Zellkulturen auf das Vorkommen dieser neuen Verbindungen zeigte eine enge Korrelation dieser Verbindungen mit dem Vorkommen des ebenfalls Dopamin-abgeleiteten Miraxanthins V und hoher Tyrosinaseaktivitäten. Während der Strukturermittlung des 2-Descarboxy-betanidin-5-*O*-(6'-*O*-malonyl)-glucosids war der Vergleich seines massenspektrometrischen Fragmentationsmusters mit dem des Betanidin-5-*O*-(6'-*O*-malonyl)-glucosids (Phyllocactin) notwendig. Phyllocactin wurde dazu aus Blüten des Weihnachtskaktus isoliert und zeigte ebenfalls eine sequenzielle Abspaltung der Carboxylgruppen in der ESI-MS. Die begleitende komplette Analyse der Blütenpigmente des Weihnachtskaktus führte zur Identifizierung neuer malonylierter Apiosylderivate des Phyllocactins. Ein Screening von Blüten und Früchten verschiedener Kaktusarten zeigte eine weite Verbreitung des Vorkommens dieser neu entdeckten, offensichtlich kaktusspezifischen Betacyane.

Auf Grund des Vorkommens spezifischer Betaxanthinmuster in Pflanzen lag die Vermutung nahe, dass die Kondensationsreaktion ein Enzym-katalysierter Vorgang sein könnte. Mittels photometrischer und HPLC-Enzymassays nach verschiedenen Proteinextraktionsverfahren konnte *in vitro* der Nachweis einer protein-katalysierten Kondensation zwischen Betalaminsäure und Aminosäuren (Glutamin/Phenylalanin) nicht erbracht werden. Um die Betaxanthinbildung *in vivo* zu analysieren, wurden verschiedene Aminosäuren (sowohl *S*- als auch *R*-Form) an Hairy-Root-Kulturen appliziert, die zur Bildung der entsprechenden abgeleiteten Betaxanthine führte. Diese Ergebnisse konnten komplett durch analoge Fütterungsexperimente an Hypokotyle von Futterrüben bestätigt werden. Selbst nach Gabe einer ungewöhnli-

chen Aminosäure [(S)-4-Thiaproline] wurde ein Einbau in das entsprechende Betaxanthin beobachtet. Die Daten belegen, dass die Betaxanthinbildungsreaktion weder eine Aminosäurespezifität noch eine Stereoselektivität zeigt. Die Applikation von 2-Aminoindan-2-phosphonsäure, ein effektiver Inhibitor der Phenylalaninammoniak-Lyase, an beide experimentelle Systeme führte zur Bildung des vom Phenylalanin-abgeleiteten Betaxanthins auf Grund der Inhibitor-induzierten Erhöhung des endogenen Phenylalaninspiegels. Die Fütterung von (S)-Alanin in steigenden Konzentrationen (2 -50 mM) an Hairy-Root-Kulturen führten, zusätzlich zur erwarteten (S)-Ala-Betaxanthinbildung, zu einem Anstieg des Gehaltes an endogenem Vulgaxanthin I [(S)-Gln-Betaxanthin]. Dieses Ergebnis konnte durch eine aus der (S)-Alanin-Fütterung herrührende erhöhte Verfügbarkeit von Ammonium erklärt werden, da eine gleichartige Vulgaxanthin I-Erhöhung durch (NH₄)₂SO₄-Zugabe erreicht werden konnte, nicht aber durch ansteigende Konzentrationen von (R)-Alanin. Die Bildung von Betanidin nach Fütterung von *cyclo*-Dopa, dem Strukturelement fast aller Betacyane, zeigte an, dass der letzte Schritt in der Bildung der Betacyane und der Betaxanthine nach dem gleichen Mechanismus verläuft. Ein zusätzliches Argument für den offensichtlich spontanen Charakter der Kondensationsreaktion war die Tatsache, dass die Fütterung von Betalaminsäure an Hypokotyle von Pflanzen [z. B. Keimlinge der Ackerbohne (*Vicia faba* L.)], die nicht zu den Betalain-synthetisierenden Caryophyllales gehören, zur Bildung von Betaxanthinen führte. Das einzige Hauptbetaxanthin des Ackerbohnenexperiments erwies als Dopaxanthin, abgeleitet von Dopa, die in höherer Konzentration als alle anderen Aminosäuren in Kontrollpflanzen vorkam, aber Betaxanthine abgeleitet von allen anderen Aminosäuren wurden nicht gefunden. Alle experimentellen Daten zusammengenommen weisen daraufhin, dass die Kondensation der Betalaminsäure mit Aminosäuren/Aminen (einschließlich *cyclo*-Dopa) *in planta* sehr wahrscheinlich eine spontane, und nicht eine Enzym-katalysierte Reaktion ist. Nach einer Literaturrecherche ist die Beteiligung von nichtenzymatischen Schritten in der Biosynthese sekundärer Pflanzenstoffe ein zwar seltenes, aber dennoch wichtiges Phänomen.

Um auf die Fragen weiter einzugehen, wie die Betaxanthin-bildenden Pflanzen es erreichen, ein spezifisches Muster an Betaxanthinen trotz der spontanen Bildungsreaktion zu akkumulieren, und in welchem Kompartiment die Aldiminbildung abläuft, wurde der Transport von Präkursoren und Endprodukten der Betalainbiosynthese in Vakuolen Roter Beete untersucht. Da die Synthese ¹⁴C-markierter Substrate mit hoher spezifischer Radioaktivität und Reinheit nicht realisiert werden konnte, waren die Transportexperimente stark erschwert und die HPLC musste zur Quantifizierung der Aufnahme herangezogen werden. Auch waren die Vakuolen-

ausbeuten aus Roten Rüben trotz intensiver Optimierungsversuche vergleichsweise gering und die chemische Instabilität der Betalaminsäure ließ keine reproduzierbaren Ergebnisse zu. Die Ergebnisse der Aufnahme der Rüben-spezifischen Betaxanthine Miraxanthin V (Dopamin-Betaxanthin) und Vulgaxanthin I wie auch des artifiziellen (*R*)-Phe-Betaxanthins in die Vakuolen Roter Rüben zeigten trotz Dreifachbestimmungen eine erhebliche Variabilität und können deshalb nur eingeschränkt interpretiert werden. Ein Grund für die Variabilität der Aufnahmeresultate in verschiedenen Experimenten könnte in der unvermeidbaren Heterogenität der Vakuolenpopulationen liegen. Dennoch kann aus den Daten der vakuolären Betaxanthintransportes, die bei Verwendung verschiedener Inhibitoren erhalten wurden, folgender Trend diskutiert werden: die Hemmung des MgATP-stimulierten Transportes der Rüben-spezifischen Betaxanthine Miraxanthin V (Dopamin-Betaxanthin) und Vulgaxanthin I in die Vakuolen durch 1 mM Vanadat weist auf die Beteiligung eines direkt-energisierten ABC-Transporters hin, während die Hemmung der Aufnahme des unnatürlichen (*R*)-Phe-Betaxanthins durch 0,1 μ M Bafilomycin A1 und 5 mM NH_4Cl mit einem H^+ /Antiport-System kompatibel ist. Nach sequenzieller Aufnahme von (*R*)-Phenylalanin und Betalaminsäure in Miniprotoplasten, die keine Vakuolen enthalten, konnte die Bildung von (*R*)-Phe-Betaxanthin, wenn auch nur in Spuren, nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis und die Daten der Vakuolentransporthemmung stellen dennoch keinen eindeutigen Nachweis für die extravakuoläre Lokalisation des letzten Schrittes der Betalain-Biosynthese dar.

Alle biochemischen Resultate zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die vorgelegte Arbeit den letzten Schritt der Betalain-Biosynthese als eine höchst wahrscheinlich spontane Reaktion charakterisiert.