©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Phyton (Austria)	Vol. 28	Fasc. 2	237–247	15. 12. 1988

Einfluß Cytochrom P-450-spezifischer Inhibitoren auf die Aktivität von Flavonoid-3′-hydroxylase und Flavonsynthase II bei verschiedenen Pflanzen

Von

Karl STICH*, Robert EBERMANN* und Gert FORKMANN**

Mit 2 Abbildungen

Eingegangen am 19. Oktober 1987

Key words: Flavonoid biosynthesis, flavonoid-3′-hydroxylase, flavone synthase II, cytochrome P-450 specific inhibitors.

Summary

STICH K., EBERMANN R. & FORKMANN G. 1988. Effect of cytochrome p-450 specific inhibitors on the activity of flavonoid-3′-hydroxylase and flavonsynthase II in certain plants. – Phyton (Austria) 28 (2): 237–247, with 3 figures. – German with English summary.

Various plants were used to determine the influence of the Cytochrome P-450 specific inhibitors Ancymidol, Ketoconazole and Tetcyclacis on the flavonoid-3′-hydroxylase and flavone synthase II activity. Both of these enzymes are inhibited by Ketoconazole and Tetcyclacis to a different extent, whereas Ancymidol solely inhibits the flavone synthase II. Until now a separation of enzyme activities was only possible by using suitable substrates. By applying the inhibitor Ancymidol it is possible to measure the enzyme activities separately. Therefore, for the first time it is possible to measure the flavonoid-3′-hydroxylase activity in the presence of flavone synthase II also on the flavanone level.

Zusammenfassung

STICH K., EBERMANN R. & FOLKMANN G. 1988. Einfluß Cytochrom P-450-spezifischer Inhibitoren auf die Aktivität der Flavonoid-3′-hydroxylase und der Flavonsynthase II bei verschiedenen Pflanzen. – Phyton (Austria) 28 (2): 237–247, mit 3 Figuren. – Deutsch mit englischer Zusammenfassung.

---

*) Prof. Dr. R. EBERMANN, Dr. K. STICH, Institut für Chemie, Universität für Bodenkultur, Gregor-Mendel-Straße 33, A-1180 Wien, Österreich.

**) Prof. Dr. G. FORKMANN, Institut für Biologie II, Lehrstuhl für Genetik, Universität Tübingen, Auf der Morgenstelle 28, D-7400 Tübingen, BRD.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Bei einer Reihe von Pflanzen wurde der Einfluß der Cytochrom P-450-spezifischen Inhibitoren Ancymidol, Ketoconazol und Tetcyclacis auf die Aktivität der Flavonoid-3′-hydroxylase und der Flavonsynthase II untersucht. Von Ketoconazol und Tetcyclacis wurden beide Enzyme in unterschiedlichem Ausmaß gehemmt. Dagegen hemmt Ancymidol ausschließlich die Flavonsynthase II und beeinflußt die Flavonoid-3′-hydroxylase kaum. Da beide Enzyme in der Mikrosomenfraktion lokalisiert sind und die Reaktionen NADPH als Cofaktoren benötigen, war eine Trennung der Enzymaktivitäten nur durch Verwendung geeigneter Substrate möglich. Die Anwendung von Ancymidol erlaubt nun erstmals eine vollständige Inhibition der Flavonsynthase-II-Aktivität. Dadurch läßt sich bei Anwesenheit der Flavonsynthase II die 3′-Hydroxylierung auch mit dem physiologisch wichtigen Substrat Naringenin (Flavanon) messen.

Einleitung

Das Hydroxylierungsmuster des B-Rings der Flavonoide kann auf zwei Arten zustande kommen. In den meisten Fällen (BRITSCH & al. 1981, STOTZ & al. 1984, FORKMANN & al. 1980, FORKMANN & STOTZ 1981, STOTZ & al. 1985, SPRIBILLE & FORKMANN 1982, HAGMANN & al. 1983, LARSON & BUSSARD 1986) erfolgt die Hydroxylierung des B-Rings in der 3′-Position durch eine NADPH-abhängige Flavonoid-3′-hydroxylase. Die Hydroxylierung kann auf der Flavanon-, Flavon- oder Dihydroflavonolebene erfolgen. Es sind aber auch einige Beispiele bekannt, bei denen das Schlüsselenzym der Flavonoidbiosynthese, die Chalconsynthase Caffeoyl-CoA neben p-Cumaryl-CoA als Substrat für die Kondensationsreaktion akzeptiert (STOTZ & al. 1984, KAMSTEEG & al. 1981, SÜTFELD & Wiermann 1981), was zur Bildung von Eriodictyol (3′,4′-OH) neben Narigenin (4′-OH) führt.

Für die Umwandlung von Flavanonen zu Flavonen sind ebenfalls zwei Enzymarten bekannt. Das in Petersilienzellkulturen vorkommende Enzym gehört in die Gruppe der 2-oxoglutaratabhängigen Dioxygenasen und benötigt für die Reaktion neben 2-Oxoglutarat, Fe^{2+} und Ascorbat (BRITSCH & al. 1981). Es wird als Flavonsynthase I bezeichnet (KOCHS & GRISEBACH 1987). Die Flavonsynthase II (früher Flavanonoxidase) benötigt dagegen NADPH als Cofaktor und ist in den Blüten einiger Pflanzen (STOTZ & FORKMANN 1981, STOTZ & al. 1984, FORKMANN & STOTZ 1984) sowie in osmotisch gestreßten Sojabohnenzellkulturen (KOCHS & GRISEBACH 1986) nachgewiesen worden. Sowohl bei der Flavonoid-3′-hydroxylase als auch bei der Flavonsynthase II handelt es sich um mikrosomale Enzyme. Bisher konnte bei Pflanzen, die beide Enzymaktivitäten aufwiesen, eine getrennte Untersuchung der Enzymaktivitäten nur durch Verwendung entsprechender Substrate erfolgen, die aber oft nicht optimal umgesetzt werden. Messungen mit dem physiologisch wichtigen Substrat Naringenin sind nicht möglich, da es sowohl von der Flavonoid-3′-hydroxylase als auch von der Flavonsynthase II umgesetzt wird. Mutanten, die keine 3′-Hydroxylaseakti-

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

vität besitzen, konnten bisher nur für die Untersuchung der Flavonbildung herangezogen werden (STOTZ & FORKMANN 1981, STOTZ & al. 1984).

Eine vor kurzem durchgeführte Untersuchhung (STICH & FORKMANN 1987a) hat nun gezeigt, daß die in *Sinningia cardinalis* vorkommende Flavonsynthase II durch den Inhibitor Ancymidol vollständig gehemmt wird, während die Flavonoid-3′-hydroxylase nicht beeinflußt wird. Mit der vorliegenden Arbeit soll geklärt werden, ob diesbezüglich *Sinningia cardinalis* ein Einzelfall ist oder ob es sich um einen allgemeinen Effekt handelt, der auch bei anderen Pflanzen eine Trennung der beiden Enzymaktivitäten zuläßt.

Material und Methoden

1. Pflanzenmaterial

Der Einfluß der Cystochrom P-450-spezifischen Inhibitoren Ancymidol, Ketoconazol bzw. Tetcyclacis auf die Flavonoid-3′-hydroxylase bzw. Flavonsynthase II wurde an Blüten untersucht, die 3′,4′-hydroxylierte Anthocyanidine bzw. lavone enthielten. Folgende Pflanzengattungen wurden verwendet:

Sinningia (syn. *Rechsteineria*) *cardinalis* cv. „Feuerschein" (Fa. Walz, BRD)
Streptocarpus hybridus (Handelssortiment)
Columnea hybrida cv. „Heklua" (HBLVA f. Gartenbau, Wien, Österreich)
Antirrhinum majus cv. „Trautlieb" (Fa. Austrosaat, Österreich)
Dahlia variabilis cv. „Agnes" (Fa. Wirth, Österreich)
Verbena hybrida cv. „Sangria" (Fa. Weigelt & Co., BRD)
Matthiola incana „Linie 08" (Universität Tübingen, BRD)
Dianthus caryophyllus cv. „Nero" (Fa. Austrosaat, Österreich)
Petunia hybrida cv. „Red Titan" (Fa. Benary, BRD)
Gerbera jamesonii Hyb. (Handelssortiment).

Außer den genannten Arten wurde der „Pelargonidin"-Typ einer *Sinningia hybrida* cv. „Feuerkugel" (Fa. Walz, BRD) und einer *Chrysanthum indicum* (Handelssortiment) in die Untersuchung mit einbezogen. Die *Sinningia cardinalis-, Streptocarpus hybridus-, Columnea hybrida, Gerbera jamesonii-* bzw. *Sinningia hybrida*-Pflanzen wurden im Glashaus kultiviert. Alle anderen Pflanzen wuchsen im Hochschulgarten der Universität für Bodenkultur.

2. Chemikalien und Synthese der (^{14}C)-markierten Substrate

Naringenin, Eriodictyol, Apigenin und Luteolin wurden von der Fa. Roth (Karlsruhe, BRD) bezogen. p-Cumaryl-CoA wurde entsprechend der Literatur (STÖCKIGT & ZENK 1975) synthetisiert. (2-^{14}C)-Malonyl-CoA (2,22

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

GBq/mmol) wurden bei der Fa. Amersham (Braunschweig, BRD) gekauft und mit unmarkiertem Malonyl-CoA (Fa. Sigma, München, BRD) auf 1,03 BGq/mmol verdünnt. (4a,6,8-^{14}C)-Naringenin wurde enzymatisch unter Verwendung einer teilweise gereinigten Chalconsynthase und Chalconisomerase (BRITSCH & al. 1981, BRITSCH & GRISEBACH 1985) hergestellt. Die Umwandlung von (4a,6,8-^{14}C)-Naringenin zu (4a,6,8-^{14}C)-Apigenin erfolgte enzymatisch mittels einer teilweise gereinigten Flavonsynthase I (BRITSCH & al. 1981). Die Hydroxylierung des (4a,6,8,-^{14}C)-Dihydrokämpferol wurde mittels einer Flavanon-3-hydroxylase-Präparation aus *Petunia hybrida* cv. „Red Titan" (Fa. Benary, BRD) durchgeführt (HELLER & al. 1985). Die Umwandlung von (4a,6,8,-^{14}C)-Naringenin zu (4a,6,8-^{14}C)-Eriodictyol erfolgte mit Hilfe einer Mikrosomenpräparation aus *Petunia hybrida* cv. „Red Titan" (Fa. Benary, BRD) (HELLER & al. 1985, STOTZ & al. 1985).

Die Inhibitoren Ancymidol, Ketoconazol und Tetcyclacis waren ein Geschenk von Prof. Dr. GRISEBACH (Universität Freiburg, BRD).

3. Herstellung der Enzymextrakte

Alle Arbeitsschritte wurden bei 4° C durchgeführt. 4 g Petalen wurden zusammen mit 2 g Polyclar AT (Fa. Serva, BRD), 2 g Quarz und 12–16 ml 0,1 M K-Phosphatpuffer pH = 7,5, der 7 mM Mercaptoäthanol enthielt, in einer vorgekühlten Reibschale homogenisiert. Das Homogenisat wurde anschließend 20 Min. bei 12 000 × g zentrifugiert. Der klare Überstand diente als Rohextrakt für die Mikrosomenpräparation, welche durch Fällung mit $MgCl_2$ erfolgte (STOTZ & al. 1985, FORKMANN & al. 1981).

Im Fall der Mikrosomenpräparation aus *Sinningia cardinalis, Streptocarpus hybridus* und *Columnea hybrida* enthielt der Puffer noch zusätzlich 10% Saccharose.

4. Bestimmung der Enzymaktivität

Standardenzymtests wurden für die Aktivitätsbestimmung der Flavonoid-3′-hydroxylase (FORKMANN & al. 1980) bzw. der Flavonsynthase II (STOTZ & FORKMANN 1981) verwendet. Für die Bestimmung der Enzymaktivitäten wurden entweder 0,06 nmol (167 Bq) radioaktiv markiertes Substrat (Naringenin, Apigenin, Dihydrokämpferol oder Eriodictyol) oder radioaktiv markiertes Substrat in Kombination mit der entsprechenden Menge des in Methanol gelösten Inhibitors in die Reaktionsgefäße nach Eppendorf einpipettiert. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum abgedampft. Die Proteinmenge wurde so gewählt, daß maximal 25% des Substrats umgesetzt wurden.

Die Substrate und Produkte wurden auf Cellulose-TLC-Fertigplatten (Fa. Merck, Darmstadt, BRD) unter Verwendung des Laufmittels Chloroform/Essigsäure/Wasser (10:9:1) v/v/v getrennt. Nach der chromatographischen Trennung der Flavonoide wurde die Radioaktivität durch Abscannen

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

der TLC-Fertigplatten mit einem TLC-Linear Analyzer (Fa. Berthold, Wildbad, BRD) lokalisiert und die Umsatzrate durch Integration der Peakflächen der Substrate und Produkte ermittelt.

Die Identifikation der gebildeten Produkte erfolgte durch Co-Chromatographie mit den entsprechenden Vergleichssubstanzen (STOTZ & al. 1985, FORKMANN & al. 1980, STOTZ & FORKMANN 1981).

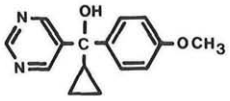
5. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte modifiziert nach LOWRY (HELLER & al. 1985).

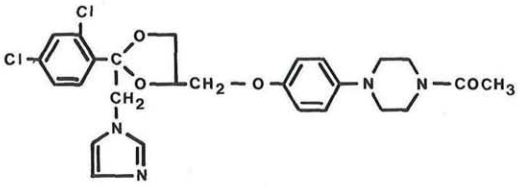
Resultate

In der vorliegenden Arbeit wurden sechs Pflanzen verwendet, die sowohl Aktivität der Flavonoid-3′-hydroxylase als auch der Flavosynthase II besaßen. Außerdem wurden einige Pflanzenarten in die Untersuchungen einbezogen, die entweder nur die Flavonoid-3′-hydroxylase- oder nur die Flavonsynthase-II-Aktivität enthielten. Die Auswahl des verwendeten Pflanzenmaterials erfolgte unter Berücksichtigung der Literatur, sodaß von den meisten Arten eine Charakterisierung der beiden Enzyme bereits gegeben ist. In diesen Arbeiten wurde gezeigt, daß es sich sowohl bei der Flavonoid-3′-hydroxylase als auch der Flavonsynthase II um Cytochrom P-450-abhängige Enzyme handelt. Sofern es möglich war, wurden auch die in früheren Untersuchungen verwendeten Sorten verwendet.

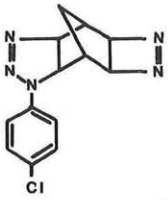
Außer Ancymidol wurden die Verbindungen Ketoconazol und Tetcyclacis auf ihre inhibierende Wirkung untersucht (Abbildung 1).



Ancymidol



Ketoconazol



Tetcyclacis

Abbildung 1

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Tabelle 1 zeigt den Effekt der Inhibitoren auf die Enzymaktivität der Flavonoid-3′-hydroxylase und der Flavonsynthase II. Die Flavonoid-3′-hydroxylase wird sehr stark von den Inhibitoren Ketoconazol bzw. Tetcyclacis inhibiert, während Ancymidol nur wenig hemmt. Bei einigen Pflanzengattungen steigert Ancymidol in geringer Konzentration sogar die Enzymaktivität. Die Flavonsynthase II wird im Gegensatz zur Flavonoid-3′-hydroxylase sehr stark gehemmt. In Anwesenheit von Ketoconazol kommt

Tabelle 1a

Einfluß der Cytochrom P-450-spezifischen Inhibitoren auf die Flavonoid-3′-hydroxylase (in % der Kontrolle ohne Inhibitor)

Pflanzenart	Substrat	Ohne Inhibitor	Ancymidol 50µM	Ancymidol 5µM	Ketoconazol 50µM	Ketoconazol 5µM	Tetcyclacis 50µM	Tetcyclacis 5µM
Antirrhinum majus	DHK	100,0	89,5	92,8	4,9	12,5	0,0	0,0
Columnea hybrida	API	100,0	84,8	–	3,4	–	15,0	–
Dahlia variabilis	DHK	100,0	105,7	101,3	49,2	94,3	38,9	95,5
Sinningia cardinalis	API	100,0	99,2	99,7	5,9	44,6	1,9	5,0
Streptocarpus hybridus	DHK	100,0	90,0	95,8	0,0	9,3	5,0	11,7
Verbena hybrida	DHK	100,0	94,2	96,6	3,8	32,3	8,9	12,8
Dianthus caryophyllus	NAR	100,0	98,4	112,2	10,3	52,6	0,0	0,0
Gerbera jamesonii Hyb.	DHK	100,0	91,1	99,0	9,7	38,6	4,0	12,9
Matthiola incana	NAR	100,0	89,5	126,0	16,6	59,0	0,0	0,0
Petunia hybrida	NAR	100,0	91,1	94,6	9,2	67,2	0,0	0,0

Abkürzungen: API = Apigenin, DHK = Dihydrokämpferol, NAR = Naringenin.

Tabelle 1b

Einfluß der Cytochrom P-450-spezifischen Inhibitoren auf die Flavonsynthase II (in % der Kontrolle ohne Inhibitor)

Pflanzenart	Substrat	Ohne Inhibitor	Ancymidol 50µM	Ancymidol 5µM	Ketoconazol 50µM	Ketoconazol 5µM	Tetcyclacis 50µM	Tetcyclacis 5µM
Antirrhinum majus	ERI	100,0	0,0	30,9	0,0	3,0	22,2	47,6
Columnea hybrida	ERI	100,0	8,1	–	0,0	–	0,0	–
Dahlia variabilis	ERI	100,0	12,0	63,0	9,6	33,0	47,7	108,3
Sinningia cardinalis	ERI	100,0	0,0	2,8	0,0	0,0	17,6	45,5
Streptocarpus hybridus	ERI	100,0	0,0	0,6	0,0	0,0	20,6	84,2
Verbena hybrida	ERI	100,0	9,7	11,5	7,2	8,1	16,8	37,9
Chrysanthum indicum	ERI	100,0	0,0	34,2	0,0	1,3	26,0	77,1
Sinningia hybrida	ERI	100,0	0,0	0,8	0,0	0,0	16,2	64,6

Abkürzungen: ERI = Eriodictyol.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

es ebenfalls zu einer starken Hemmung. Tetcyclacis hemmt die Flavonsynthase II in der Regel weniger stark als die Flavonoid-3′-hydroxylase. Auffallend ist, daß das Ausmaß der durch Ancymidol, Ketoconazol bzw. Tecyclacis bewirkten Hemmung der Enzymaktivität bei nahezu allen in die Untersuchung einbezogenen Pflanzengattungen ähnlich hoch ist. Die einzige Ausnahme bildet *Dahlia variabilis*. Sowohl die Flavonoid-3′-hydroxylase als auch die Flavonsynthase II wird hier im Vergleich mit den anderen Pflanzengattungen in deutlich geringerem Ausmaß inhibiert.

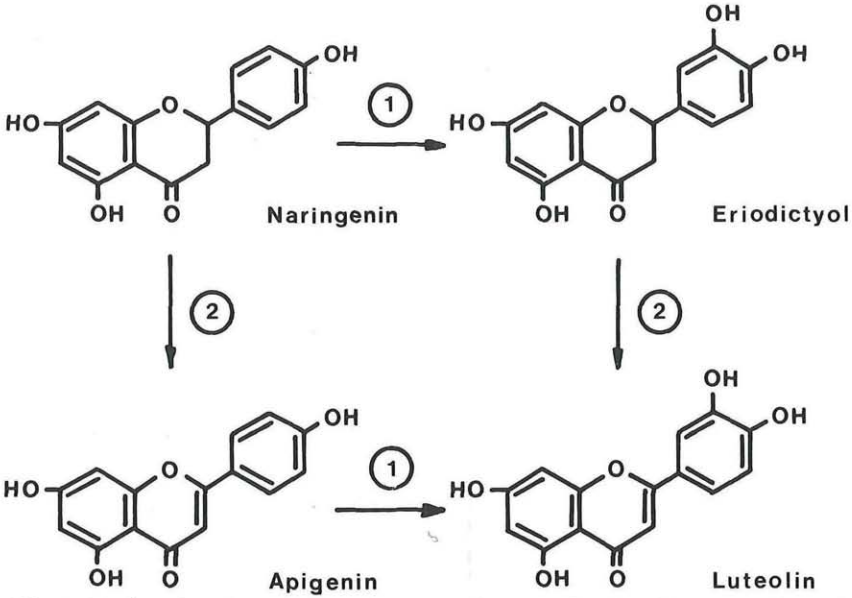


Abb. 2. Strukturformeln und Biosyntheseweg des Luteolins in Blüten von *Sinningia cardinalis:* Flavonoid-3′-hydroxylase (1), Flavonsynthase II (2)

Ancymidol hemmt offenbar die Aktivität der Flavonsynthase II vollständig, während es die Aktivität der Flavonoid-3′-hydroxylase nur wenig beeinflußt. Diese Tatsache erlaubt nun beispielsweise, die Frage nach dem Zeitpunkt der B-Ringhydroxylierung verschiedener Flavonoidklassen zu untersuchen. Anhand von *Sinninga cardinalis* wird dies im folgenden näher erläutert.

In Blüten von *Sinningia cardinalis* konnten als Inhaltsstoffe die Flavone Apigenin (4′-OH) und Luteolin (3′,4′-OH) nachgewiesen werden (STICH & FORKMANN 1987a). Für die Bildung des Luteolins sind zwei Biosynthesewege denkbar. Entweder wird das Flavanon Naringenin (4′-OH) zuerst durch die Flavonoid-3′-hydroxylase zum Eriodictyol (3′,4′-OH) umgewandelt und anschließend durch die Flavonsynthase II zum Luteolin (3′,4′-OH) oxidiert oder es erfolgt zuerst die Flavonbildung (Apigenin: 4′-OH) und im Anschluß daran die Hydroxylierung des B-Rings (Abbildung 2).

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Um zu klären, auf welcher Ebene die 3′-Hydroxylierung bevorzugt erfolgt, wurde der Inhibitor Ancymidol in einer Konzentration von 50 µM zugesetzt. Bei dieser Konzentration wurde die Flavonsynthase II vollständig gehemmt, während die Flavonoid-3′-hydroxylase kaum gehemmt wurde (siehe Tabelle 1). Unter diesen Bedingungen konnte Naringenin als Substrat für die Aktivitätsbestimmung der Flavonoid-3′-hydroxylase verwendet werden.

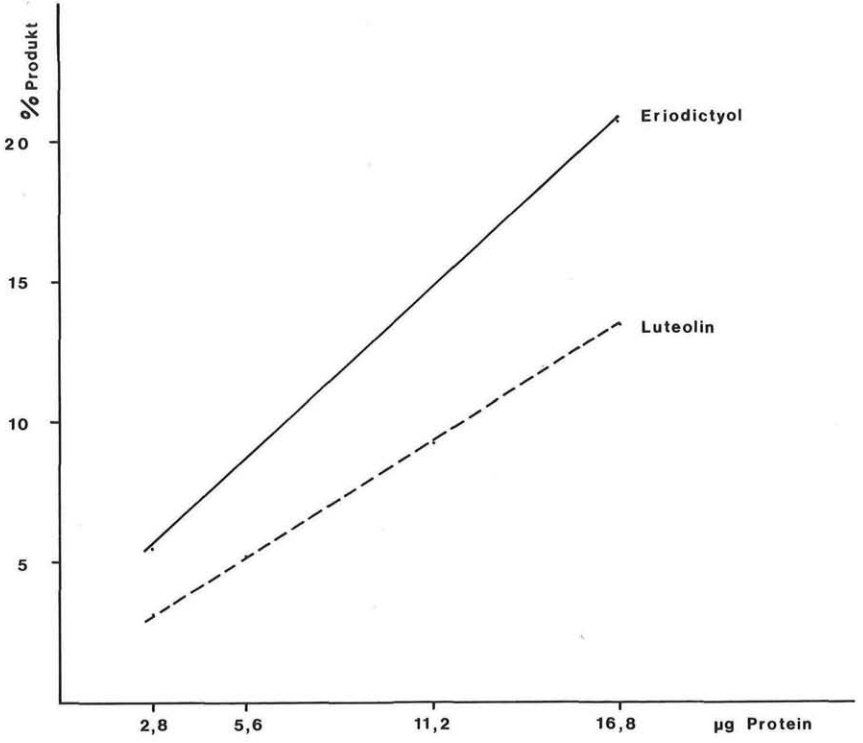


Abb. 3. Flavonoid-3′-hydroxylase-Aktivität gemessen auf der Flavanon- bzw. Flavonebene in Blüten von *Sinningia cardinalis*

Abbildung 3 zeigt die Flavonoid-3′-hydroxylase-Aktivität in Abhängigkeit von der Proteinmenge. Wie man sieht, wird Naringenin (Flavanon) von der Flavonoid-3′-hydroxylase als Substrat besser verwertet als Apigenin (Flavon). Die Umsatzraten weisen jedoch keinen so großen Unterschied auf, sodaß angenommen werden kann, daß beide Biosynthesewege zur Bildung des Luteolins führen.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Diskussion

Sowohl die Flavonoid-3′-hydroxylase als auch die Flavonsynthase II gehören in die Gruppe der Cytochrom P-450-abhängigen Monooxygenasen (HAGMANN & al. 1983, KOCHS & GRISEBACH 1987). Beide sind in der mikrosomalen Fraktion lokalisiert. Bei Pflanzen, die beide Enzymaktivitäten aufweisen, war bisher eine getrennte Untersuchung der Enzymaktivitäten nur durch Verwendung oft nicht optimaler Substrate möglich. Nur im Falle der Flavonbildung konnte man zudem Mutanten heranziehen, die keine 3′-Hydroxylaseaktivität besitzen (STOTZ & al. 1984).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß der Cytochrom P-450-spezifischen Inhibitoren Ancymidol, Ketoconazol und Tetcyclacis auf diese Enzyme geprüft. Bei diesen Inhibitoren handelt es sich um synthetische Verbindungen, die wachstumshemmende Eigenschaften besitzen. Diese Wirkung wurde bei Tetcyclacis näher untersucht (GROSSMANN & al. 1985). Es konnte gezeigt werden, daß die Hemmung des Pflanzenwachstums dadurch zustande kommt, daß Cytochrom P-450-abhängige Enzyme des Sterolbiosynthesewegs inhibiert werden. Eine hemmende Wirkung dieser Inhibitoren auf die Psoralensynthase (WENDORFF & MATERN 1986), die Zimtsäure-4-hydroxylase (KOCHS & GRISEBACH 1987) und die Flavonsynthase II (KOCHS & GRISEBACH 1987) wurde bisher gefunden. Allerdings war das Ausmaß der Hemmung je nach Inhibitor und Enzym sehr unterschiedlich, wobei sich die Zimtsäure-4-hydroxylase als relativ unempfindlich gegenüber den Inhibitoren erwies.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen, daß die Hemmstoffe Ketoconazol und Tetcyclacis wie erwartet die Flavonoid-3′-hydroxylase und die Flavonsynthase II sehr stark hemmen. Überraschenderweise wurde die Flavonoid-3′-hydroxylase in einer Konzentration von 50 μM von Ancymidol kaum gehemmt, während die Flavonsynthase II bei fast allen untersuchten Pflanzengattungen unter denselben Bedingungen vollständig inhibiert wurde. Diese an Blüten verschiedener Pflanzen gemachte Beobachtung deckt sich mit jenen von KOCHS & GRISEBACH (1987). Sie fanden ebenfalls, daß die in osmotisch gestreßten Sojazellkulturen vorkommende Flavonsynthase II durch Ancymidol vollständig gehemmt wird.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können zur Trennung der Enzymaktivitäten herangezogen werden. Damit läßt sich erstmals die Frage beantworten, auf welcher Ebene die 3′-Hydroxylierung bevorzugt erfolgt. Dies wird am Beispiel der in *Sinningia cardinalis* vorkommenden Enzyme demonstriert. Die Hemmung der Flavonsynthase II durch Ancymidol läßt eine Messung der Flavonoid-3′-hydroxylase-Aktivität auf der Flavanonebene mit dem physiologisch wichtigen Substrat Naringenin zu. Es zeigt sich, daß Naringenin zwar ein geeigneteres Substrat als Apigenin ist. Der Unterschied zwischen den Umsatzraten der beiden Substrate ist jedoch nicht allzu groß, sodaß geschlossen werden kann, daß im Fall der Biosynthese des Luteolins

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

die 3′-Hydroxylierung sowohl auf der Flavanon- als auch der Flavonebene erfolgen kann. Die aber auch mit Naringenin als Substrat relativ geringe Flavonoid-3′-hydroxylase-Aktivität erklärt zudem, warum in der Blüte von *Sinningia cardinalis* die 3-Deoxyanthocyanidine Apigeninidin (4′-OH) und Luteolinidin (3′,4′-OH) in ungefähr gleich großen Mengen vorliegen. Der Grund dafür ist, daß die Biosynthese der 3-Deoxyanthocyanidine von den Flavanonen ausgeht und das Substitutionsmuster des B-Rings bereits auf der Flavanonebene bestimmt wird (STICH & FORKMANN 1987b).

Danksagung

Diese Arbeit wurde aus Mitteln des „Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung" finanziert.

Literatur

BRITSCH L., HELLER W. & GRISEBACH H. 1981. Conversion of flavanone to flavone, dihydroflavonol and flavonol with an enzyme system from cell cultures of parsley. – Z. Naturforschung 36c: 742–750.

– & GRISEBACH H. 1985. Improved preparation and assay of chalcone synthase. – Phytochemistry 24: 1975–1976.

FORKMANN G., HELLER W. & GRISEBACH H. 1980. Anthocyanin biosynthesis in flowers of *Matthiola incana* flavanone 3- and flavonoid 3′-hydroxylase. – Z. Naturforschung 35c: 691–695.

– & STOTZ G. 1981. Genetic control of flavanone 3-hydroxylase activity and flavonoid 3′-hydroxylase activity in *Antirrhinum majus* (snapdragon). – Z. Naturforschung 36C: 411–416.

– & – 1984. Selection and characterisation of flavanone 3-hydroxylase mutants of *Dahlia, Streptocarpus, Verbena* and *Zinnia*.– Planta 162: 261–265.

GROSSMANN K., WEILER E. W. & JUNG J. 1985. Effects of different sterols on the inhibition of cell culture growth caused by the growth retardant tetcyclacis. – Planta 164: 370–375.

HAGMANN M.-L., HELLER W. & GRISEBACH H. 1983. Induction and characterization of a microsomal flavonoid 3′-hydroxylase from Parsley cell cultures. – Eur. J. Biochemistry 134: 547–554.

HELLER W., FORKMANN G., BRITSCH L. & GRISEBACH H. 1985. Enzymatic reduction of (+)-dihydroflavonols to flavan-3,4-cis-diols with flower extracts from *Matthiola incana* and its role in anthocyanin biosynthesis. – Planta 165: 284–287.

KAMSTEEG J., VAN BREDERODE J., VERSCHUREN P. M. & VAN NIGTEVECHT G. 1981. Identification, properties and genetic control of p-coumaroyl-coenzyme A, 3-hydroxylase isolated from petals of *Silene dioica*. – Z. Pflanzenphysiologie 102: 435–442.

KOCHS G. & GRISEBACH H. 1987. Induction and characterization of a NADPH-dependent flavone synthase from cell cultures of soybean. – Z. Naturforschung 42c: 343–348.

LARSON R. L. & BUSSARD J. B. 1986. Microsomal flavonoid 3′-monooxygenase from maize seedlings. – Plant Physiology 80: 483–486.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

SPRIBILLE R. & FORKMANN G. 1982. Chalcone synthesis and hydroxylation of flavonoids in 3′-position with enzyme preparations from flowers of *Dianthus caryophyllus* L. (carnation). Planta 155: 176–182.

STICH K. & FORKMANN G. 1987a. Enzymatic synthesis of 4′- and 3′,4′-hydroxylated flavanones and flavones with flower extracts of *Sinningia cardinalis*. – Z. Naturforsch. 42c: in Druck.

– & – 1987b. Biosynthesis of 3-deoxyanthocyanins: enzymatic reduction of (2S)-flavanones to flavan-4-ols with flower extracts from *Sinningia cardinalis*. – Phytochemistry 26: in Druck.

STÖCKIGT J. & ZENK M. H. 1975. Chemical syntheses and properties of hydroxycinnamoyl coenzyme A derivatives. – Z. Naturforsch. 30c: 352–358.

STOTZ G. & FORKMANN G. 1981. Oxidation of flavanones to flavones with flower extracts of *Antirrhinum majus* (Snapdragon). – Z. Naturforsch. 36c: 737–741.

– , SPRIBILLE R. & FORKMANN G. 1984. Flavonoid biosynthesis in flowers of *Verbena* hybrida. – J. Plant Physiology 116: 173–183.

– , DE VLAMING P., WIERING H., SCHRAM A. W. & FORKMANN G. 1985. Genetic and biochemical studies on flavonoid 3′-hydroxylation in flowers of *Petunia hybrida*. – Theor. Appl. Genetics 70: 300–305.

SÜTFELD R. & WIERMANN R. 1981. Purification of chalcone synthase from tulip anthers and comparsion with the synthase from *Cosmos* petals. – Z. Naturforsch. 36c: 30–34.

WENDORFF H. & MATERN U. 1986. Differential response of cultured parsley cells to elicitors from two non-pathogenic strains of *Fungi*. – Microsomal conversion of (+)marmesin into psoralen. – Eur. J. Biochem. 161: 391–398.

Phyton (Austria) 28 (2): 247–248 (1988)

Recensiones

Kulturtechnik und Flurbereinigung in alpinen Landschaften 1987. Sonderdruck aus „Zeitschrift für Kulturtechnik und Flurbereinigung", Vol. 28, Heft 5, Seite 273–368, 1987. – Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg. – DM 46,–. – ISSN 0044-2984.

In 14 Beiträgen, wovon die Mehrzahl von Schweizer Autoren, zwei Beiträge aus Österreich und je einer aus Bayern und Südtirol stammen, werden die Probleme von Güterzusammenlegungen in den vier genannten Alpenländern behandelt. Die Kulturtechnik als technisch-planerisches Ingenieurfach hat die Aufgabe, die „Struktur ländlicher Räume zu entwickeln und neu zu ordnen" (nach FLURY 1987: 291). Nach KRONSTEINER ist das Ziel der agrarischen Operationen, die „bäuerliche Landwirtschaft in ihrer Vielfalt" zu erhalten, wobei Dorf, Flur und Natur in enger Wechselwirkung gesehen werden.

In einer Einführung (GRUBINGER) wird auf die unterschiedlichen geomorphologischen Verhältnisse des ca. 1000 km langen und durchschnittlich 150 km breiten

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Phyton, Annales Rei Botanicae, Horn

Jahr/Year: 1988

Band/Volume: 28_2

Autor(en)/Author(s): Stich Karl, Ebermann Robert, Forkmann Gert

Artikel/Article: Einfluß Cytochrom P-450-spezifischer Inhibitoren auf die Aktivität von Flavonoid-3Â'-hydroxylase und Flavonsynthase II bei verschiedenen Pflanzen. 237-247