



Quantitative Proteomanalytik von Riesling- und Dornfelder-Trauben sowie der Einfluss von traubeneigener Tyrosinase auf gesundheitsfördernde Inhaltsstoffe des Weins

Dissertation zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Matthias Riebel
geb. am 18.04.1982 in Mainz

Mainz, 2016



Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Zusammenfassung.....	VI
Abstract.....	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Trauben und Wein	1
1.1.1 Traubenwachstum	2
1.1.2 Proteine in Traube und Wein	3
1.2 Phenolische Weininhaltsstoffe.....	6
1.2.1 Einfluss von phenolischen Weininhaltsstoffen auf Eigenschaften des Weins	6
1.2.2 Klassifizierung von phenolischen Weininhaltsstoffen.....	7
1.2.2.1 Flavonoide.....	7
1.2.2.2 Phenolsäuren	9
1.2.2.3 Stilbene	10
1.2.3 Oxidativer Stress und die daraus resultierenden Krankheiten.....	12
1.2.4 Antioxidative Wirkung von phenolischen Weininhaltsstoffen.....	13
1.3 Tyrosinase	15
1.3.1 Reaktionen und Mechanismen der Tyrosinase	16
1.3.2 Aufbau der Tyrosinase aus Trauben.....	17
1.3.3 Most- und Weinoxidation	18
1.4 Ziele dieser Arbeit.....	19
2 Material und Methode	20
2.1 Geräte und Hilfsmittel	20
2.2 Chemikalien.....	23
2.3 Proteinbiochemische Arbeiten	26
2.3.1 Puffer und Lösungen.....	26
2.3.2 Gewinnung des Probenmaterials	34
2.3.3 Proteinfällungsmethoden	35
2.3.3.1 Acetonfällung	35
2.3.3.2 Phenolfällung	36
2.3.3.3 Proteinfällung mit „ProteoExtract Protein Precipi- tation Kit“ von Calbiochem (Calbiochem-Fällung) ..	36
2.3.3.4 Trichloressigsäurefällung (TCA-Fällung).....	36
2.3.3.5 Fällung nach Martinez.....	37
2.3.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	37
2.3.5 SDS-PAGE	38

2.3.6	Native PAGE	39
2.3.7	Zweidimensionale SDS-PAGE (2D-SDS)	39
2.3.8	Coomassie-Färbung	41
2.3.9	Silberfärbung.....	41
2.3.10	Aufreinigung von Tyrosinase aus Rieslingtrauben	42
	2.3.10.1 Gewinnung des Probenmaterials	42
	2.3.10.2 Größenausschluss-Chromatographie (SEC).....	42
	2.3.10.3 Dot Blot	42
	2.3.10.4 Konzentration von Tyrosinase.....	43
2.3.11	Bradford-Test.....	43
2.3.12	Konzentrationsbestimmung durch Absorptionsmessung bei 280 nm.....	43
2.3.13	Western Blot (WB)	44
2.3.14	Dünnschichtchromatographie (DC).....	45
2.3.15	Dialyse	45
2.3.16	Lyophilisation	46
2.3.17	Massenspektrometrie.....	46
2.3.18	Proteom-Annotierung.....	46
2.4	Spektroskopie.....	47
2.4.1	Absorptions-Spektroskopie	47
2.4.2	Bestimmung der Tyrosinase-Aktivität.....	47
	2.4.2.1 MBTH-Assay	47
	2.4.2.2 O ₂ -Verbrauchsmessung	48
2.4.3	Produktkinetiken	48
2.4.4	2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH) Test	48
2.5	Zellkultur	50
2.5.1	L-012-Assay.....	50
3	Ergebnisse.....	52
3.1	Fällung von Traubenproteinen.....	52
3.2	Annotation isolierter und identifizierter Trauben-proteine	53
3.3	Zweidimensionale SDS-PAGE von Traubenproteinen	60
3.4	Entwicklung des Proteoms von Rieslingtrauben des Jahrgangs 2012 während der Reifung	61
	3.4.1 Lipid Transfer Protein.....	65
	3.4.2 Tyrosinasen	66
	3.4.3 Chitinasen und TLPs.....	67
	3.4.4 Invertase	67
3.5	Vergleich der Entwicklung des Proteoms der Reifestadien von Rieslingtrauben der Jahrgänge 2012 und 2013.....	68
	3.5.1 Wetteranalysen der Jahre 2012 und 2013	69
3.6	Entwicklung des Proteoms von Dornfeldertrauben des Jahrgangs 2012 während der Reifung	72

3.6.1	Probenakquise	72
3.6.2	Vergleich der Proteinzusammensetzung von Dornfeldertrauben während der Reifung nach Calbiochem- und Phenolfällung	73
3.6.3	2D-Gelelektrophoresen der Grün- und Reifestadien von Dornfeldertrauben des Jahrgangs 2012.....	76
3.6.3.1	Tyrosinasen.....	78
3.6.3.2	Chitinasen	80
3.6.3.3	TLPs.....	80
3.7	Zusammenfassung der Untersuchungen des Traubenproteoms.....	80
3.8	Isolierung und Aufreinigung traubeneigener Tyrosinasen	82
3.9	Umsatz phenolischer Weinhaltstoffe durch Tyrosinase	85
3.9.1	Umsatz von Hydroxyzimtsäuren durch Tyrosinase aus Rieslingtrauben.....	86
3.9.1.1	Kaffee- und Kaffarsäure	86
3.9.1.2	p-Cumarsäure	87
3.9.1.3	Ferula- und Sinapinsäure.....	87
3.9.2	Umsatz von trans-Stilbenen durch Tyrosinase aus Rieslingtrauben.....	88
3.9.3	Umsatz von Chalkonen durch Tyrosinase aus Rieslingtrauben.....	89
3.9.4	Umsatz von Hydroxybenzoesäuren durch Tyrosinase aus Rieslingtrauben.....	90
3.9.4.1	Gallussäure und Ethylgallat.....	90
3.9.4.2	4-Hydroxybenzoesäure und 3,4-Dihydroxybenzoesäure.....	91
3.9.4.3	Vanillinsäure.....	92
3.9.4.4	Vergleich des Umsatzes von phenolischen Weinhaltstoffen durch Tyrosinase aus Rieslingtrauben	93
3.9.5	Sauerstoffverbrauchsmessungen mit Tyrosinase aus <i>Agaricus bisporus</i>	94
3.10	Bestimmung des Temperaturoptimums der Rieslingtyrosinase.....	96
3.11	Einfluss von Wein und Tyrosinase auf die antioxidative Kapazität von Zellkulturen.....	99
3.12	Einfluss von Tyrosinase aus <i>Agaricus bisporus</i> auf die antioxidative Wirkung von phenolischen Weinhaltstoffen	102
3.12.1	Kaffeensäure.....	104
3.12.2	Gallussäure.....	106
3.12.3	Ferulasäure.....	106
3.12.4	Resveratrol und Polydatin.....	108
3.12.5	p-Cumarsäure	108
3.12.6	Phlorizin	109

3.12.7	Zusammenfassende Betrachtung der Versuche zum Einfluss von Tyrosinase aus <i>Agaricus bisporus</i> auf die antioxidative Wirkung von phenolischen Weininhaltsstoffen	110
3.13	Einfluss von Tyrosinase aus Rieslingtrauben auf die antioxidative Wirkung von phenolischen Weininhaltsstoffen.....	112
3.13.1	Hydroxycimtsäuren	113
3.13.2	Hydroxybenzoesäuren	116
3.13.3	Chalkone.....	117
3.13.4	Stilbene	118
3.13.5	Zusammenfassende Betrachtung der Versuche zum Einfluss von Tyrosinase aus <i>Agaricus bisporus</i> und Rieslingtrauben auf die antioxidative Wirkung von phenolischen Weininhaltsstoffen	118
3.14	Verlauf der Tyrosinaseaktivität während der Weinbereitung von Riesling	120
3.14.1.	Einfluss von Schwefel (Kaliumdisulfit) auf die Tyrosinaseaktivität	124
3.14.1.	Einfluss von Bentonit auf die Tyrosinaseaktivität	125
4	Diskussion.....	127
4.1	Proteinextraktion aus pflanzlichem Gewebe.....	127
4.2	Proteom reifer Trauben	128
4.3	Entwicklung des Proteoms von Trauben während der Reifung	130
4.3.1	Verlauf der Expression von PR-Proteinen während der Traubenreifung	130
4.4	Isolierung und Aufreinigung von Tyrosinase aus Trauben.....	131
4.5	Temperaturabhängigkeit der Tyrosinase aus Trauben	133
4.6	Antioxidative Kapazität von Wein sowie dessen phenolische Inhaltsstoffe	135
4.6.1	Bioverfügbarkeit von Phenolen sowie deren Tyrosinaseoxidationsprodukte	137
4.6.1.1	Antioxidative Wirkung von Phenolen im Darm	141
4.6.2	Einfluss von Laccase auf die antioxidative Kapazität von Wein, sowie phenolischer Weininhaltsstoffe	142
4.6.3	Abschließende Betrachtung des Einflusses von Tyrosinase auf die antioxidative Kapazität von Wein sowie phenolischer Weininhaltsstoffe	143
6	Literatur	145
7	Verzeichnisse	167
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	167
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	168
7.3	Tabellenverzeichnis.....	171

8	Anhang	172
9	Veröffentlichungen	189
10	Danksagung	190
11	Lebenslauf	191
12	Erklärung	192

Zusammenfassung

Die Proteinzusammensetzung von Trauben hat einen großen Einfluss auf verschiedene Eigenschaften der aus ihnen produzierten Weine. Hierbei sind im Besonderen „*Pathogenesis-Related*“ (PR) Proteine von Bedeutung. Sie sind an der unerwünschten Trübung bei der Lagerung von Weißweinen beteiligt, können zur exzessiven Bräunung von Mosten beitragen, haben indirekten Einfluss auf die Haltbarkeit der Weine oder weisen allergenes Potential auf. In der vorliegenden Arbeit wurde die Proteinzusammensetzung reifer Dornfeldertrauben in einem bisher unerreichten Detailgrad bestimmt. Insgesamt konnten 712 Proteine identifiziert und quantifiziert werden. Die meisten dieser Proteine sind an „*stress response*“ Reaktionen und metabolischen Prozessen der Traube beteiligt. Während alle Schlüsselenzyme der Glykolyse gefunden wurden, konnten zwei Schlüsselenzyme der Glukoneogenese nicht nachgewiesen werden. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Glykolyse in reifen Trauben aktiver ist als die Glukoneogenese, was im Kontrast zu den bisherigen Erkenntnissen steht.

Tyrosinasen sind kupferhaltige Enzyme, die phenolische Substanzen zu o-Chinonen oxidieren. Während der Weinherstellung können sie so zur unerwünschten Bräunung von Mosten beitragen. Tyrosinasen sind in der Traube selbst unter anderem an der Pathogenabwehr beteiligt. In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal der Einfluss von Tyrosinase auf phenolische Inhaltsstoffe des Weins in Bezug auf ihre gesundheitsfördernde Wirkung untersucht. Hierbei wurde sowohl die Scavenger-Aktivität der Phenole als auch deren Einfluss auf den Oxidationszustand von menschlichen Zelllinien vor und nach Oxidation durch Tyrosinase untersucht. Es stellte sich heraus, dass ein Umsatz durch Tyrosinase das antioxidative Potential bei einigen phenolischen Weininhaltsstoffen, wie z.B. Resveratrol, noch weiter erhöhen kann. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass während der Weinherstellung Tyrosinase bis zur Gärung aktiv sein kann und sie somit ihre positive Wirkung auf die gesundheitsfördernde Wirkung von Wein entfalten kann.

Abstract

The protein composition of grapes has a great influence on various characteristics of the wines produced from them. Here, in particular, "pathogenesis-related" (PR) proteins are important. They are involved in the undesirable haze formation during the storage of white wines, may contribute to excessive browning of musts, have indirect influence on the durability of wine or have allergenic potential. In this study the protein composition of mature *Dornfelder* grapes was determined in an unprecedented level of detail. A total of 712 proteins were identified and quantified. Most of these proteins are involved in stress response reactions and metabolic processes of the grape. While all key enzymes of glycolysis were found, two key enzymes of gluconeogenesis could not be detected. This leads to the assumption that glycolysis is more active in ripe grapes than the gluconeogenesis what is in contrast to the previous findings.

Tyrosinases are copper-containing enzymes which oxidize phenolic substances to o-quinones. During the winemaking process, they can thus contribute to the undesired browning of musts. In the present work, the influence of tyrosinase on the health-promoting phenolic wine components was investigated.

Both the scavenger activity of the phenols, as well as their influence on the oxidation state of human cell lines before and after oxidation by tyrosinase was investigated. The results of this work revealed that an oxidation through tyrosinase can further increase the antioxidant potential of some phenolic wine components such as Resveratrol. It has also been shown that during winemaking tyrosinase can be active until the fermentation and thus can unfold their positive effect on the health benefits of wine.

1 Einleitung

1.1 Trauben und Wein

Die Geschichte des Weins ist eng mit der des Menschen verknüpft. So beschreibt schon die Bibel Noah als den ersten Ackerbauer und die Rebe als seine erste Nutzpflanze:

Noah aber fing an und ward ein Ackermann und pflanzte Weinberge.

(Genesis, Kapitel 9, Vers 20)

Wissenschaftliche Quellen datieren die Ursprünge des Weinbaus auf etwa 5400 bis 5000 vor Christus [1], wobei allgemein der Kaukasus als dessen geographischer Ursprung gilt [2]. Von dort aus verbreitete der Weinbau sich nach Palästina, Syrien, Ägypten und Mesopotamien [1]. Durch die Entdeckung von etwa 9000 Jahre alten Traubenkernen in China wurde die Diskussion um den Ursprung des Weinbaus neu angeregt [3]. Ob aus diesen Trauben jedoch auch Wein hergestellt wurde ist noch nicht bekannt.

Heute ist die Rebe (*Vitis vinifera*) die am meisten kultivierte Fruchtpflanze weltweit, was sie aus ökonomischer Sicht besonders interessant macht [4]. Trauben werden nicht nur für die Weinerzeugung genutzt und roh oder getrocknet als Rosinen konsumiert, sondern dienen als Rohstoff für eine Vielzahl von Nahrungsmitteln und kosmetischen Produkten [5, 6].

Zu den Ländern mit den größten bebauten Rebflächen gehören Spanien (1,023 Millionen Hektar), Frankreich (0,794 Millionen Hektar) und Italien (0,752 Millionen Hektar) [7]. In Deutschland beträgt die bebaute Rebfläche 102.000 Hektar. Die größte Weinbauregion in Deutschland ist Rheinhessen. Hier ist Riesling die wichtigste Rebsorte. Riesling ist einer der beliebtesten Weine in Deutschland und ist bekannt für seinen hohen Säuregehalt und sein süßes und fruchtiges Aroma [8]. Die wichtigste rote Rebsorte in Rheinhessen ist Dornfelder [7].

Aufgrund ihrer ökonomischen Relevanz und Beliebtheit bei deutschen Konsumenten wurden die beiden Rebsorten Riesling und Dornfelder für die Untersuchungen dieser Arbeit ausgewählt.

1.1.1 Traubenwachstum

Die Traube ist eine nicht-klimakterische Frucht. Sie besteht aus einem Perikarp (Fruchtgehäuse), das die Samen umschließt. Das Perikarp ist unterteilt in Exokarp (Schale), Mesokarp (Fruchtfleisch) und Endokarp (innere Epidermis des Perikarps) [9, 10]. Die Entwicklung der Traube lässt sich als doppelt-sigmoides Wachstumsmuster beschreiben (siehe Abbildung 1) [11].

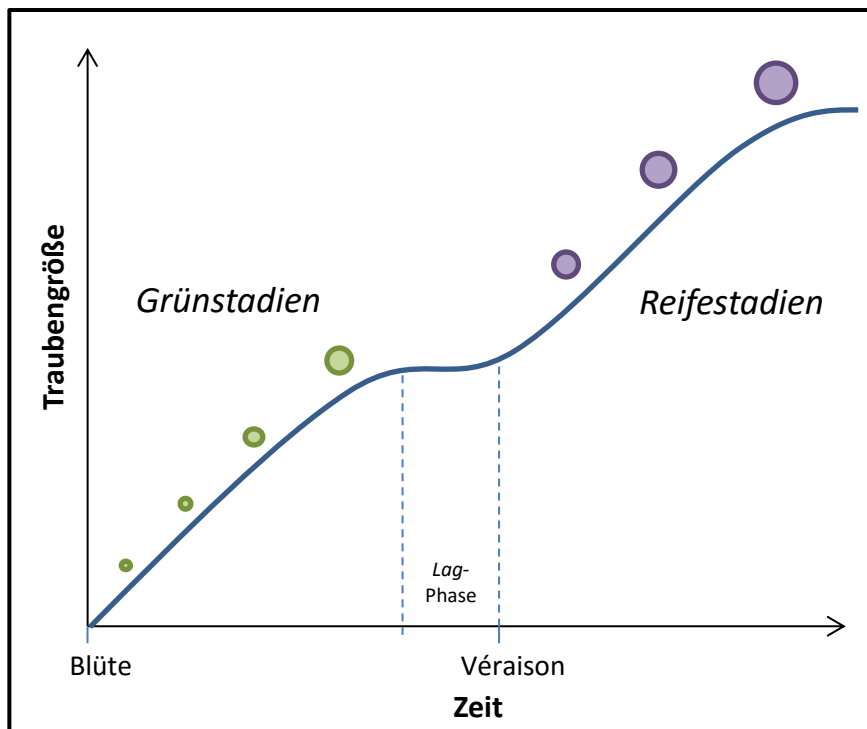


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Traubenwachstums
Dargestellt ist das doppelt-sigmoide Wachstumsmuster der Traube. Die Wachstumsperioden werden Grün- bzw. Reifestadien genannt.

Die erste Wachstumsphase (Grünstadien) wird vor allem durch Zellteilung mit anschließendem Zellwachstum bestimmt [12], wobei gegen Ende der Grünstadien die Rate des Zellwachstums allmählich abnimmt. Zu dieser Zeit ist die Traube selbst hart und grün, das Mesokarp ist reich an organischen Säuren wie Äpfel- und Weinsäure [13]. Die entsprechenden Ester und Salze dieser Säuren heißen Malat und Tartrat. Am Ende der Grünstadien kommt es zu einer Wachstumsverzögerung, der Lag-Phase, an die sich die sogenannte *Véraison* anschließt. Zu diesem Zeitpunkt beginnen sich die Trauben roter Rebsorten rotbläulich zu färben, was auf die Synthese und Anreicherung von farbigen Anthocyanen im Exokarp der Traube zurückzuführen ist [14]. Außerdem steigt das Wachstum der Traube nach der *Véraison* in der zweiten Wachstumsphase (Reifestadien) wieder an. Der Zuckeranteil der Trauben nimmt nach der *Véraison*

stark zu, wohingegen sich der Säureanteil verringert. Phenole sowie aromatische Komponenten werden in den Reifestadien vermehrt gebildet [15, 16]. Die Entwicklung des Traubenproteoms unterliegt während der gesamten Wachstumsperiode äußeren Umwelteinflüssen sowie pathogener Belastung [17].

1.1.2 Proteine in Traube und Wein

Die Proteine im Wein stammen nicht ausschließlich aus der Traube. Auch Infektionen mit Mikroorganismen, wie z.B. *Botrytis cinerea*, oder die für die Gärung des Weins zugesetzten Hefen haben einen Einfluss auf die Proteinzusammensetzung des Weins [18, 19]. Ein Großteil der aus Trauben stammenden Proteine im Wein sind „Pathogenesis Related“ (PR) Proteine [19]. PR-Proteine sind auch bei niedrigen pH-Werten, wie sie im Wein herrschen, stabil und zeigen eine hohe Resistenz gegen Proteolyse [20]. Bevor auf den Einfluss der PR-Proteine auf Eigenschaften des Weins eingegangen wird, werden im Folgenden die wichtigsten PR-Proteine im Wein vorgestellt.

Chitinasen

Die molekulare Masse der Chitinasen reicht von 28 bis 32 kD [21, 22]. Sie schützen Pflanzen gegen Pilzbefall, wie z.B. gegen *Botrytis cinerea* [23]. Chitinasen gehören zur Klasse 3 der PR-Proteine und sind in der Lage Chitin zu hydrolysieren, welches ein Bestandteil der Zellwände von Pilzen ist [24]. In der Traube sind sie sowohl in der Vakuole als auch im Apoplast lokalisiert [25]. Chitinasen werden in verschiedene Klassen unterteilt, wobei die Klasse IV Chitinasen den Großteil der Chitinasen in Trauben ausmacht [23, 26].

Thaumatähnliche Proteine (TLPs)

TLPs weisen eine molekulare Masse von 21 bis 24 kD auf [27]. Sie gehören zur Klasse 5 der PR-Proteine und kommen in hohen Konzentrationen in reifen Trauben vor [19, 28]. Ihr Name entstand aufgrund der starken Sequenzhomologie zu Thaumatin, einem stark süß schmeckenden Protein aus den Früchten der in den westafrikanischen Regenwäldern beheimateten Katamfe (*Thaumatococcus daniellii*) [29]. Durch die Erhöhung der Permeabilität von fungalen

Zellmembranen können TLPs das Wachstum von pathogenen Pilzen inhibieren [30, 31].

Lipid-Transfer Proteine (LTPs)

Die molekulare Masse von LTPs reicht von 9 bis 12 kD [32]. Sie zählen zur Klasse 14 der PR-Proteine und sind unter anderem Teil des pflanzlichen Abwehrsystems bei biotischem und abiotischem Stress [33-35]. LTPs sind vor allem in der Schale der Traube lokalisiert [36].

Invertase

Invertasen spalten Saccharose, die in den Blättern synthetisiert und zur Traube transportiert wurde, in Glucose und Fructose [15]. Sie weisen eine molekulare Masse von ca. 70 kD auf [37]. In den Weintrauben zählen sie zu den größten vorhandenen Proteinen [38]. Man unterscheidet hauptsächlich zwischen vakuolären und extrazellulären Invertasen, wobei die extrazellulären Invertasen bei biotischem und abiotischem Stress vermehrt exprimiert werden, was dazu geführt hat, dass Invertasen den PR-Proteinen zugeteilt wurden [39].

Tyrosinasen

Tyrosinasen gehören zur Klasse 1 der PR-Proteine [40]. Sie sind Typ-3 Kupferproteine und katalysieren die Bildung von o-Chinonen aus Monophenolen als auch aus o-Diphenolen [41-44]. Sie sind an der Immunantwort der Pflanze auf pathogenen Befall sowie an der Abwehr von Herbivoren beteiligt [42]. In Kapitel 1.3 wird genauer auf den Aufbau und Mechanismus der Tyrosinase eingegangen.

Mit etwa 0,05% haben Proteine nur einen geringen Anteil an der Masse von Trauben [45]. Auch im Wein ist die Proteinkonzentration von etwa 15 bis 230 mg/l relativ niedrig [19]. Einen Einfluss auf den Geschmack des Weins konnte für Proteine bisher nicht nachgewiesen werden [46]. Eine detaillierte Kenntnis über die Proteinzusammensetzung von Trauben ist für Önologen und Winzer jedoch wichtig, da Proteine einen großen Einfluss auf verschiedene Eigenschaften des Weins haben. So ist besonders die auf Proteinaggregation zurückzuführende Trübung von Weißweinen ein für den Weinerzeuger unerwünschter Pro-

zess, da diese unstabilen Weine einen niedrigen kommerziellen Wert haben und nicht für den Verkauf geeignet sind [47]. Chitinasen und TLPs sind die beiden Proteinklassen, die hauptsächlich an der Trubentstehung beteiligt sind [19, 48-50]. Zur Vermeidung der Trubentstehung wird heutzutage hauptsächlich Bentonit während der Weinbereitung eingesetzt [51]. Das unlösliche Schichtsilikat Bentonit bindet Proteine, welche anschließend nach Sedimentation des Bentonits entfernt werden können [51, 52]. Bei Bentonit handelt es sich allerdings um einen unspezifischen Adsorber, der nicht nur trübungsverursachende Teilchen aus dem Wein entfernt, sondern auch Farb- und Aromastoffe [52]. Der Einsatz von Bentonit ist auch mit einem Volumenverlust des Weins verbunden. So wird der weltweite jährliche Verlust durch den Einsatz von Bentonit auf 1 Milliarde US-Dollar geschätzt [53].

Ein weiterer problematischer Aspekt von Proteinen in Wein ist das allergene Potential bestimmter Traubenproteine [54]. So wurde LTP als Traubenallergen von der „International Union of Immunological Societies Allergen Nomenclature Subcommittee“ anerkannt [54]. Die Traubenproteine Endochitinase, TLPs, Expansin, Polygalacturonase-inhibition Protein und Beta-1,3-Glucanase werden diskutiert ebenfalls Allergien auslösen zu können [55-57]. In vielen Fällen handelt es sich hierbei jedoch um Pseudo-Allergien [54, 58].

Die Mostoxidation, die zu einer unerwünschten bräunlichen Verfärbung des Mostes führen kann, wird von Tyrosinasen aus der Traube und Laccasen aus *Botrytis cinerea* ausgelöst [59, 60]. Hierauf wird genauer im Kapitel 1.3.3 eingegangen.

Proteine im Wein haben allerdings nicht ausschließlich negative Eigenschaften auf das Produkt. So sind Mannoproteine aus Hefen in der Lage die Trübung von Weißweinen zu reduzieren [61] und Invertase ist an der Bildung von Schaum in Schaumweinen beteiligt [62].

1.2 Phenolische Weininhaltsstoffe

Im Jahr 1992 prägten Renaud und Lorgeril den Begriff des „French Paradox“ [63]. Dieses beschreibt den Umstand, dass im Gegensatz zu den meisten Ländern, in denen ein hoher Konsum an gesättigten Fetten positiv mit der Zahl der Todesfälle durch Herz-Kreislaufkrankungen (HKE) korreliert, es einige Gegenden in Frankreich gibt, in denen die Todesrate aufgrund von HKEs trotz hohem Fettkonsum niedrig ist. Hierbei wurde beobachtet, dass der Konsum von Wein negativ mit der Zahl der Tode durch HKEs korreliert. Der hohe Weinkonsum in Frankreich wurde so als Grund für das „French Paradox“ bestimmt. In früheren Untersuchungen wurde bereits ein Rückgang von Todesfälle durch HKEs bei moderatem Alkoholkonsum festgestellt [64]. Renaud und Lorgeril fanden jedoch statistische Hinweise, dass das „French Paradox“ wahrscheinlich nicht allein durch den Konsum von Alkohol erklärt werden kann [63]. Im Jahr 1993 konnten Frankel et al. zeigen, dass phenolische Weininhaltsstoffe in der Lage waren, die Oxidation von „Low Density Lipoproteinen“ (LDL) *in vitro* zu inhibieren. Die Oxidation von LDL gilt als ein Ursprung für Arteriosklerose, welche zu HKEs führen kann (siehe Kapitel 1.2.3) [65]. Weiterhin konnten epidemiologische Studien, die im Jahr 1993 veröffentlicht wurden, einen Rückgang von HKEs im Zusammenhang mit einer phenolreichen Ernährung beobachten [66, 67]. Diese Erkenntnisse führten zu einem großen Interesse an der antioxidativen Kapazität von phenolischen Weininhaltsstoffen, die ab diesem Punkt, neben moderatem Alkoholkonsum, als mögliche Erklärung für das „French Paradox“ angesehen wurden [68].

1.2.1 Einfluss von phenolischen Weininhaltsstoffen auf Eigenschaften des Weins

Wein enthält eine Vielzahl von phenolischen Substanzen, die weitestgehend aus der Traube stammen [69]. In der Traube selbst sind sie hauptsächlich in der Schale lokalisiert und diffundieren bei der Traubenpressung in den Most. Bei Rotweinen gelangt jedoch der Großteil der Phenole bei der Maischegärung in den Wein, da hier der lange Kontakt der Traubenschalen mit dem Most und der steigende Ethanolgehalt die Extraktion der Phenole aus der Schale erleichtern. Der Gesamtgehalt von phenolischen Substanzen in einem Glas Rotwein beträgt

in etwa 200 mg, im Gegensatz zu lediglich ca. 40 mg in einem Glas Weißwein [69]. Dabei haben sie großen Einfluss auf verschiedene Eigenschaften des Weins. So sind sie für die Bitterkeit und Adstringens in Rotweinen verantwortlich [69, 70]. Auch die Farbe von Weinen wird von phenolischen Inhaltsstoffen bestimmt [69, 70]. Phenolen kommt eine Schlüsselrolle bei der Alterung von Wein zu. Durch die Oxidation von Phenolen durch Luftsauerstoff bekommen Weine eine bräunliche Färbung, die mit Bildung von Fehleraromen einhergeht (siehe Kapitel 1.3.3) [60, 69].

1.2.2 Klassifizierung von phenolischen Weininhaltsstoffen

Der Begriff phenolische Weininhaltsstoffe oder phenolische Substanzen bezieht sich auf Stoffe die über mindestens einen aromatischen Ring mit einer oder mehreren aromatischen Hydroxylgruppen verfügen [69]. Für den bekannten Begriff der „Polyphenole“ gibt es keine einheitliche wissenschaftliche Definition [71], weswegen er in neuerer Literatur immer mehr vermieden wird. Hier verwendet man hauptsächlich die Begriffe „phenolics“, „phenolic substances“ oder „phenolic compounds“.

In der Pflanze selbst sind die phenolischen Substanzen an zahlreichen Prozessen wie Pathogenabwehr, Färbung und UV-Schutz, Reproduktion und Wachstum sowie Schutz vor oxidativen Zellschäden beteiligt [71, 72].

Im Wein finden sich drei Klassen von phenolischen Inhaltsstoffen, die anhand ihrer chemischen Struktur voneinander unterschieden werden: Flavonoide, Phenolsäuren und Stilbene, welche sich in weitere Unterklassen unterteilen lassen [69, 73]. In Tabelle 1 ist die durchschnittliche Konzentration der in dieser Arbeit untersuchten phenolischen Weininhaltsstoffe in Rot- und Weißweinen angegeben. Die Daten beruhen auf dem „Phenol-Explorer“, einem Projekt, das u.a. Analysen zum Phenolgehalt von Weinen in einer zentralen Datenbank zusammenfasst [74-76].

1.2.2.1 Flavonoide

Flavonoide im Wein weisen mehrere aromatische Ringe mit aromatischen Hydroxylgruppen auf. Mit Ausnahme der Chalkone besitzen alle Flavonoide ein

spezifisches 3-Ringsystem (siehe Abbildung 2). Die meisten Flavonoide verfügen über aromatische Hydroxylgruppen in den Position 5, 7 und 4'. Die wichtigsten Flavonoide im Wein werden unterteilt in Flavonole, Flavanole (Catechine) und Anthocyane (Cyanidine) [69, 71, 73].

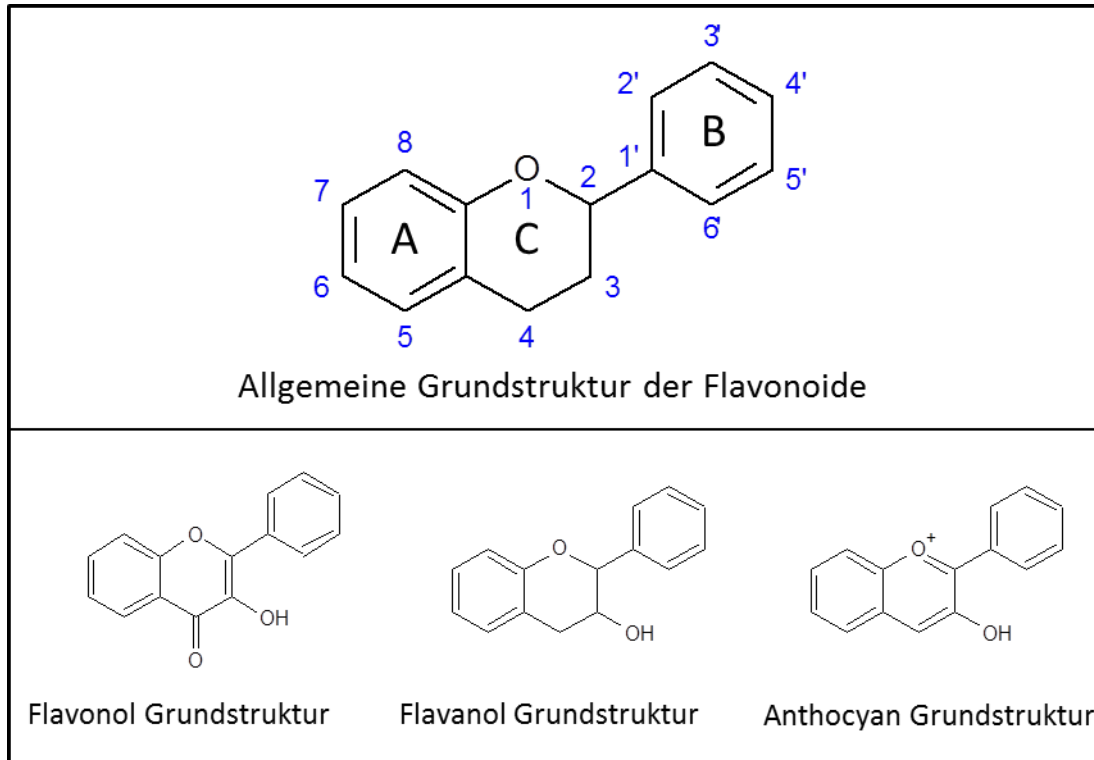


Abbildung 2: Grundstruktur der Flavonoide

Flavonole verfügen über eine Doppelbindung zwischen C2 und C3, eine Carbonylgruppe in Position 4, eine Hydroxylgruppe in Position 3. Beispiele sind Quercetin und Kaempferol sowie deren glykosylierten Formen Rutin und Astragalin.

Flavanole oder Catechine besitzen eine Hydroxylgruppe in Position 3. Sie gehören zu den häufigsten Flavonoiden in Traube und Wein [69, 73]. Flavanole tragen zu einem großen Teil der Adstringens von Weinen bei [77]. Beispiele sind Catechin und Epicatechin. Als Adstringens bezeichnet man die Eigenschaft des Weins einen Reiz auszulösen, der ein „pelziges“ oder „raues“ Mundgefühl verursacht [78, 79].

Anthocyane verfügen über Doppelbindungen zwischen C3 und C4 sowie C2 und O1. Hierdurch liegt das Sauerstoffatom positiv geladen vor. Sie sind für die Farbe des Rotweins verantwortlich [69]. Beispiele sind Cyanidin sowie sein Glykosid Chrysanthemin.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten **Chalkone** Phloretin und Phlorizin sind in Abbildung 3 dargestellt.

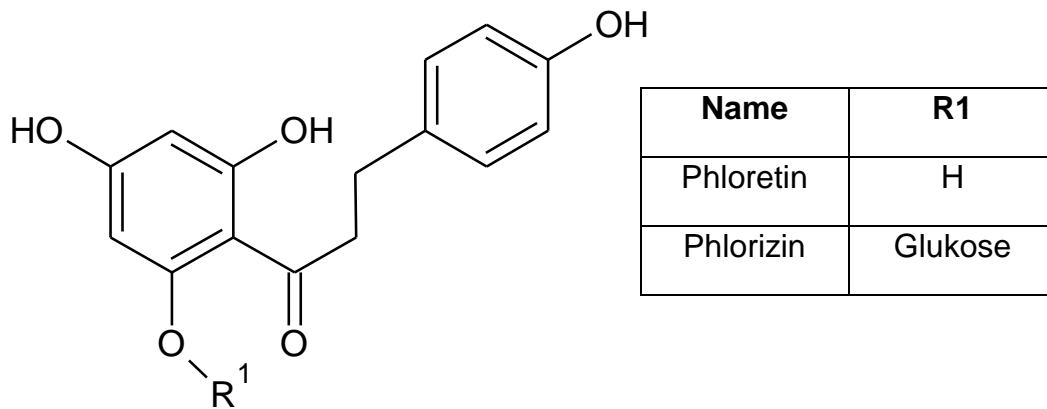


Abbildung 3: Struktur der untersuchten Chalkone

Es ist nur wenig über den Einfluss von Chalkonen auf Eigenschaften des Weins bekannt. Auch gibt es nur wenige Untersuchungen, welche die Konzentration von Phloretin und Phlorizin im Wein bestimmt haben. In rotem Sangiovese-Wein konnte Phloretin in einer Konzentration von unter 0,1 µg/ml nachgewiesen werden, die von Phlorizin lag bei 1 µg/ml [80].

1.2.2.2 Phenolsäuren

Phenolsäuren werden noch weiter in Benzoesäuren und Hydroxycimtsäuren unterteilt. Die in dieser Arbeit untersuchten Benzoesäuren sind in Abbildung 4 dargestellt. Benzoesäuren sind in jungen Weinen nur gering konzentriert [69]. Allerdings wird bei der Reifung von Weinen in Eichenfässern Gallussäure durch Hydrolyse von Tanninen frei. Hydrolysierbare Tannine stammen aus der Eiche

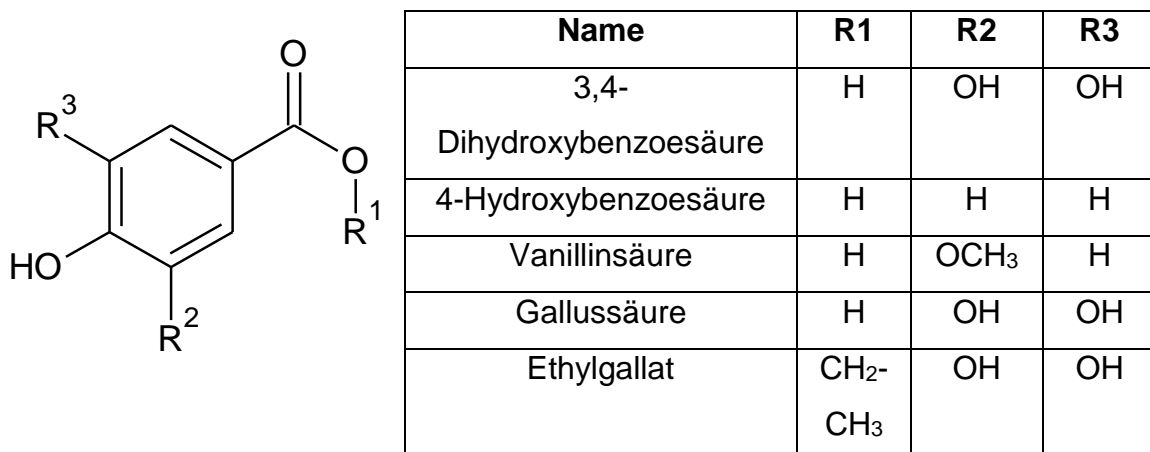


Abbildung 4: Struktur der untersuchten Benzoesäuren

selbst und sind Kondensate aus Gallussäure, Ellagsäure und Glukose oder anderen ähnlich aufgebauten Hexosen [69]. Außerdem werden Flavonole, Flavone, Flavanone und Flavanole im Darm über mehrere Zwischenschritte zu Benzoesäuren metabolisiert (siehe 4.6.1) [81, 82], was die antioxidative Wirkung von Phenolsäuren besonders interessant macht.

Hydroxyzimtsäuren sind die wichtigsten phenolischen Inhaltsstoffe in Weißwein [69]. Sie basieren alle auf den Strukturen von Kaffee-, Cumar- und Ferulasäure. In Trauben kommen einfache, freie Hydroxyzimtsäuren nicht vor. Hier liegen sie u.a. als Ester der Weinsäure vor [69, 73]. Die Namen dieser Ester setzen sich aus „Tartrat“ und der entsprechenden Hydroxyzimtsäure zusammen. So entsteht z.B. aus KAffeesäure und TARtrat die Kaftarsäure. Diese ist die vorherrschende Hydroxyzimtsäure in Trauben [59, 69]. Die Tartratester der Hydroxyzimtsäuren sind im Weinmedium anfällig für Hydrolyse und ihre freien Formen lassen sich bereits in jungen Weinen nachweisen [69]. In Abbildung 5 sind die in dieser Arbeit untersuchten Hydroxyzimtsäuren dargestellt.

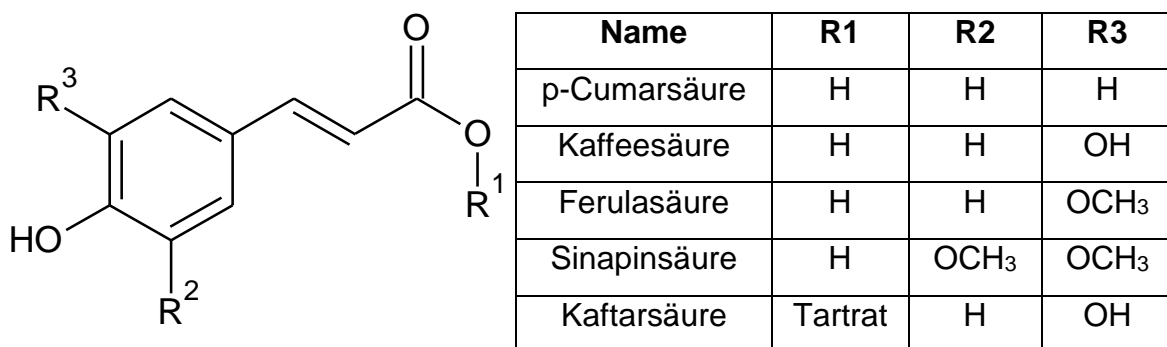
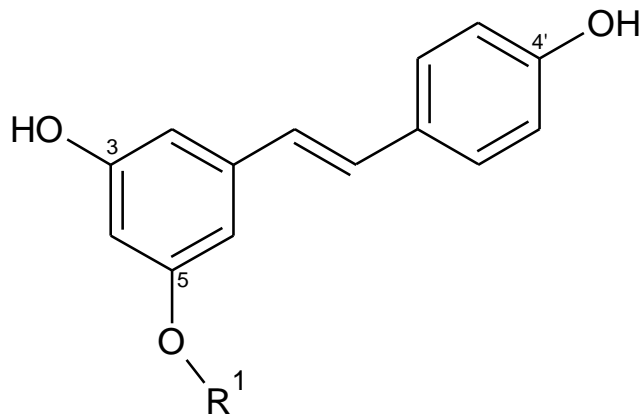


Abbildung 5: Struktur der Untersuchten Hydroxyzimtsäuren

1.2.2.3 Stilbene

Stilbene sind in Traube und Wein eher gering konzentriert (siehe Tabelle 1) [69]. Trotz seiner geringen Konzentration ist das Stilben Resveratrol wohl der bekannteste und am meisten erforschte phenolische Weininhaltsstoff [73]. In mehreren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Resveratrol in der Lage ist viele Krankheiten in Tieren, wie HKEs und Krebs, zu inhibieren [73]. In der Pflanze selbst wird Resveratrol als Antwort auf Pilzbefall wie *Botrytis cinerea* exprimiert [69]. Die Strukturen der in dieser Arbeit untersuchten Stilbene sind in Abbildung 6 dargestellt.



Name	R1
Resveratrol	H
Polydatin	Glukose

Abbildung 6: Struktur der untersuchten Stilbene

Die in dieser Arbeit verwendeten phenolischen Weinhaltstoffe wurden als typische Vertreter ihrer Substanzklassen ausgewählt. Die aus der Literatur bekannten Flavonole Quercetin oder Kaempferol wurden nicht getestet, da sie keine Substrate der Tyrosinase sind [83].

Tabelle 1: Durchschnittliche Konzentration phenolischer Weinhaltstoffe in Weinen

Die Daten beruhen auf dem „Phenol-Explorer“, einem Projekt, das u.a. Analysen zum Phenolgehalt von Weinen in einer zentralen Datenbank zusammenfasst [74-76]. *Die Daten der Chalkone Phlorizin und Phloretin stammen aus einer Veröffentlichung von Vrhovsek et al. [80] und beziehen sich nur auf einen Wein (Sangiovese, rot). kA: keine Angabe

	Konzentration in Weißwein [mg/100ml]	Konzentration in Rotwein [mg/100ml]
Hydroxybenzoesäuren		
4-Hydroxybenzoesäure	0,02	0,55
2,5-Dihydroxybenzoesäure	1,82	0,46
3,4-Dihydroxybenzoesäure	0,03	0,17
Gallussäure	0,22	3,59
Ethylgallat	kA	1,53
Vanillinsäure	0,04	0,32
Hydroxyzimtsäuren		
Kaffeesäure	0,24	1,88
Kaftarsäure	2,15	3,35
p-Cumarsäure	0,15	0,55
Ferulasäure	0,09	0,08
Sinapinsäure	0,06	0,07
Stilbene		
Resveratrol	0,04	0,27
Polydatin	0,25	0,62
Chalkone		
Phloretin*	kA	0,01*
Phlorizin*	kA	0,1*

1.2.3 Oxidativer Stress und die daraus resultierenden Krankheiten

Heutzutage gilt es als gesichert, dass oxidativer Stress und Entzündungen zusammenwirkende Konditionen sind [84]. Oxidativer Stress wird mit einer Vielzahl von menschlichen Krankheiten assoziiert. Hierzu zählen HKEs, Tumorbildung, Diabetes, Arthritis sowie weitere altersbedingte Krankheiten [84-87]. Die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) ist Teil des Entzündungsprozesses. Aktivierte Entzündungszellen produzieren ROS um Pathogene zu eliminieren [84]. Oxidativer Stress entsteht, wenn ein Ungleichgewicht zwischen oxidativ- und antioxidativ-wirkenden Stoffen vorherrscht [88]. Hierbei hat auch die Ernährung einen großen Einfluss auf das oxidative Potential verschiedener Gewebe, Zellen, Blut und Biomoleküle [88-90].

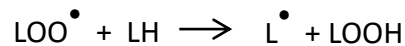
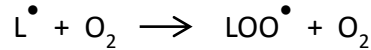
So führen Reaktionen von mehrfach ungesättigten Zellmembranlipiden mit ROS zur sogenannten Lipidoxidation. Hierdurch werden die Lipide soweit verändert, dass sie ihre Flexibilität verlieren und die Zellmembran durchlässig wird. Bei Erythrozyten führt die Lipidoxidation zum Austritt von Häm aus der Zelle [88].

Ein weiterer Effekt von oxidativem Stress ist die unter 1.2 erwähnte LDL-Oxidation. Eine fettreiche Ernährung führt zu einer erhöhten Plasmakonzentration von LDL, welches an Blutgefäßwänden abgelagert wird [91]. Sowohl kleinere Läsionen der Blutgefäße, die eine Entzündungsreaktion hervorrufen, als auch anhaltende fettreiche Kost können zur Oxidation von LDL führen [90-92]. Diese resultiert in einer Konformationsänderung des LDL-Partikels, wodurch sie leichter von monozytischen Makrophagen aufgenommen werden können [93]. Dies induziert die Umwandlung von Makrophagen zu Schaumzellen nach einem bisher unbekanntem Mechanismus [94]. Schaumzellen sind ein Bestandteil arteriosklerotischem Plaques, welche ein Hauptgrund für die Entwicklung von HKEs sind [95].

Sowohl Lipid- als auch LDL-Oxidation laufen nach den in Abbildung 7 gezeigten Reaktionschemata ab.

Initiation:

(durch UV/
Singulett Sauerstoff/
Metallionen/
ROS)

**Propagation:****Abbildung 7: Mechanismus der Lipidoxidation**

Nach Generierung eines Lipidradikals durch UV, Singulett Sauerstoff, Metallionen oder ROS führt eine Kettenreaktion mit Sauerstoff zur weiteren Entstehung von Lipidperoxiden. L: Lipid; \bullet : Radikal. Nach Shahidi und Ambigaipalan 2015

1.2.4 Antioxidative Wirkung von phenolischen Weininhaltsstoffen

Mehrere Studien konnten zeigen, dass eine phenolreiche Ernährung, bestehend aus Gemüse und Obst, die oxidative Kapazität des Blutes, die LDL-Oxidation oder allgemein das Auftreten von HKEs erniedrigen [96-100]. Verantwortlich hierfür wird unter anderem die Fähigkeit der phenolischen Substanzen gemacht mit ROS zu stabilen Radikalen zu reagieren [71, 73]. Diese Eigenschaft wird Radikalscavenger-Aktivität oder einfach Scavenger-Aktivität genannt. Für die Reaktion phenolischer Substanzen mit Radikalen wurden zwei mögliche Mechanismen vorgeschlagen [101]. Der erste basiert auf der Fähigkeit von phenolischen Substanzen ein H-Atom an ein freies Radikal abzugeben und wird als „H-Atom Transfer“ (HAT) bezeichnet. Dies wird möglich, da die Bindungsdissoziationsenergie (BDE) der aromatischen Hydroxylgruppen mit etwa 87-90 kcal/mol (in der Gasphase) relativ gering ist [71]. Beim zweiten Mechanismus, dem „Single-Electron Transfer“ (SET), überträgt die phenolische Substanz lediglich ein Elektron auf freie Radikale. Hier bestimmt das Ionisierungspotential (IP) der aromatischen Hydroxylgruppe, ob dieser Mechanismus begünstigt wird [71]. BDE und IP sind grundlegende physiochemische Parameter, die genutzt werden können, um die potentielle Effizienz des HAT oder SET beurteilen zu können. In Abbildung 8 sind die beiden Mechanismen schematisch dargestellt.

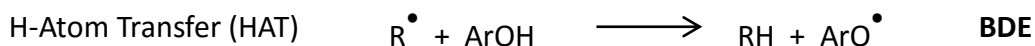


Abbildung 8: Postulierte Mechanismen der Radikalfänger-Reaktionen von phenolischen Substanzen

H-Atom Transfer (HAT) und Single-Electron Transfer (SET) sind die Hauptmechanismen durch die phenolische Substanzen ihre Scavenger-Aktivität ausüben. Die Bindungsdissoziationsenergie (BDE) und das Ionisierungspotential (IP) eines Phenols sind zwei physiochemische Parameter, die genutzt werden, um die potentielle Effizienz der beiden Prozesse abschätzen zu können. Ar: Aromat; \bullet : Radikal. Nach Quideau et al. 2011

Die Effizienz der antioxidativen Wirkung von Phenolen durch Scavenger-Aktivität hängt von der Schnelligkeit des HAT bzw. SET und der Stabilität des entstehenden Phenoxyradikals ab. Dieses sollte weder mit den Lipidperoxiden noch unoxidierten Lipiden reagieren. Durch die Stabilität des Phenoxyradikals wird die Kettenreaktion (Propagation) unterbrochen [71].

Die Frage, ob eine phenolische Substanz nach dem HAT oder SET Mechanismus freie Radikale reduziert, kann nicht immer eindeutig beantwortet werden. Zum einen hängt es von den Beträgen der BDE und des IP ab, zum anderen wie das entstehende Phenoxyradikal stabilisiert werden kann. Allgemein gilt, dass die Scavenger-Aktivität einer phenolischen Substanz mit der Anzahl der aromatischen Hydroxylgruppen steigt [102]. Die Position dieser Hydroxylgruppen zueinander hat hierbei großen Einfluss auf die Stärke der Scavenger-Aktivität und deren Mechanismus. Benachbarte aromatische Hydroxylgruppen begünstigen den HAT Mechanismus [71, 103]. Durch Oxidation entstandene Phenoxyradikale können von einer benachbarten Hydroxylgruppe über Wasserstoffbrücken stabilisiert werden, was die BDE des Phenols stark senkt. Weitere Einflussfaktoren für die Stärke der Scavenger-Aktivität sind Substituenten, die die Elektronendichte des aromatischen π -Systems beeinflussen. Substituenten in *para*- oder *ortho*-Position, die die Elektronendichte des π -Systems erhöhen (positiver mesomerer Effekt oder +M-Effekt) fördern den HAT Mechanismus in dem sie die BDE erniedrigen und das entstandene Radikal über Resonanzeffekte stabilisieren können [71].

Verfügt eine phenolische Substanz über ein ausreichend großes aromatisches π -System und zusätzlich über keine benachbarten aromatischen Hydroxylgruppen wird der SET Mechanismus bevorzugt [71, 103].

Phenoxyradikale können über verschiedene Effekte stabilisiert werden. Hierbei gilt: Je größer ein π -System ist, desto stabiler ist das entstehende Phenoxyradikal. Negative mesomere Effekte (-M-Effekt) von Substituenten in *para*- oder *ortho*-Position können Radikale ebenfalls durch die Konjugation ihres freien Elektronenpaares stabilisieren [71].

Bei aromatischen π -Systemen, die sich über mehrere Ringe erstrecken oder die über Substituenten verfügen, die das π -System erweitern, hat die Position der Hydroxylgruppen großen Einfluss auf die Stabilität der entsprechenden Phenoxyradikale. So können z.B. im Fall des Resveratrol Radikale, die durch Oxidation der Hydroxylgruppe in 4' Position entstehen, über das gesamte Molekül stabilisiert werden (p-Position zur Vinylgruppe). Dies ist bei den Hydroxylgruppen in den Positionen 3 und 5 nicht möglich (m-Position zur Vinylgruppe) [103].

1.3 Tyrosinase

Tyrosinasen (EC 1.14.18.1) sind Typ-3 Kupferproteine, die in allen Domänen des Lebens auftreten [104-106]. Sie kommen in verschiedenen Prokaryoten sowie in Pflanzen, Pilzen, Arthropoden und Säugetieren vor. Sie sind für die Synthese von Melanin in den Haaren und Haut von Säugetieren verantwortlich sowie der bräunlichen Verfärbung von Obst und Gemüse nach Zellschädigung. In Pflanzen, Schwämmen und vielen Invertebraten sind Tyrosinasen wichtig für die Wundheilung und primäre Immunantworten. In Arthropoden spielen sie eine Rolle beim Aufbau der Kutikula und in Bakterien schützen sie die DNA vor Schäden durch UV-Strahlung [44, 104, 107-109].

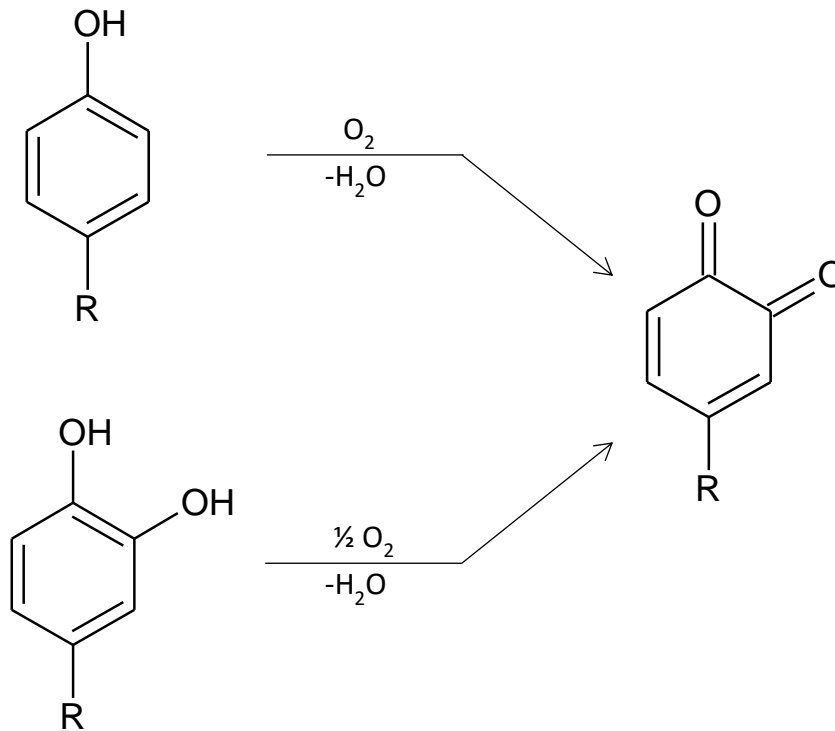


Abbildung 9: Von Tyrosinase katalysierte Reaktionen

Tyrosinasen katalysieren die Oxidation von Monophenolen und o-Diphenolen zu o-Chinonen. Für beide Reaktionen wird molekularer Sauerstoff benötigt.

1.3.1 Reaktionen und Mechanismen der Tyrosinase

Die Tyrosinase katalysiert zwei Reaktionen unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff: Die Oxidation von Monophenolen und o-Diphenolen zu den korrespondierenden o-Chinonen [41, 43, 44, 107]. Beide Reaktionen sind in Abbildung 9 dargestellt. Enzyme welche die Oxidation von o-Diphenolen zu den korrespondierenden Chinonen katalysieren werden als allgemein als Polyphenoloxidasen (PPOs) bezeichnet. Bei Tyrosinasen handelt es sich also um PPOs die zusätzlich auch Monophenole umsetzen können. PPOs die ausschließlich o-Diphenole umsetzen können werden als Catecholoxidasen bezeichnet. Die Unterscheidung hinsichtlich der Substratspezifität hängt hierbei von der Präsenz von zwei spezifischen Aminosäuren (Glutaminsäure und Asparagin) ab, die ein konserviertes Wassermolekül fixieren und dessen pK absenken, so dass es das phenolische Substrat deprotonieren kann, wodurch dessen Bindung an CuA ermöglicht wird [44]. Bei der in dieser Arbeit beschriebenen Isolierung von PPOs aus Rieslingtrauben handelt es sich um ein Gemisch von PPO-Isoformen (siehe 3.4.2), das in seiner Gesamtheit Tyrosinaseaktivität zeigt (siehe 3.9). Aus

diesem Grund werden die in dieser Arbeit isolierten PPOs im Folgenden als Tyrosinasen bezeichnet.

Beim Umsatz von phenolischen Stoffen durch Tyrosinase ist, unabhängig von der Art des Substrats, ein Rückgang der Tyrosinaseaktivität über die Zeit zu beobachten [110]. Die Ursachen dieses als „*suicide inactivation*“ bezeichneten Prozesses werden in der aktuellen Literatur noch kontrovers diskutiert.

1.3.2 Aufbau der Tyrosinase aus Trauben

Die meisten Tyrosinasen aus Pflanzen sind Monomere mit einer Masse von etwa 70 kD [42, 111-114]. Der schematische Aufbau der Tyrosinase aus Trauben ist in Abbildung 10 dargestellt. Nach Proteolyse der zwei N-terminalen Signalpeptide entsteht die latente Form der Tyrosinase mit etwa 60 kD. Die N-terminale Domäne enthält die katalytische Einheit mit den CuA und CuB Atomen. Ihre molekulare Masse wurde für Tyrosinase aus Grenache-Trauben auf 38,4 kD bestimmt [115]. Ein kurzer Linkerbereich (ca. 2 kD) verbindet die N-terminale- mit der etwa 20 kD großen C-terminalen Domäne. Diese schirmt den Zugang zum katalytischen Zentrum vor phenolischen Substraten ab [41, 43, 44, 112, 113, 116, 117]. Das Entfernen der C-terminalen Domäne, durch Proteolyse oder durch Detergenzien wie z.B. SDS, öffnet den Zugang für Substrate zur katalytischen Einheit [112, 117]. Liegt die N-terminale Domäne ohne Signalpeptid und dem C-Terminus vor, spricht man von der aktiven Form der Tyrosinase.

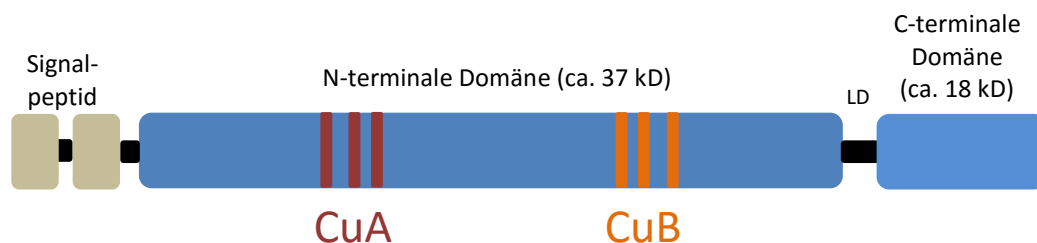


Abbildung 10: Schematischer Aufbau der Tyrosinase aus Trauben

Die N-terminale Domäne der Tyrosinase in Trauben hat eine molekulare Masse von etwa 38 kD und enthält die katalytische Einheit. Die C-terminale Domäne weist eine molekulare Masse von etwa 20 kD auf. Die roten und orangen Markierungen repräsentieren jeweils drei Histidine, die das jeweilige Kupferatom koordinieren. LD: Linker-Domain

1.3.3 Most- und Weinoxidation

Die Oxidation von Weinen ist ein unerwünschter Prozess, da sie negative Auswirkungen auf dessen Aroma und Farbe aufweist. Es handelt sich hierbei um relativ langsame chemische Prozesse ohne Enzyimbeteiligung, die während der Alterung des Weins in Gegenwart von Sauerstoff ablaufen. Phenolische Weininhaltsstoffe reagieren hierbei mit Luftsauerstoff, wobei ROS entstehen, die mit weitreichenden negativen Konsequenzen für die Sensorik einhergehen [60]. Außerdem kommt es zu einer unerwünschten bräunlichen Verfärbung bei Rot- und Weißweinen [60, 118].

Die Oxidation von Most während der Weißweinbereitung wird von Enzymen wie der Tyrosinase aus Trauben oder auch Laccasen, die aus dem Befall der Traube mit *Botrytis cinerea* stammen, katalysiert [59, 60]. Hierbei werden phenolische Substanzen zu Chinonen umgesetzt. Im Gegensatz zur Weinoxidation entstehen dabei jedoch keine ROS, die negative Auswirkungen auf die Sensorik

Oxidation vor Gärung ↓ gering stark	Hyper-Reduktion	Extremer Schutz vor Oxidation durch Anwendung von SO ₂ , Ascorbinsäure und Inertgas bei Maische, Pressung und Mostverarbeitung. Keine Oxidation.	↓ kurz lang
	reduktive Vinifikation	Anwendung von SO ₂ und eventuell Ascorbinsäure, beschränkter Sauerstoffzutritt bei der Mostverarbeitung. Keine Oxidation	
	Normalverarbeitung	Schwefelung des Mostes ohne besondere Maßnahmen zur Vermeidung von Sauerstoffaufnahme. Geringe Oxidation	
	oxidative Vinifikation	Keine Schwefelung vor Gärung, keine Maßnahmen zur Verhinderung des Sauerstoffzutritts. Passive Oxidation	
	aktive Mostoxidation (Hyper-Oxidation)	Kein SO ₂ vor Gärung, aktive Zufuhr von reinem Sauerstoff oder Luft. Gezielte Oxidation	

Abbildung 11: Reduktive bzw. oxidative Mostverarbeitung bei der Bereitung von Weißwein

Nach Schneider 2008

des Weines haben [60]. Die Mostoxidation ist schneller und substratspezifischer als die Oxidation von Wein. Auch hier kommt es zu einer unerwünschten bräunlichen Verfärbung des Mediums. Die Mostoxidation kann durch Zugabe von SO₂ oder Sulfiten inhibiert werden (siehe Abbildung 11). Hierbei wird die Tyro-

sinase über kovalente Bindung von Sulfite an Histidine, die das CuB-Atom des katalytischen Zentrums koordinieren, irreversibel inaktiviert [119]. Auch über den Ausschluss von Sauerstoff während der Weinbereitung kann eine Oxidation des Mostes verhindert werden [60]. Die Inhibierung der Mostoxidation geht jedoch mit einer kürzeren Haltbarkeit der fertigen Weine einher, da mit dem höheren Phenolgehalt auch die Weinoxidation zunimmt. Bei der sogenannten Hyperoxidation wird dem Most aktiv Sauerstoff zugeführt und vor der Gärung kein Schwefel zugesetzt. Dies führt dazu, dass die Phenole im Most von Enzymen weitestgehend umgesetzt werden. Nachfolgende autokatalytische Polymerisierungen der chinoiden Produkte führen zu deren Ausflockung aufgrund geringer Löslichkeit im wässrigen Medium des Mostes. Auf diese Weise werden zwar die gesundheitsfördernden Phenole dem Most komplett entzogen aber der resultierende Wein erreicht eine hohe Haltbarkeit. Allerdings kommt es hierbei zu Aromaeinbußen des Weins, die für unterschiedliche Rebsorten verschieden stark ausfallen können [60].

1.4 Ziele dieser Arbeit

Obwohl bereits Untersuchungen zur Entwicklung des Proteoms von Trauben während der Reifung durchgeführt wurden, ist über den Verlauf der Proteinzusammensetzung der beiden Rebsorten Riesling und Dornfelder während der Grün- und Reifestadien nur wenig bekannt. Hierbei ist die Expression von PR-Proteinen, welche die Eigenschaften von Wein negativ beeinflussen können, von besonderem Interesse. Außerdem ist das Proteom reifer Trauben bisher noch nicht im Detail bestimmt worden. Bisher konnte lediglich anhand von DNA-Analysen das Traubenproteom prognostiziert werden. In der vorliegenden Arbeit wird das Proteom reifer Trauben in einem bisher unerreichten Detailgrad vorgestellt und im Weiteren die Expression von PR-Proteinen während der Reifung von Dornfelder- und Rieslingtrauben untersucht. Hierbei ist die Tyrosinase aus Trauben von besonderem Interesse. Ihr Einfluss auf die Eigenschaften des Weins, besonders auf die gesundheitsfördernden phenolischen Inhaltsstoffe, soll untersucht werden. Dabei steht die Frage im Vordergrund, welchen Einfluss die Oxidation der phenolischen Weinhaltstoffe durch die Tyrosinase auf deren Scavenger-Aktivität und antioxidatives Potential hat.

2 Material und Methode

2.1 Geräte und Hilfsmittel

2D Apparaturen und Verbrauchsmittel

IEF-Gelelektrophoreseapparatur, Amersham Pharmacia Biotech, Schweden

IPGphor, Amersham Pharmacia Biotech, Schweden

Hofer Electrophorese Unit SE600, Amersham Pharmacia Biotech, Schweden

IEF-Strips, ImmobilineTM DryStrip pH 3-10, 11 cm, GE Healthcare, Freiburg

Blot-Apparaturen und Hilfsmittel

Immun-Blot PVDF Membran, BioRad, München

Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell, BioRad, München

Whatman Protran BA 83 Nitrocellulose-Membran, Whatman GmbH, Dassel

Blockthermostat

TCR 100, Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH) Test

FLUOstar Omega microplate reader, BMG Labtech GmbH, Ortenberg

96-well flat-bottom Rotilab microtest plates, Roth, Karlsruhe

Dünnschichtchromatographie

ALUGRAM SIL G Kieselgelplatten (0,2 mm), Macherey-Nagel, Düren

Eismaschine

ZBE 30-10, Ziegler-Eismaschinen, Isernhagen

FPLC

BioLogic HR Workstation, Bio-Rad, München

Auto-Injection Valve AV 7-3, Bio-Rad, München

Fraction Collector Model 2128, Bio-Rad, München

Software: BioLogic HR v2.1

FPLC-Säulen

HighPrep Sephacryl S-100 HR, Pharmacia Biotech, Erlangen

Gefriertrocknung

ALPHA 1-4 LSC, Martin CHRIST Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode

Vakuumpumpe: RZ-2

Geldokumentation

Scanner: GS-800 Calibrated Densitometer, Bio-Rad, München

Software: Quantity One v4.5.2

L-012-Assay

Centro LB960 Plate Luminometer, Berthold Technologies, Bad Wildbach

Magnetrührer

RCT basic, IKA Labortechnik, Staufen

Photometer

Cary 300, Varian, Darmstadt

pH-Meter

766 Calimatic, Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin

Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Minigel-Kammer, von Keutz Laborgeräte, Reiskirchen

Reinstwasseranlage

Milli-Q Plus PF, Millipore, Eschborn

Sauerstoffverbrauchsmessung

NomaSense O₂ P300 (Nomacorc, Thimister, Belgien)

Spannungsquellen

Power Pac-3000, BioRad, München

Modell 200/2.0, BioRad, München

Taumelrollenmischer

RM5 – 30 V, neoLab, Heidelberg

Waagen

A200S, Sartorius GmbH, Göttingen

L200S, Sartorius GmbH, Göttingen

MJ 3000, YMC Co. Ltd., Kyoto, Japan

Zentrifugen

Cryofuge 5000, Heraeus-Christ, Hanau

Universal 16R, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen

Universal 32R, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen

Z233 MK-2, Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen

2.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden in p. a. Qualität bezogen. Die Herstellung von

wässrigen Lösungen erfolgte mit entionisiertem Reinstwasser.

Acrylamid / Bisacrylamid (37,5 : 1) (Roth, Karlsruhe)

APS (Merck, Darmstadt)

Ascorbinsäure (Sigma-Aldrich, Steinheim)

ABTS (AppliChem, Darmstadt)

BCIP (Roth, Karlsruhe)

BioRad Protein assay nach Bradford (BioRad, München)

Bromphenolblau (Roth, Karlsruhe)

CHAPS (Roth, Karlsruhe)

Coverfluid (Amersham Pharmacia Biotech, Schweden)

Coomassie Brilliant Blue G-250 (BioRad, München)

Coomassie R 250 (Serva, Heidelberg)

Dikaliumhydrogenphosphat (Roth, Karlsruhe)

2,3-dimethoxy-1,4-naphtaquinon (DMNQ) (Calbiochem, Darmstadt)

Dinatriumhydrogenphosphat (Merck, Darmstadt)

DMF (Sigma-Aldrich, Steinheim)

DMSO (Sigma-Aldrich, Steinheim)

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich, Steinheim)

L-012 (Wako Chemicals, Neuss)

L-Dopa (Sigma-Aldrich, Steinheim)

Dopamin (Sigma-Aldrich, Steinheim)

EDTA (Roth, Karlsruhe)

Essigsäure (Roth, Karlsruhe)

Ethanol (Roth, Karlsruhe)

Glycerin (Roth, Karlsruhe)

Glycin (Roth, Karlsruhe)

Hank's balanced salt Lösung (Gibco Life Technologies, Eggstein)

Harnstoff (Roth, Karlsruhe)

Iod (Roth, Karlsruhe)

Isobutanol (Roth, Karlsruhe)

Kaffeesäure (Serva, Heidelberg)

Kaliumchlorid (Roth, Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat (Roth, Karlsruhe)
Kaliumsulfat (Roth, Karlsruhe)
Kalziumcarbonat (Roth, Karlsruhe)
Kalziumchlorid (Roth, Karlsruhe)
Magermilchpulver (Saliter, Obergrünzburg)
Magnesiumchlorid (Roth, Karlsruhe)
Magnesiumsulfat (Sigma-Aldrich, Steinheim)
MBTH (Sigma-Aldrich, Steinheim)
 β -Mercaptoethanol (Roth, Karlsruhe)
Methanol (Roth, Karlsruhe)
Natriumacetat (Merck, Darmstadt)
Natriumazid (Roth, Karlsruhe)
Natriumcarbonat (Roth, Karlsruhe)
Natriumchlorid (Roth, Karlsruhe)
Natriumdihydrogenphosphat (Roth, Karlsruhe)
Natriumdithionit (Merck, Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat (SDS) (Roth, Karlsruhe)
Natriumglutamat (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Natriumhydroxid (Roth, Karlsruhe)
Natriumhydrogenphosphat (Roth, Karlsruhe)
Natriumthiosulfat (Sigma-Aldrich, Steinheim)
NBT (Roth, Karlsruhe) PEG 1000 (Merck, Darmstadt)
Phenol-Lösung (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) (Calbiochem, Darmstadt)
Phosphorsäure (Roth, Karlsruhe)
PMSF (Merck, Darmstadt)
Polyclar AT (Serva, Heidelberg)
Ponceau S (Roth, Karlsruhe)
Precision Plus Protein™ Standard Unstained (BioRad, München)
L-Prolin (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Protease Inhibitor Cocktail Set VI (Calbiochem, Darmstadt)
ProteoExtract Protein Precipitation Kit (Calbiochem, Darmstadt)
D(+)-Saccharose (Roth, Karlsruhe)

Salzsäure (Roth, Karlsruhe)
Silbernitrat (Roth, Karlsruhe)
Sulfosalicylsäure (Merck, Darmstadt)
TEMED (Roth, Karlsruhe)
Trichloressigsäure (Serva, Heidelberg)
Tris (Roth, Karlsruhe)
Tris-Maleat (Roth, Karlsruhe)
Triton X-100 (Roth, Karlsruhe)
Trypsin-Inhibitor (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Tween 20 (Roth, Karlsruhe)
Tyramin (Sigma-Aldrich, Steinheim)
L-Tyrosin (Merck, Darmstadt)
L-Tyrosin-Methylester (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Tyrosinase aus *Agaricus bisporus* (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Zitronensäure (Roth, Karlsruhe)

2.3 Proteinbiochemische Arbeiten

2.3.1 Puffer und Lösungen

Puffer für die Aufnahme von Proteinen aus zellulärer Matrix

(Proteinextraktionspuffer)

100 mM	Na-Phosphatpuffer (pH 7,0)
20 mM	EDTA
3 mM	NaN ₃
0,5 %	Tween-20
0.1 %	Protease Inhibitor Cocktail Set VI

Puffer für Phenolfällung

Saccharose Puffer

700 mM	Saccharose
500 mM	Tris
100 mM	KCl
50 mM	EDTA
2 mM	PMSF
2 % (v/v)	β-Mercaptoethanol

Methanol-Lösung

100 mM	Ammoniumacetat in Methanol
--------	-------------------------------

Trichloressigsäure(TCA)-Fällungslösung

12,5 % (w/v)	Trichloressigsäure
28 mM	β-Mercaptoethanol

Puffer und Lösungen für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Trenngelpuffer

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

Sammelgelpuffer

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

Denaturierungspuffer

25 % (v/v)	Sammelgelpuffer
20 % (v/v)	Glycerin
10 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
5 % (v/v)	H ₂ O
4 % (w/v)	SDS
	+ Spatelspitze Bromphenolblau

Probenpuffer (native PAGE)

50 % (v/v)	Glycerin
	+ Spatelspitze Bromphenolblau

Laufpuffer SDS-PAGE

200 mM	Tris
150 mM	Glycin
0,08 % (w/v)	SDS

Laufpuffer native PAGE

100 mM	Tris
750 mM	Glycin

Lösungen für die Coomassie-Färbung

Färbelösung

50 % (v/v)	Methanol
10 % (v/v)	Essigsäure
0,5 % (w/v)	Coomassie R 250

Entfärbelösung

40 % (v/v)	Methanol
10 % (v/v)	Essigsäure

Lösungen für Silberfärbung

50 % Methanol-Lösung

50 % (v/v)	Methanol
10 % (v/v)	Essigsäure

5 % Methanol-Lösung

5 % (v/v) Methanol

7 % (v/v) Essigsäure

Enhancer-Lösung

0,02 % (w/v) Natriumthiosulfat

Färbe-Lösung

0,2 % (W/v) Silbernitrat

0,075 % (v/v) Formaldehyd

Entwickler-Lösung

6 % (w/v) Natriumcarbonat

0,004 % (w/v) Natriumthiosulfat

0,05 % (v/v) Formaldehyd

Stopp-Lösung

2 M Zitronensäure

Puffer und Lösungen für Westernblots

Tris-Glycin-Puffer (pH 8,3)

192 mM Glycin

25 mM Tris

10 % (v/v) Methanol

Transferpuffer

39 mM	Glycin
48 mM	Tris
0,037 % (w/v)	SDS
20 % (v/v)	Methanol

Ponceau S-Lösung

3 % (w/v)	Trichloressigsäure
3 % (w/v)	Sulfosalicylsäure
0,2 % (w/v)	Ponceau S

TBS (Tris buffered saline) (pH 7,4)

100 mM	Tris
1,4 M	NaCl

TBST (Tris buffered saline + Tween)

10 % (v/v)	TBS
0,3 % (v/v)	Tween 20

Blocklösung

10 % (w/v)	Magermilchpulver in TBST
------------	--------------------------

Entwicklungspuffer (pH9,5)

100 mM	Tris
1 M	NaCl
50 mM	MgCl ₂

BCIP-Lösung

50 mg/ml BCIP in DMF

NBT-Lösung

50 mg/ml NBT in 70 % (v/v) DMF

Entwicklungslösung

1 ml Entwicklungspuffer

9 ml H₂O

33 µl BCIP-Lösung

66 µl NBT-Lösung

Puffer für Aufreinigung der Riesling-Tyrosinase

Laufpuffer für SEC

100 mM Phosphatpuffer (pH 8,0)

Tyrosinaseextraktionspuffer (pH 6,5)

200 mM Phosphatpuffer

10 mM Ascorbinsäure

1 mM EDTA

500 mM NaCl

1 % (v/v) Triton X-100

Färbelösung für Dot Blot

100 mM Natriumcitratpuffer

14 mM MBTH

10 mM Dopamin

Puffer für 2D-Gelelektrophorese

Rehydrationspuffer

8 M	Harnstoff
2 % (w/v)	CHAPS

SDS-Äquibrierungspuffer (pH 6,8)

50 mM	Tris
6 M	Harnstoff
2 % (w/v)	SDS
30 % (v/v)	Glycerin

Agaroselösung

200 ml	Laufpuffer SDS-PAGE
0,5 % (w/v)	Agarose
	+ Spatelspitze Bromphenolblau

Weitere Puffer

Harnstoffpuffer

8 M	Harnstoff
2 M	Thioharnstoff
2 % (w/v)	CHAPS

Tartrat-Puffer (pH 3,5)

33 mM Weinsäure

37 mM Malat

2.3.2 Gewinnung des Probenmaterials

Rieslingtrauben (*Vitis vinifera* Cultivar „Riesling“) wurden von Weinreben in Mainz-Hechtsheim (Kirchenstück) akquiriert. Dornfeldertrauben (*Vitis vinifera* Cultivar „Dornfelder“) stammen von Reben aus Harxheim: Beide Traubensorten wurden vom Weingut Fleischer (Weingut der Stadt Mainz) für Analysen zur Verfügung gestellt. Zehn aufeinander folgende Reifestadien von Rieslingtrauben wurden vom 6. Juli 2012 bis zum 25. Oktober 2012 in einem Abstand von zwei Wochen gesammelt, die letzten beiden Proben nur noch in einem Abstand von einer Woche (siehe Tabelle 2). Dornfeldertrauben wurden ebenfalls ab dem 6. Juli 2012 in zweiwöchigem Abstand akquiriert. Ab dem 28.09.2012 wurden die letzten beiden Proben in einem Abstand von einer Woche gesammelt, was zu einer Anzahl von neun Reifestadien für Dornfeldertrauben führt (siehe Tabelle 3). Die Beeren wurden nach Entnahme gewaschen, bei -20°C über Nacht eingefroren und bei -80°C gelagert.

Tabelle 2: Probenakquise Rieslingtrauben

Probennummer	Entnahmedatum
1	06.07.2012
2	20.07.2012
3	03.08.2012
4	17.08.2012
5	31.08.2012
6	14.09.2012
7	28.09.2012
8	11.10.2012
9	19.10.2012
10	25.10.2012

Tabelle 3: Probenakquise Dornfeldertrauben

Probennummer	Entnahmedatum
1	06.07.2012
2	20.07.2012
3	03.08.2012
4	17.08.2012
5	31.08.2012
6	14.09.2012
7	28.09.2012
8	11.10.2012

2.3.3 Proteinfällungsmethoden

Zur Analyse von Traubenproteinen mussten diese zunächst isoliert und aufkonzentriert werden. Hierfür wurden je Reifestadium 15 g Traubenbeeren in einem Porzellanmörser unter flüssigem Stickstoff zu einem feinkörnigen Pulver zerkleinert. Das Pulver wurde mit 15 ml Proteinextraktionspuffer aufgenommen und auf einem Taumelrollenmischer bei 4°C für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden unlösliche Bestandteile durch 30 minütige Zentrifugation mit 5000 rpm bei 4 °C abgetrennt. Der hohe Gehalt an phenolischen Inhaltsstoffen roter Trauben stellt ein Hindernis für Proteinanalysen dar. So bilden phenolische Verbindungen irreversibel Komplexe mit Proteinen aus oder werden von Oxydasen (Tyrosinasen, PPOs oder Peroxidasen) oxidiert, was in einer Schmierbildung auf Elektrophoresegelelen resultiert [120]. Daher wurde die Proteinstamm- lösung im Falle von roten Trauben mit 5 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon (PVP) versetzt. Das in wässriger Lösung unlösliche PVP bildet Wasserstoffbrücken mit phenolischen Substanzen aus, wodurch diese gebunden und entfernt werden können.[121, 122] Nach Inkubation bei 4°C für 30 Minuten wurde die Lösung für 20 Minuten bei 500 rpm und 4 °C zentrifugiert und das Pellet, welches PVP mit assoziierten Phenolen enthielt, verworfen. Die resultierende Proteinstamm- lösung wurde für alle Proteinfällungsmethoden genutzt

2.3.3.1 Acetonfällung

Die Acetonfällung wurde mit Modifikationen von Eckert et al. adaptiert [123]. Für 1D-SDS-PAGE wurden 200 µl der Proteinstamm- lösung zum Ausfällen der Proteine mit 200 µl Aceton versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Präzipitat wurde dreimal mit Aceton gewaschen und anschließend in 50 µl Harnstoffpuffer solubilisiert. Für die 2D-SDS-PAGE wurden die jeweils zehnfachen Volumina verwendet und resultierende Proteinpellets direkt in 200 µl Rehydratisierungs- puffer gelöst.

2.3.3.2 Phenolfällung

Die Phenolfällung wurde mit Modifikationen von Vincent et al. adaptiert [124]. Für 1D-SDS-PAGE wurde zu 400 µl Proteinstammlösung 400 µl Saccharosepuffer und anschließend 400 µl Phenol-Lösung gegeben. Der Ansatz wurde für 30 Minuten bei -20°C inkubiert, wobei die Emulsion alle 10 Minuten durchmischt wurde. Anschließend wurde die Emulsion auf Raumtemperatur erwärmt und zentrifugiert. Die obere phenolische Phase wurde im Anschluss zweimal mit Saccharosepuffer gewaschen. Danach wurden 200 µl der phenolischen Phase entnommen und mit 1 ml Methanol-Lösung bei -20°C über Nacht inkubiert, um Proteine auszufällen. Nach Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das Präzipitat zweimal mit Methanol, einmal mit Aceton gewaschen und anschließend in 50 µl Harnstoffpuffer solubilisiert. Für die 2D-SDS-PAGE wurden die jeweils zehnfachen Volumina verwendet und resultierende Proteinpellets direkt in 200 µl Rehydratisierungspuffer gelöst.

2.3.3.3 Proteinfällung mit „ProteoExtract Protein Precipitation Kit“ von Calbiochem (Calbiochem-Fällung)

Die Proteinfällung mit dem ProteoExtract Kit wurde nach Anweisungen im Handbuch durchgeführt. Für 1D-SDS-PAGE wurden 200 µl der Proteinstammlösung zu 800 µl Percipitation Agent gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei -20°C wurde die Probe zentrifugiert, der Überstand abgetrennt und das Präzipitat zweimal mit 500 µl Waschlösung gewaschen. Das Präzipitat wurde an der Luft getrocknet und anschließend in 50 µl Harnstoffpuffer solubilisiert. Für die 2D-SDS-PAGE wurden die jeweils zehnfachen Volumina verwendet und resultierende Proteinpellets direkt in 200 µl Rehydratisierungspuffer gelöst.

2.3.3.4 Trichloressigsäurefällung (TCA-Fällung)

Die TCA Fällung wurde mit Modifikationen von Damerval et al. adaptiert [125]. Für 1D-SDS-PAGE wurden zu 150 µl Proteinstammlösung 1,5 ml der TCA-Fällungslösung gegeben. Es erfolgte eine Inkubation über Nacht bei -20°C. Die Lösung wurde anschließend zentrifugiert und das Proteinpellet mit Aceton ge-

waschen und in 50 µl Harnstoffpuffer resolubilisiert. Für die 2D-SDS-PAGE wurden die jeweils zehnfachen Volumina verwendet und resultierende Proteinpellets direkt in 200 µl Rehydratisierungspuffer gelöst.

2.3.3.5 Fällung nach Martinez

Für die Fällung von Proteinen aus Dornfeldertrauben in den Grünstadien wurde ein Protokoll von Martinez angewandt [5]. Hierbei wurden Proteine nicht wie bei den vorher beschriebenen Fällungsmethoden aus der Proteinstammlösung gewonnen. Stattdessen wurde 3 g Traubenbeeren in einem Porzelmörser unter flüssigem Stickstoff zu einem feinkörnigen Pulver zerkleinert und das gefrorenen Traubenpulver direkt mit 6 ml einer Mischung aus Ethylacetat und Ethanol (1:2, v/v) gewaschen und 30 min lang bei -20°C unter regelmäßigem Durchmischen inkubiert. Anschließend wurde die Probe 20 min lang bei 4°C und 2800 g zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde zweimal mit 80% Aceton gewaschen und anschließend in einen vorgekühlten Mörser überführt, in dem es bei 4°C getrocknet wurde. Anschließend wurde das Pellet unter Zugabe von Seesand im Verhältnis 1:3 erneut zermahlen. Daraufhin wurde das Pellet fünf Mal in 10% Zitronensäure in Aceton gewaschen und zentrifugiert. In Folge wurde das Pellet erneut fünf Mal wässriger 10%-igen Zitronensäure und dreimal in gekühltem 80% Aceton gewaschen und bei 4°C getrocknet.

2.3.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) ist eine Technik mit der Proteine gemäß ihrer Nettoladung und ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden. Das Trennmedium für die Gelelektrophorese von Proteinen ist ein Polyacrylamidgel. Treibende Kraft ist ein elektrisches Feld, welches Proteine mit negativer Nettoladung durch die poröse Gelmatrix zur Anode wandern lässt. Durch Zugabe des anionischen Detergenz SDS (*sodium dodecyl sulfate*) bilden sich negativgeladene SDS-Protein-Komplexe mit konstantem Ladungs- zu Masse-Verhältnis aus. Weiterhin wird durch die Bindung von SDS eine Protein-Protein-Wechselwirkung unterbunden. Dies führt dazu, dass die SDS-Protein-Komplexe gemäß ihres Stokes-Radius und somit nach ihrer molekularen Masse im Gel aufgetrennt werden. Die native PAGE nicht-denaturierter Proteine beruht jedoch

hauptsächlich auf der Auftrennung nach der Eigenladung der Proteine.

2.3.5 SDS-PAGE

Die Durchführung der SDS-PAGE erfolgte nach See und Jackowski [126], die eine modifizierte Form des diskontinuierlichen Puffersystems von Laemmli [127] darstellt. Die Proteinproben wurden vor der Elektrophorese für 10 min bei 95° C in SDS-haltigem Denaturierungspuffer inkubiert. Zur reduktiven Spaltung von Disulfidbrücken enthielt der Denaturierungspuffer 10 % (v/v) β -Mercaptoethanol. Die Durchführung der Elektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur. Die Spannung betrug 80 V solange die Proben sich im Sammelgel befanden. Nach Übergang zum Trenngel wurde die Spannung auf 110 V erhöht. Mit Hilfe eines Molekulargewichtsmarkers, bestehend aus 10 Standard Proteinen mit Massen zwischen 10 und 250 kD, lassen sich im SDS-Gel die Molekulargewichte der Proteinbanden abschätzen

Zusammensetzung für jeweils zwei Trenngele

	7,5 %	10 %	12,5%
Acrylamid / Bisacrylamid	3,5 ml	4,67 ml	5,83 ml
Trenngelpuffer	3,5 ml	3,5 ml	3,5 ml
Wasser	6,51 ml	5,34 ml	4,18 ml
SDS-Lösung 10% (w/v)	280 μ l	280 μ l	280 μ l
TEMED	28 μ l	28 μ l	28 μ l
APS, 2 % (w/v)	420 μ l	420 μ l	420 μ l

Zusammensetzung für jeweils zwei Sammelgele (3%)

Acrylamid / Bisacrylamid	1 ml
Sammelgelpuffer	2,5 ml
Wasser	6,05 ml
SDS-Lösung 10% (w/v)	200 μ l
TEMED	40 ml
APS, 2 % (w/v)	400 μ l

2.3.6 Native PAGE

Bei einer nativen PAGE behalten Proteine, im Gegensatz zur SDS-PAGE, ihre Funktionalität. Hierfür muss auf eine Denaturierung durch Hitze und Zugabe von reduzierenden Agezien, sowie SDS verzichtet werden.

Zusammensetzung für jeweils zwei Trenngele

	7,5 %	10 %	12,5%
Acrylamid / Bisacrylamid	3,5 ml	4,67 ml	5,83 ml
Trenngelpuffer	3,5 ml	3,5 ml	3,5 ml
Wasser	6,79 ml	5,62 ml	4,46 ml
TEMED	28 µl	28 µl	28 µl
APS, 2 % (w/v)	420 µl	420 µl	420 µl

Zusammensetzung für jeweils zwei Sammelgele (3%)

Acrylamid / Bisacrylamid	1 ml
Sammelgelpuffer	2,5 ml
Wasser	6,25 ml
TEMED	40 ml
APS, 2 % (w/v)	400 µl

2.3.7 Zweidimensionale SDS-PAGE (2D-SDS)

Bei der zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-Gelelektrophorese) werden Proteine in zwei Dimensionen aufgetrennt. Auf diese Weise können komplexe Proteingemische durch die Kombination der beiden orthogonal zueinander ausgeführten Trenntechniken besonders hochauflösend analysiert werden. Zuerst wird eine isoelektrische Fokussierung durchgeführt. Hierfür wurden Applikationsstreifen (IPG-Strip) mit einem pH Gradienten von 3-10 eingesetzt. Für die 2D-Gelelektrophorese wurden gefällte Proteine mit Rehydratationspuffer und nicht mit Harnstoffpuffer aufgenommen. Für große Probenvolumina (max. 200 µl) wurden IPG-Strips mit einer Länge von 11 cm, für kleinere Volumina (max. 130 µl) welche mit 7cm Länge eingesetzt. Die Probe wurde in ein Keramikschiffchen gegeben und mit dem IPG-Strip bedeckt. Um Verdunstung der Probe zu vermeiden, wurde der Ansatz mit Cover Fluid überschichtet. Anschließend

wurde die Probe in die IEF-Gelelektrophoreseapparatur IPGphor eingespannt. Es folgte eine zehnstündige Rehydratisierung des IPG-Strips. Danach wurde die eigentliche Fokussierung nach folgendem Schema durchgeführt:

7 cm IPG-Strip	11 cm IGP-Strip
1h 100 V	1h 500 V
1h 500 V	1h 1000 V
4h 4000 v	4h 8000 V

Im Anschluss an die isoelektrische Fokussierung folgte die Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension nach ihrer molekularen Masse mit Hilfe einer SDS-PAGE (vgl. 2.3.5). Hierfür wurde der IPG-Streifen oberhalb eines SDS-Gel fixiert. Dies wurde mit Hilfe einer zum Sieden erwärmten flüssigen Agaroselösung erreicht, mit welcher der IPG-Streifen überschichtet wurde und die beim Abkühlen aushärtete. Die verwendeten SDS-Gele für 11 cm IPG-Strips hatten stets eine Prozentigkeit von 15% und wurden wie folgt zusammengesetzt:

Acrylamid / Bisacrylamid	20 ml
Trenngelpuffer	10 ml
Wasser	9,3 ml
SDS-Lösung 10% (w/v)	0,4 ml
TEMED	15 µl
APS, 10 % (w/v)	300 µl

Die Elektrophorese wurde bei 350 V und 45mA pro Gel unter Kühlung durchgeführt.

Die SDS-Gele, welche für IPG-Strips der Größe 7cm genutzt wurden entsprechen in ihrer Zusammensetzung den Trenngelen der unter 2.3.5 aufgeführten SDS-PAGE. Die Elektrophorese selbst entsprach ebenfalls der Angaben unter 2.3.5.

2.3.8 Coomassie-Färbung

Im Anschluss an Gelelektrophoresen wurden Proteine mit Coomassie Brilliant Blue G250 visualisiert. Die Nachweisgrenze der kolloidale Coomassie-Färbung nach Kang liegt bei ca. 10 ng Protein pro Bande [128]. Hierfür werden die Gele nach der Elektrophorese zunächst mit Wasser gewaschen, um SDS zu entfernen, welches die Färbung der Proteinbanden inhibieren würde. Danach werden die Gele über Nacht in der Coomassie Farbelösung inkubiert. Coomassie bindet hierbei hauptsächlich an die basischen Seitenketten der Proteine, wodurch sich die Proteinbanden im Gel blau färben.

2.3.9 Silberfärbung

Die Silberfärbung ist mit einer Nachweisgrenze von 0,1 bis 1 ng Protein pro Bande sensitiver als die Coomassie-Färbung. Die Durchführung erfolgte nach Blum, Beier und Gross [129]. Hierbei bilden Ag⁺-Ionen Komplexe mit Aspartat-, Cystein- und Glutamat-Resten. Anschließende Reduktion des Silberkations zu elementarem Silber macht die Proteinbanden im Gel sichtbar. Die Methode eignet sich nicht zur Quantifizierung von Proteinen, da verschiedene Proteine mit unterschiedlicher Intensität angefärbt werden, und weiterhin auch Nukleinsäuren, Kohlenhydrate und Lipide sensitiv für diese Färbemethode sind.

Die Färbung erfolgte nach folgendem Schema:

60 min / über Nacht	50 % Methanol-Lösung
20 min	5 % Methanol-Lösung
20 min	H ₂ O
1 min	Enhancer-Lösung
3 x 20 s	H ₂ O
20 min	Färbe-Lösung
3 x 20 s	H ₂ O
Bis Banden visuell detektiert werden können	Entwickler-Lösung
Einige Sekunden	Stopp-Lösung

2.3.10 Aufreinigung von Tyrosinase aus Rieslingtrauben

Zur Extraktion von Tyrosinase aus der Traube wurden Rieslingtrauben des 3. Reifestadiums des Jahres 2012 gewählt.

2.3.10.1 Gewinnung des Probenmaterials

8 g Traubenbeeren wurden in einem Porzelmörser unter flüssigem Stickstoff zu einem feinkörnigen Pulver zerkleinert. Das Pulver wurde mit 8 ml Tyrosinaseextraktionspuffer aufgenommen und zusammen mit 2 % PVP (w/v) auf einem Taumelrollenmischer bei 4°C für 30 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurden die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation abgetrennt und der Überstand mit einem Spritzenfilter (Porengröße 0,22 µm) filtriert. Die resultierende Lösung wurde einer Größenausschluss-Chromatographie unterzogen.

2.3.10.2 Größenausschluss-Chromatographie (SEC)

Die Aufreinigung der Tyrosinase aus Rieslingtrauben wurde mit Hilfe einer Größenausschluss-Chromatographie an einer FPLC-Anlage bei 4° C durchgeführt. Verwendet wurde eine Sephacryl S-200 HighPrep 16/60 Säule mit einem Säulenvolumen von 120 ml und einem Trennbereich von 5-250 kD. Um Schäden an der Säule zu vermeiden, wurde der verwendete Laufpuffer vor Gebrauch durch Filtration von Schwebstoffen befreit und entgast. 4-5 ml Probe wurden auf die Säule aufgetragen und bei einer Flussrate von 0,8 ml/min aufgetrennt. Die Elution wurde mit einem Durchflussphotometer mit einer optischen Weglänge von 5 mm bei einer Wellenlänge von 280 nm verfolgt und in Fraktionen von je 3 ml gesammelt. Anschließend wurden die einzelnen Fraktionen mit einem Dot Blot auf Tyrosinaseaktivität überprüft.

2.3.10.3 Dot Blot

Zur Überprüfung auf Tyrosinaseaktivität wurden jeweils 2,5 µl Färbelösung zu 2,5 µl der zu untersuchenden Fraktion auf eine PVDF-Membran gegeben. Als Positivkontrolle diente eine Lösung aus Tyrosinase von *Agaricus bisporus* mit einer Konzentration von 1 mg/ml. Ansätze mit aktiver Tyrosinase färbten sich nach 5-10 min rot-bräunlich.

2.3.10.4 Konzentration von Tyrosinase

Tyrosinase im nativen Zustand wurden mit Zentrifugalfiltern Ultracel (3K, Fa. Millipore, Eschborn) bei 5000 g in der Kühlzentrifuge konzentriert. Die Filtermembran der Zentrifugalfilter konzentriert nur Proteine mit einem Molekulargewicht größer als 3 kD. Flüssigkeiten und kleinere Peptide passieren die Membran ungehindert.

2.3.11 Bradford-Test

Beim Bradford-Test handelt es sich um eine photometrische Methode zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösung [130, 131]. Hierbei erfolgt eine Bindung von Coomassie Brilliant Blue G-250 an basische und hydrophobe Proteine in saurer Lösung. Durch die Bindung verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm nach 595 nm [132]. In einem Bereich von 0,2 – 0,9 mg/ml Proteinkonzentration ist diese proportional zur Absorption bei 595 nm. Mit Hilfe einer Proteinstandardlösung in verschiedenen Konzentration wird eine Eichgerade erstellt. In dieser Arbeit diente Trypsin als Standardprotein, da es eine ähnliche Zusammensetzung an basischen Aminosäuren im Vergleich zu Weinproteinen aufweist. Die Messlösungen enthalten jeweils 100 µl der zu bestimmenden Probe und 900 µl des 1:4 verdünnten Bradford Reagenzes. Im Anschluss an eine zehninminütige Inkubation bei Raumtemperatur wird die Absorption bei 595 nm bestimmt und im Bezug zur Eichgerade ausgewertet.

2.3.12 Konzentrationsbestimmung durch Absorptionsmessung bei 280 nm

Zur Überprüfung der Konzentration von Tyrosinase aus *Agaricus bisporus* wurde eine Absorptionsmessung bei 280 nm durchgeführt. Verwendet wurde ein molarer Extinktionskoeffizient von $1,799 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ der mit Hilfe der Aminosäuresequenz und dem ProtParam tool von ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>) ermittelt wurde. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte nach Lambert-Beer.

2.3.13 Western Blot (WB)

Der Western Blot dient der spezifischen Detektion von Proteinen mit Hilfe von Antikörpern. Dazu wurde im Anschluss an eine Elektrophorese das Gel für 30 Minuten in Transferpuffer inkubiert. Die PVDF-Membran, auf welche die Proteine später übertragen wurden, wurde ebenfalls für 30 min in Transferpuffer gelagert. Bei der sogenannten Semi Dry Blot-Methode [133] wird ein „Sandwich“ aus in Transferpuffer getränkten Filterpapieren, Gel und PVDF-Membran wurde in die Blotapparatur eingespannt. Durch das Anlegen von Spannung wandern die Proteine Richtung Anode zur Membran. Zum Test auf eine erfolgreiche Übertragung der Proteine auf die Membran wurde eine Ponceau S Färbung durchgeführt. Unspezifische Proteinbindungsstellen wurden durch Inkubation in Blocklösung bei 4 °C für 1 - 2 h geblockt. Anschließend wurde die Membran bei 4° C für mindestens 2 h mit Primär-Antikörper inkubiert, der spezifisch an das zu untersuchende Protein bindet. Nachdem ungebundene Primärantikörper durch Waschen entfernt wurden, wurde die Membran für 1-2 Stunden mit dem Sekundär-Antikörper inkubiert. Dieser bindet spezifisch an den primären Antikörper. Der Sekundärantikörper verfügt über eine Kopplung mit alkalischer Phosphatase, die zur Detektion genutzt wird. Die Phosphatase dephosphoryliert farbloses BCIP, welches in einer anschließenden Reaktion mit NBT reagiert. Die Produkte sind beide stark bläulich gefärbt und auf der Membran mit bloßem Auge nachweisbar.

Der Western Blot erfolgte nach folgendem Schema:

	PAGE
30 min	Transferpuffer
2-4 h, RT	Semi Dry Blotten
1 min, RT	Ponceau S-Lösung
1 min, RT	TBST
1-2 h, 4°C	Blocklösung
Mind. 2 h, 4°C	Inkubation mit Primärantikörper (0,2 µg/ml in Blocklösung)
3x 10 min, 4°C	TBST
Mind. 2h, 4°C	Inkubation mit Sekundärantikörper in Blocklösung
3x 10 min, 4°C	TBST
Bis Banden/Spots visuell detektiert werden können	Entwicklungslösung

2.3.14 Dünnschichtchromatographie (DC)

Bei der DC handelt es sich um eine chromatographische Trennmethode. Als stationäre Phase dienten Kieselgelplatten mit einer Schichtdicke von 0,2 mm. Es wurden jeweils 10 µl der Probe in 1 µl Schritten appliziert. Als mobile Phase diente ein Laufmittel aus Hexan, Essigsäureester und Essigsäure im Verhältnis 1:1:0,05. Zur Visualisierung wurde elementares Iod verwendet.

2.3.15 Dialyse

Um Salze, Zucker, Farbstoffe und Alkohol aus Most- und Weinproben zu entfernen wurden diese in semipermeablen Celluloseschläuchen mit einer molekularen Ausschlussgröße von 3,5 kD unter stetigem Rühren bei 4°C gegen Wasser dialysiert. Das Dialysewasser wurde hierbei täglich zweimal gewechselt. Weißweine bzw. Moste aus weißen Trauben wurden ca. 3 Tage, Rotweine und Moste aus roten Trauben 7 Tage dialysiert.

2.3.16 Lyophilisation

Die Lyophilisation dient dem Entzug von Wasser aus zuvor dialysierten Most- bzw. Weinproben. Hierfür wird die Probe in einem Gefrierbad bei -25 °C eingefroren und anschließend an die Gefriertrocknungsanlage unter Vakuum (Druck: $0,94\text{ mbar}$, $T = -56\text{ °C}$) für etwa 24 Stunden angeschlossen. Mit dieser Methode werden Proteine schonend aufkonzentriert. Das entstehende Lyophilisat wird für weitere Proteinanalysen eingesetzt.

2.3.17 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrischen Analysen zur Proteinidentifizierung wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Schild/Tenzer des Institutes für Immunologie an der Universitätsmedizin Mainz durch Dr. Stefan Tenzer durchgeführt.

Die folgende kurze Beschreibung wurde von der Dissertationsschrift von Nadine Jäckels übernommen [134]:

Bei der Elektronenspray Ionisations Massenspektrometrie (Waters Q-TOF Premier API system) müssen die Proteine zuerst tryptisch in Gel oder in Lösung verdaut werden. Vor der eigentlichen massenspektrometrischen Untersuchung werden die Proben mit einer an die kapillare HPLC (Waters NanoAcquity UPLC system) gekoppelten $75\text{ }\mu\text{m} \times 150\text{ mm}$ BEH C18 Umkehrphasensäule vorgereinigt.

Die ermittelten Daten werden mit Hilfe des PROTEINLYNX GLOBAL SERVER, Ver. 2.3. (Waters) und einer dafür erstellten Datenbank, die alle bekannten Proteinsequenzen aus *Vitis*, *Saccharomyces cerevisiae* und möglichen Kontaminationen (Trypsin, humanes Keratin) enthält, abgeglichen und zusammengestellt.

2.3.18 Proteom-Annotierung

Die Annotierung von Proteinen, die durch die Massenspektrometrie erfasst wurden erfolgte mit der Software Blast2GO von BioBam, Valencia. Die Durchführung wurde von Martinez et al. (2013) mit folgenden Änderungen adaptiert: Der *BLAST e-value cut-off* betrug 1×10^{-5} , der Wert für *Annotation GO weight* lag bei 50.

2.4 Spektroskopie

2.4.1 Absorptions-Spektroskopie

UV/Vis-Absorptionsspektren wurden an Zweistrahl Absorptionsspektralphotometern aufgenommen. Für die Messungen wurden Rotilabo-Einmal-Küvetten (Roth, Karlsruhe) mit einer optischen Weglänge von 10 mm verwendet. Die Messungen erfolgten, falls nicht anders angegeben bei 20°C.

2.4.2 Bestimmung der Tyrosinase-Aktivität

2.4.2.1 MBTH-Assay

Zur Bestimmung der Aktivität der Tyrosinase wurden Produktspektren von 350 bis 700 nm aufgenommen. Der Messvorgang je Spektrum betrug 40 Sekunden. Als Hintergrund diente der jeweils gleiche Ansatz ohne Enzym. Um nachfolgende Reaktionen der *o*-Chinon-Produkte zu unterdrücken wurde MBTH dem Ansatz zugegeben. Dadurch kommt es zu einer Wechselwirkung zwischen Besthorns Hydrazon (MBTH) und den *o*-Chinonen, die während der Tyrosinase-Reaktion gebildet werden. Diese reagieren mit dem Reagenz stöchiometrisch unter Bildung eines stabilen, rötlichen Farbstoffkomplexes, dessen Absorptionsmaximum je nach Substrat zwischen 500 und 550 nm liegt. Sofern nicht anders angegeben wurden folgende Ansätze verwendet:

Für *o*-Diphenole:

2,1 mM	<i>o</i> -Diphenol
4,2 mM	MBTH
1,62 U/ml	Tyrosinase

Für Monophenole/ Phenole ohne benachbarte aromatische Hydroxylgruppen:

2,1 mM	Monophenol
4,2 mM	MBTH
8,1 U/ml	Tyrosinase

Für Weinvorstufen:

4,2 mM	Tyrosol
4,2 mM	MBTH
595 µl Probe	Lyophilisat: 3,5 mg/ml in Citratpuffer (0,1M, pH 5) gelöst

Die Versuche wurden in Citratpuffer (0,1 M; pH 5) durchgeführt. Die Aktivität wurde über zeitliche Änderung der Absorption bei der Wellenlänge des Absorptionsmaximums des jeweiligen Produkts im *steady state* bestimmt.

2.4.2.2 O₂-Verbrauchsmessung

Über die Messung des Sauerstoffgehalts eines luftdicht abgeschlossenen Systems lässt sich die von Tyrosinase katalysierte Oxidationen von Phenolen verfolgen. Verwendet wurde hierfür der NomaSense O₂ P300 Analyzer. Das Messprinzip beruht auf dynamischem Quenching von Lumineszenz durch molekularen Sauerstoff [135]. Vor der Messung wurden die Substrate in Ethanol (100% v/v) in einer Konzentration von 50 mmol/l gelöst. Die Messung wurde in Citratpuffer (0,1 M) bei pH 5 und Raumtemperatur durchgeführt. Die Konzentration der Substrate in der Messlösung betrug 5 mmol/l. Alle Messungen wurden mit Tyrosinase aus *Agaricus bisporus* mit einer Aktivität von 50,7 U/ml durchgeführt. Nur bei der Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs von Kaffee- und Kaffersäure wurden lediglich 5,07 U/ml Tyrosinase verwendet.

2.4.3 Produktkinetiken

2.4.4 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH) Test

Der in dieser Arbeit verwendete DPPH-Test basiert auf dem von Blois et al [136] entwickelten und von Brand-Williams et al. [137] modifiziertem DPPH Assay. Hierbei wird die Scavenger-Aktivität von Substanzen untersucht. Zu diesem Zweck wird die Reduktion von DPPH durch, im vorliegenden Fall, phenolischer Weininhaltsstoffe beobachtet. Durch die Reduktion von DPPH kommt es zu einem Farbumschlag bei 515 nm der photometrisch verfolgt wird.

Die zu untersuchenden Substanzen wurden 50 mM in Ethanol gelöst. Eine Ausnahme stellten Resveratrol und dessen Glykosid Polydatin dar, die in DMSO gelöst wurden. Im Folgenden sind die Ansätze der Probelösungen beschrieben

Probelösungen ohne Oxidation durch Tyrosinase:

5 mM	Substrat (aus 50 mM Stammlösung)
900 µl	Citratpuffer pH 5

Probelösungen, die von Tyrosinase aus *Agaricus bisporus* oxidiert wurden:

5 mM	Substrat (aus 50 mM Stammlösung)
50,7 U/ml	Tyrosinase aus <i>Agaricus bisporus</i> in Citratpuffer pH 5

Probelösungen, die von Tyrosinase aus Rieslingtrauben oxidiert wurden:

5 mM	Substrat (aus 50 mM Stammlösung)
19,4 U/ml	Tyrosinase aus Rieslingtrauben in Citratpuffer pH 5

Die Probelösungen wurden über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Es wurde eine 0,5 mM Stammlösung von DPPH in Methanol hergestellt und bei 4°C gelagert. Für jede Messung wurde die Stammlösung soweit verdünnt, dass eine Absorption von 0,62 - 0,66 bei 515 nm erreicht wurde, was einer ungefähren Konzentration von 150 µM im Messansatz entspricht. Die Messungen wurden in Mikrotiterplatten entsprechen der Arbeit von Fukumoto und Mazza [138] durchgeführt. 200 µl der verdünnten DPPH Lösung wurden mit 22 µl Probelösung in 96-well Mikrotiterplatten gegeben. Die Platte wurde bedeckt und bei 20°C alle 30 Sekunden bei 515 nm vermessen. Die Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung. Der Nullwert wurde über eine reine Methanollösung bestimmt. Die initiale Absorption wurde als 100% verfügbares DPPH gesetzt und die Abnahme der Absorption wurde entsprechend konvertiert.

2.5 Zellkultur

2.5.1 L-012-Assay

Dieser Versuch diente der Bestimmung der antioxidative Kapazität von phenolischen Weininhaltsstoffen. Zuerst wurde eine Probelösung nach folgendem Ansatz hergestellt.

Probelösungen ohne Oxidation durch Tyrosinase:

5 mM	Substrat (aus 50 mM Stammlösung)
900 µl	Citratpuffer pH 5

Probelösungen, die von Tyrosinase aus *Agaricus bisporus* oxidiert wurden:

5 mM	Substrat (aus 50 mM Stammlösung)
50,7 U/ml	Tyrosinase aus <i>Agaricus bisporus</i> in Citratpuffer pH 5

Probelösungen, die von Tyrosinase aus Rieslingtrauben oxidiert wurden:

5 mM	Substrat (aus 50 mM Stammlösung)
19,4 U/ml	Tyrosinase aus Rieslingtrauben in Citratpuffer pH 5

Die Probelösungen wurden über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die anschließenden Versuche wurden von der AG Li der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

Superoxide wurden mit Hilfe des Luminolanalogs 8-Amino-5-chloro-7-phenylpyridol[3,4-d]pyridazine-1,4-(2H,3H)dion (L-012) in der Zellkultur detektiert [139]. Menschliche EA.hy 926 Zellen [140] und menschliche monozytische THP1 Zellen [141] wurden für diesen Versuch verwendet. Die Probelösungen wurden mit DMSO verdünnt, in einer Messkonzentration von 5 µM den Zellen zugegeben und für 15 min bei 37°C in Hank's balanced salt Lösung inkubiert. Anschließend wurden EA.hy 926 Zellen mit DMNQ und THP1 Zellen mit PMA (je 100 µM) versetzt, um die Superoxidproduktion durch Aktivierung der jeweiligen Proteinkinase C zu stimulieren. Die Negativkontrolle enthielt keine phenolischen Bestandteile, DMNQ oder PMA, welche alle durch DMSO ersetzt wur-

den. Die durch Superoxid stimulierte Chemilumineszenz wurde nach 30 min „dark adaption“ gemessen. Angegeben sind die Werte nach 90 min.

3 Ergebnisse

Diese Arbeit beschäftigt sich im Wesentlichen mit zwei Themenschwerpunkten. Zum einen wurde das Proteom reifer Trauben als auch die Entwicklung des Proteoms während der Traubenreife untersucht. Zum anderen wurde Tyrosinase, eine traubeneigene PPO, isoliert und ihr Umsatz von verschiedenen phenolischen Weininhaltsstoffen untersucht. Ein besonderer Fokus galt hierbei dem Einfluss der Tyrosinase auf die antioxidative Kapazität dieser phenolischen Weininhaltsstoffe.

3.1 Fällung von Traubenproteinen

Um das Proteom der Traube untersuchen zu können, mussten die Proteine zuerst aus der Traube isoliert und von anderen Zellbestandteilen abgetrennt werden. Hierfür wurden verschiedene etablierte Protokolle zur Proteingewinnung, wie die Aceton-, Phenol-, Calbiochem- und TCA-Fällung, verglichen. Verwendet wurden reife Dornfeldertrauben des Weinguts Fleischer, die am 23.09.2011 in Harxheim, Rheinhessen, gesammelt wurden.

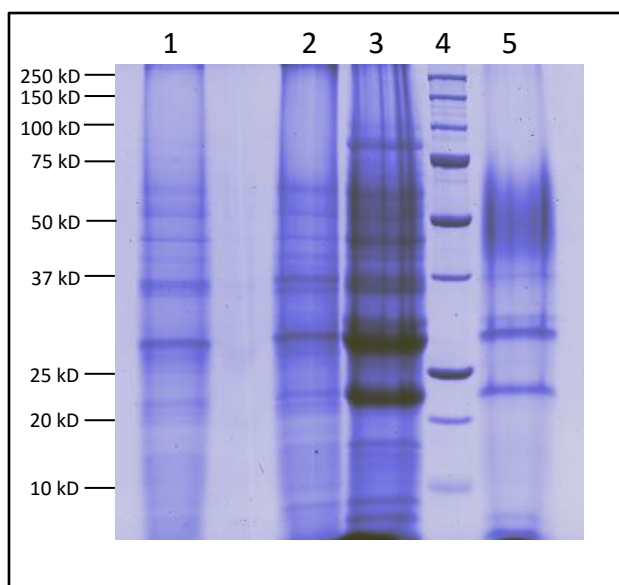


Abbildung 12: Vergleich verschiedener Proteinfällungsreaktionen

- 1: Aceton-Fällung
- 2: Calbiochem-Fällung
- 3: Phenol-Fällung
- 4: Marker (Precision Plus Protein Unstained Standard, BioRad)
- 5: TCA-Fällung

Auf diesem Gel wurden die angegebenen Fällungen nach vorangegangener PVP-Behandlung getestet. Verwendet wurden Dornfelder Trauben vom 23.09.2011 (12,5 % SDS-Gel; pH 8,8; Coomassie Färbung). Zu 10 µl Probe wurden jeweils 20 µl Denaturierungspuffer gegeben.

Nachdem die Trauben unter flüssigem Stickstoff zerkleinert, mit Traubenextraktionspuffer aufgenommen und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation abgetrennt wurden, konnte die resultierende Proteinstammlösung für Proteinfäl-

lungsreaktionen genutzt werden. Das Ausgangsvolumen der Proteinstammlösung lag hierfür bei Aceton- und Calbiochem-Fällung bei jeweils 200 µl, bei der TCA-Fällungsreaktion bei 150 µl. Für die Phenolfällung wurden nach Vorbehandlung der Proteinstammlösung ebenfalls aus 200 µl Probenvolumen Proteine gefällt.

Abbildung 12 zeigt den Vergleich der vier getesteten Fällungsreaktionen nach einer SDS-PAGE. Es sind Proteinbanden mit molekularer Masse von ca. 5 – 90 kD zu erkennen. Drei Banden lassen sich nach allen vier Fällungsreaktionen klar erkennen. Sie weisen eine molekulare Masse von ca. 37, 30 und 23 kD auf. Diese Banden lassen sich typischen Trauben- und Weinproteinen zuordnen. Banden bei ca. 23 kD können TLPs zugeschrieben werden [27], 30 kD entsprechen Chitinasen [21, 22] und die Banden bei 37 kD enthalten die aktive Form der Traubentyrosinase (vgl. 1.3.2). Die phenolgefällten Proteinbanden zeigen insgesamt die höchste Intensität. Damit weist die Phenolfällung die höchste Ausbeute der hier verglichenen Fällungsmethoden auf. Aceton- und Calbiochem-Fällung zeigen zueinander vergleichbare Intensitäten und Bandenmuster. Proteine im Massebereich von ca. 40-75 kD, die mit der TCA-Fällung isoliert wurden, trennen sich im Gel nicht in distinkte Banden auf. Die Proteinbanden der TLPs und Chitinasen weisen nach der TCA-Fällung jedoch eine höhere Intensität auf als die entsprechenden Banden der Aceton- und Calbiochem-Fällung, obwohl die Ausgangsmenge der Proteinstammlösung um ein Viertel geringer war. Allerdings sind Banden mit geringer Intensität, die zwischen den prominenten Banden der TLPs und Chitinasen nach Aceton- und Calbiochem-Fällung zu erkennen sind, nach der TCA-Fällung nicht auszumachen. Dies zeigt, dass sowohl die Gesamtproteinkonzentration als auch das Verhältnis der Proteine zueinander stark von der angewendeten Fällungsmethode abhängig sind.

3.2 Annotation isolierter und identifizierter Traubenproteine

Zur Identifizierung und Konzentrationsbestimmung des isolierten Proteoms aus Dornfeldertrauben vom 23.09.2011 wurden Proteinlösungen nach allen vier Fällungsreaktionen massenspektrometrisch untersucht. Auf eine Entfernung von

phenolischen Substanzen aus der Proteinstammlösung durch PVP wurde verzichtet, da diese auch einen Einfluss auf die Proteinzusammensetzung hat, wie Voruntersuchungen mittels Massenspektrometrie gezeigt haben. Die meisten Proteine ließen sich nach der Calbiochem-Fällung nachweisen. Mit dieser Methode wurden insgesamt 712 Proteine aus der Traube identifiziert (siehe Anhang, Tabelle 7). Ein Vergleich mit der Uniprot-Datenbank zeigte, dass lediglich 179 der identifizierten Proteine bisher direkt nachgewiesen wurden (siehe Abbildung 13). Für 113 Proteine lagen außer der Primärstruktur keine Informationen vor. 420 Proteine wurden anhand von Sequenzähnlichkeiten mit bereits bekannten Proteinen anderer Spezies benannt.

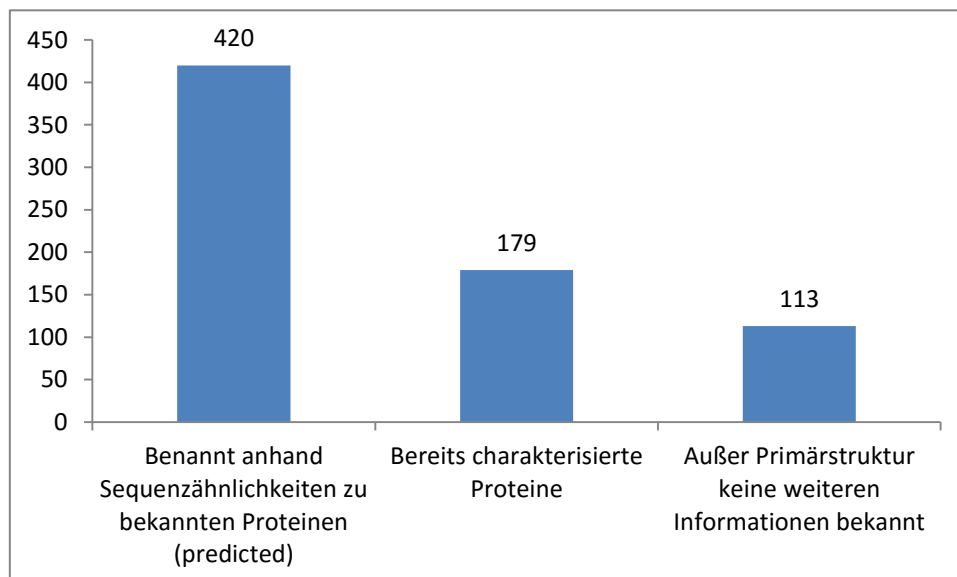


Abbildung 13: Zuordnung der identifizierten Traubenproteine nach Calbiochem-Fällung
Dargestellt ist die Zuordnung von Proteinen aus Dornfeldertrauben vom 23.09.2011 nach Isolierung durch die Calbiochem-Fällung und massenspektrometrischer Identifizierung. Als Referenz diente die Uniprot-Datenbank.

Abbildung 14 A zeigt die theoretische Verteilung der identifizierten Proteine nach Art eines 2D-Gels. Proteine sind horizontal nach ihrer Nettoladung und vertikal nach ihrer molekularen Masse aufgeteilt. Zum Tragen kamen hier die theoretischen Werte für Nettoladung und Masse. Im Vergleich zeigt Teil B der Abbildung 14 ein genuines 2D-Gel der gleichen Probe. Auch wenn mit Hilfe der Massenspektrometrie wesentlich mehr Proteine detektiert werden konnten als mit der entsprechenden 2D-SDS-PAGE, ist jedoch zu erkennen, dass auch hier die Mehrheit der Proteine im pH-Bereich von 4 bis 6,5 zu finden ist.

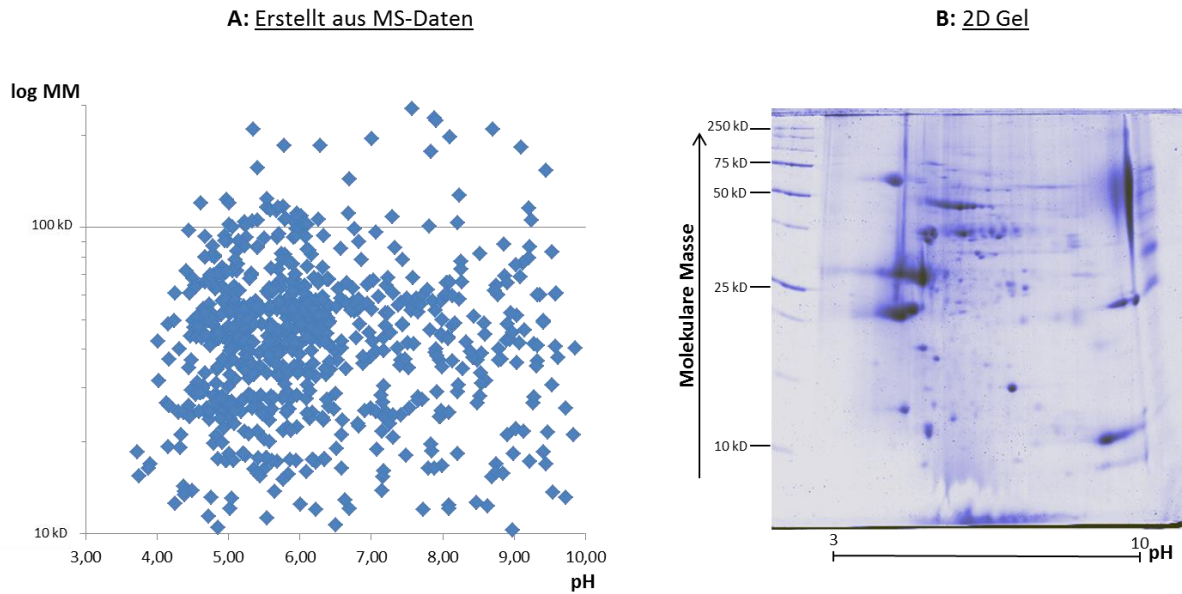


Abbildung 14: Vergleich von MS-identifizierten Dornfelderproteinen in 2D-Darstellung mit einem 2D-Gel von Dornfelderproteinen

A: Darstellung identifizierter Dornfelderproteine nach Calbiochem-Fällung und MS-Analyse aus Trauben vom 23.09.2011. Die Aufteilung erfolgte nach Art der 2D-PAGE. Verwendet wurden die theoretischen Werte für Nettoladung und molekularer Masse.

B: 2D-SDS-PAGE von reifen Dornfeldertrauben vom 23.09.2011 nach Phenolfällung (15 % SDS-Gel; pH 8,8; Coomassie Färbung). MM: Molekulare Masse

650 der 712 Proteine (91%) konnten mit der Software Blast2GO annotiert werden (siehe Abbildungen 15 und 16). Blast2GO lieferte hierbei eine Einteilung der Proteine nach Beteiligung an biologischen Prozessen als auch nach ihren zellulären Lokalisationen. Die meisten identifizierten Proteine sind in sogenannten *stress-response* Reaktionen (207 Proteine) und metabolische Prozesse involviert. Zu den metabolischen Prozessen gehören biosynthetische Prozesse (138 Proteine), Kohlenhydratstoffwechsel (120 Proteine), katabolische Prozesse (92 Proteine), Generierung von Metabolitvorstufen und Energie (51 Proteine), zellulärer Aminosäurenmetabolismus (39 Proteine), Lipidmetabolismus (22 Proteine) und Nukleinsäurenmetabolismus (20 Proteine). Weitere Prozesse, in welche identifizierte Proteine beteiligt sind, sind Transportprozesse (51 Proteine), Proteinfaltung (40 Proteine) und Signaltransduktion (28 Proteine).

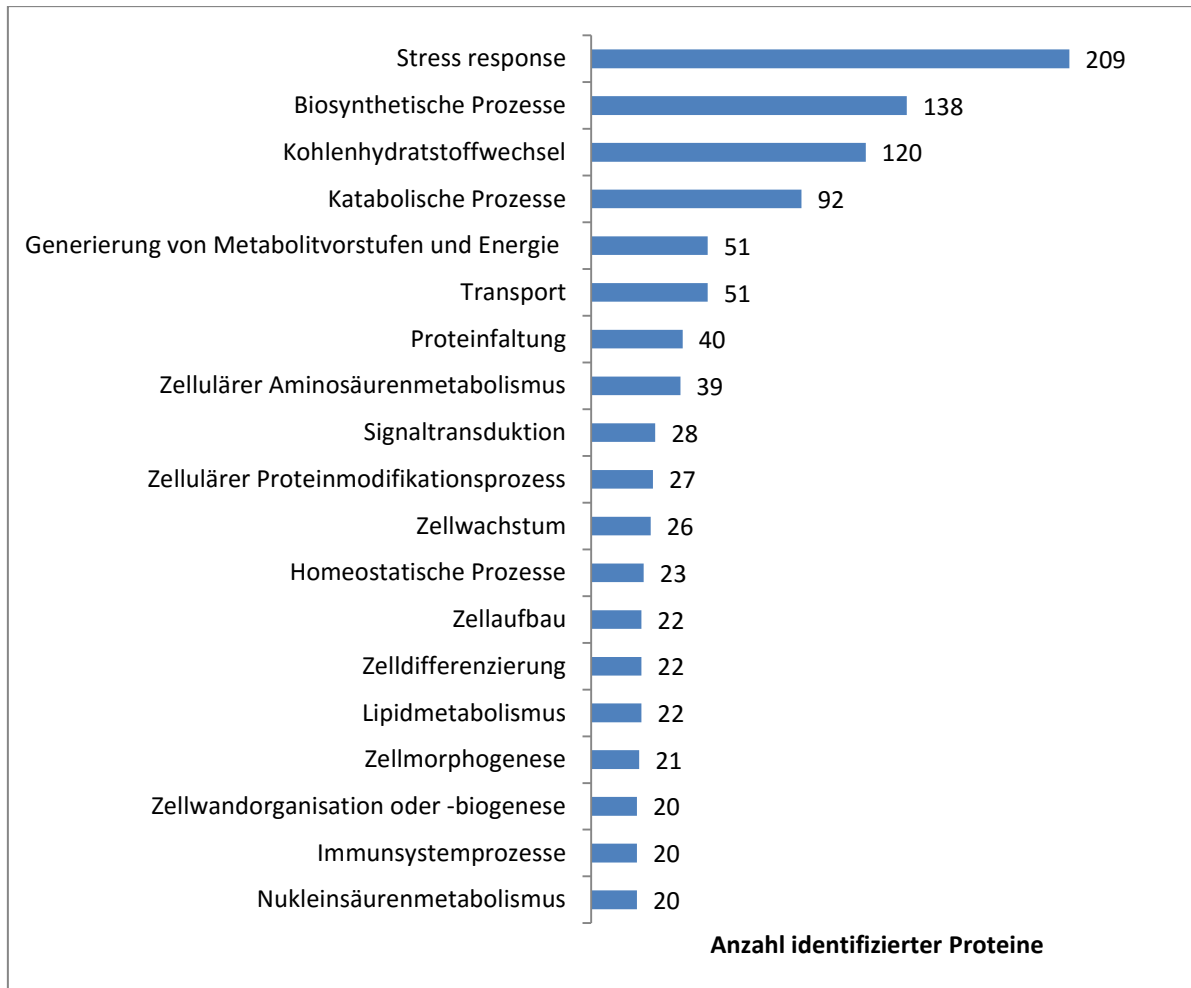


Abbildung 15: Einteilung von Proteinen aus Dornfeldertrauben nach biologischen Prozessen

Die Proteine wurden aus reifen Dornfeldertrauben vom 23.09.2011 mit der Calbiochem-Fällung isoliert und anschließend massenspektrometrisch untersucht. Die Einteilung erfolgte durch Blast2GO. Prozesse für die weniger als 20 beteiligte Proteine gefunden wurden, sind nicht dargestellt.

Eine Zuordnung der identifizierten Dornfelderproteine bezüglich ihrer Lokalisation durch Blast2GO zeigte, dass die meisten Proteine im Cytosol vorliegen (211 Proteine). 194 Proteine sind in Plastiden lokalisiert, 161 in der Plasmamembran, 134 in der extrazellulären Matrix, 133 in der Vakuole, 119 in der Zellwand, 76 im Mitochondrium, 56 im Golgiapparat und 44 in Thylakoiden. Eine komplette Liste der Lokalisationen ist in Abbildung 16 dargestellt.

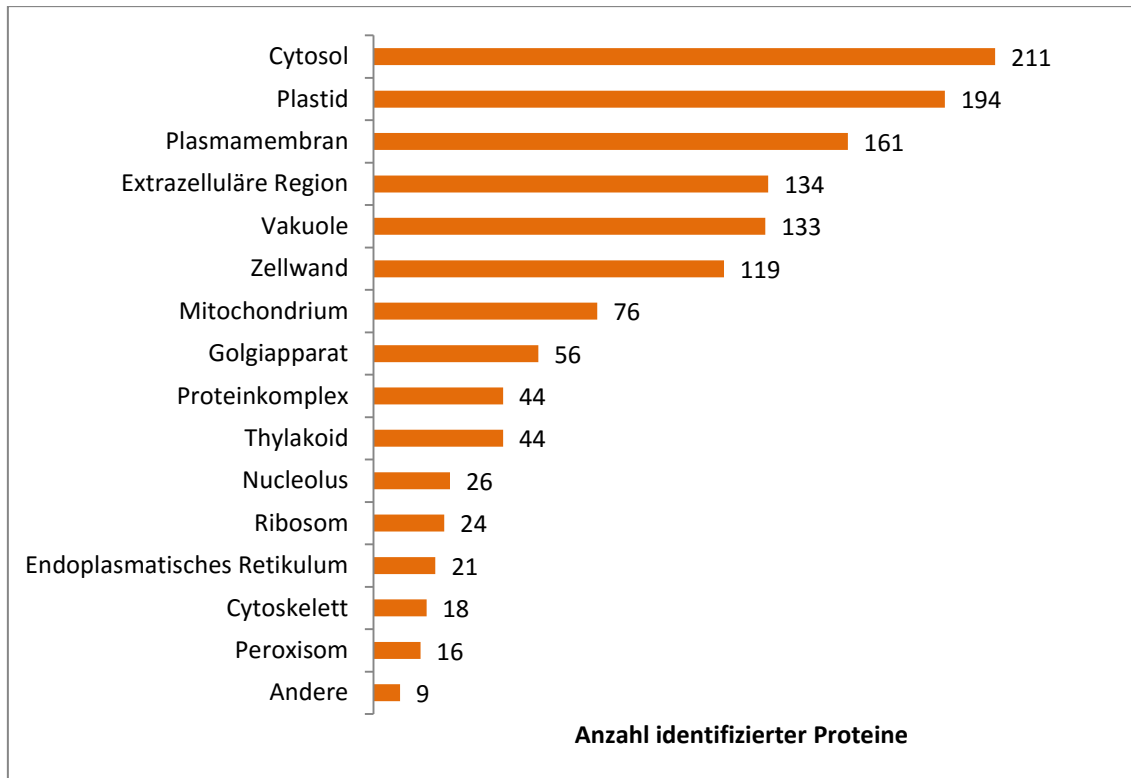


Abbildung 16: Einteilung von Proteinen aus Dornfeldertrauben nach Lokalisation

Die Proteine wurden aus reifen Dornfeldertrauben vom 23.09.2011 mit der Calbiochem-Fällung isoliert und anschließend massenspektrometrisch untersucht. Die Einteilung erfolgte durch Blast2GO.

Tabelle 4 zeigt die 20 Proteine mit der höchsten Konzentration. Die beiden häufigsten Proteine sind Legumin A-like und Cruciferin CRU1-like. Beide sind 11S Globulin-Seed-Storage-Proteine, auch bekannt als Legumine. Sie haben eine relative Konzentration von 1356 nmol/g beziehungsweise 1081 nmol/g. Im Allgemeinen enthalten Samen von Früchten eine oder mehr Gruppen von Proteinen, die in hoher Konzentration vorliegen und dem Samen als Vorrat für Aminosäuren dienen, welche für Keimung und Wachstum des Sämlings benötigt werden [142]. 11S Globuline sind Hexamere mit einer molekularen Masse von 300-400 kD, wobei die Masse der Monomere bei 50-60 kD liegt [143]. Bei diesen Proteinen mit der höchsten Konzentration handelt es sich also um Monomere von 11S Globulinen. Beide zeigen eine Sequenzhomologie von 87 % zueinander. Das Seed-Storage-Protein Vicilin-like antimicrobial Peptide 2-3 findet sich mit einer Konzentration von 405 nmol/g ebenfalls bei den höchstkonzentrierten Proteinen. Es hat eine Masse von 65 kD und gehört zu den 7S Globulinen. Durch Verdauung in Polypeptide entstehen die sogenannten antimikrobiellen Peptide (AMP). AMPs bestehen aus weniger als 100 Aminosäuren. Sie wei-

sen ein breites Spektrum an antimikrobiellen Aktivitäten gegen Bakterien, Pilze und Viren auf [144, 145]. Ein weiteres 7S Globulin mit einer Masse von 48 kD findet sich unter den Top 20.

Das mit Abstand am höchsten konzentrierte PR-Protein ist die Klasse IV Chitinase. Mit einer Konzentration von 690 nmol/g liegt es auf Platz drei der am häufigsten vorkommenden Proteine. Neben der Chitinase befinden sich drei

Tabelle 4: Top 20 Proteine aus reifen Dornfeldertrauben

Aufgelistet sind die 20 höchstkonzentrierten Proteine, welche mit Massenspektrometrie nach vorangegangener Calbiochem-Fällung identifiziert wurden. Verwendet wurden Dornfeldertrauben vom 23.09.2011. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf die Gesamtmasse aller Proteine. Eine vollständige Aufzählung aller identifizierten Proteine findet sich im Anhang, Tabelle 7

Protein	Konzentration [nmol/g]	Molekulare Masse (theoretisch) [Dalton]
Legumin a-like	1355,58	55948
Predicted: Cruciferin CRU1-like	1081,25	57346
Class IV chitinase	689,90	28384
PREDICTED: uncharacterized protein LOC100252479	535,02	40676
Enolase	468,59	48338
Fructose-bisphosphate aldolase cytoplasmic iso- zyme	406,33	39030
Vicilin-like antimicrobial peptides 2-3	404,80	64531
Glyceraldehyde-3-phosphate cytosolic	321,90	36906
Basic 7s globulin-like	227,96	48136
Isocitrate lyase	218,69	65047
Glucan endo- -beta- basic isoform-like	201,84	36734
UDP-glucose pyrophosphorylase	198,27	50368
Beta- soluble isoenzyme i-like	189,70	60784
Hypothetical protein VITISV_015174	186,10	43477
Enolase 1	152,56	48159
Pathogenesis-related protein 10	141,73	17357
Malate dehydrogenase	135,25	35904
Tyrosinase	129,13	67789
Actin	118,97	41954
NADP-dependent malic enzyme	116,49	65737

weitere PR-Proteine unter den Top 20. Die Glucan-Endo-1,3- β -Glukosidase gehört zur PR-2 Familie. β -Glukosidasen schneiden die β -1,3-glykosidische Bindung von β -1,3-Glukan, welches ein Hauptbestandteil von vielen pathogenen Pilzzellwänden ist [24]. Die gefundene Konzentration der β -Glukosidase beträgt 202 nmol/g. Weitere PR-Proteine in den Top 20 sind ein Mitglied der PR-10 Familie mit 142 nmol/g und eine Tyrosinase mit 129 nmol/g.

Die Rolle von PR-10 Proteinen bei der Pathogenabwehr ist noch unbekannt. Es wird jedoch diskutiert, dass sie Pflanzen vor Virusinfektionen schützen [146]. PR-10 Proteine werden im Fall von biotischem und abiotischem Stress exprimiert. Manche Mitglieder dieser Proteinfamilie werden aber wegen unbekannter Gründe auch ohne Stress gebildet [147, 148]. Sie werden in Trauben ab Beginn der Reifung in der Schale exprimiert [147].

Mit der Ausnahme von Aktin sind alle weiteren der bekannten Proteine in den Top 20 in den Kohlenstoffstoffwechsel involviert. Darüber hinaus sind fünf Proteine direkt an der Glykolyse oder der Glukoneogenese beteiligt, wobei drei (Invertase und zwei Malatdehydrogenasen) direkt mit dem glykolytischen Stoffwechselweg verbunden sind. Weiterhin fanden sich alle Schlüsselenzyme der Glykolyse unter den 712 identifizierten Proteinen (siehe Anhang, Tabelle 7). Sechs verschiedene Pyruvatkinasen mit einer Gesamtkonzentration von 79 nmol/g sowie drei Phosphofruktokinase mit einer Gesamtkonzentration von 23 g/mol wurden nachgewiesen. Eine Sucrose Synthase, welche die Hydrolyse von aus Blättern assimilierte Saccharose zu Glukose und Fruktose katalysiert [5], wurde ebenfalls, mit einer Konzentration von 61 nmol/g, detektiert. Im Gegensatz hierzu konnten zwei Schlüsselenzyme der Glukoneogenese nicht nachgewiesen werden. Pyruvat Orthophosphat Dikinase, welche die irreversible Konversion von Pyruvat zu Phosphoenolpyruvat katalysiert, ist nicht unter den 712 detektierten Proteinen reifer Dornfeldertrauben. Das gleiche gilt für die Fructose-1,6-Bisphosphatase. Ein Sequenzvergleich aller unbekannt Proteine mit den Schlüsselenzymen der Glukoneogenese zeigte keine Homologien. Es scheint somit, dass in reifen Dornfeldertrauben der Stoffwechselweg der Glykolyse aktiv ist, während die Glukoneogenese keine dominante Rolle spielt. Dies steht in starkem Kontrast zur bekannten Literatur. Mehrere Studien kamen zu dem Schluss, dass die Glykolyse in reifen Trauben runterreguliert oder sogar

inhibiert wird [16, 149, 150], wobei die Glukoneogenese hochreguliert wird [151, 152].

3.3 Zweidimensionale SDS-PAGE von Traubenproteinen

Um ein differenzierteres Bild der Proteinzusammensetzung von Trauben zu erhalten, wurden zweidimensionale SDS-PAGEs durchgeführt. Durch die zusätzliche Separation von Proteinen nach ihrer jeweiligen Nettoladung erhält man auf den Gelen ein Spotmuster, mit dessen Hilfe eine genauere Proteinanalyse erfolgen kann. Erneut verwendet wurden reife Dornfeldertrauben aus dem Jahr 2011. Zunächst wurden wieder Aceton-, Calbiochem-, Phenol- und TCA-Fällung miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass die Phenolfällung im Vergleich zur Aceton-, Calbiochem- und TCA-Fällung mit Abstand die meisten Spots in der besten Auflösung aufweist (siehe Abbildung 17).

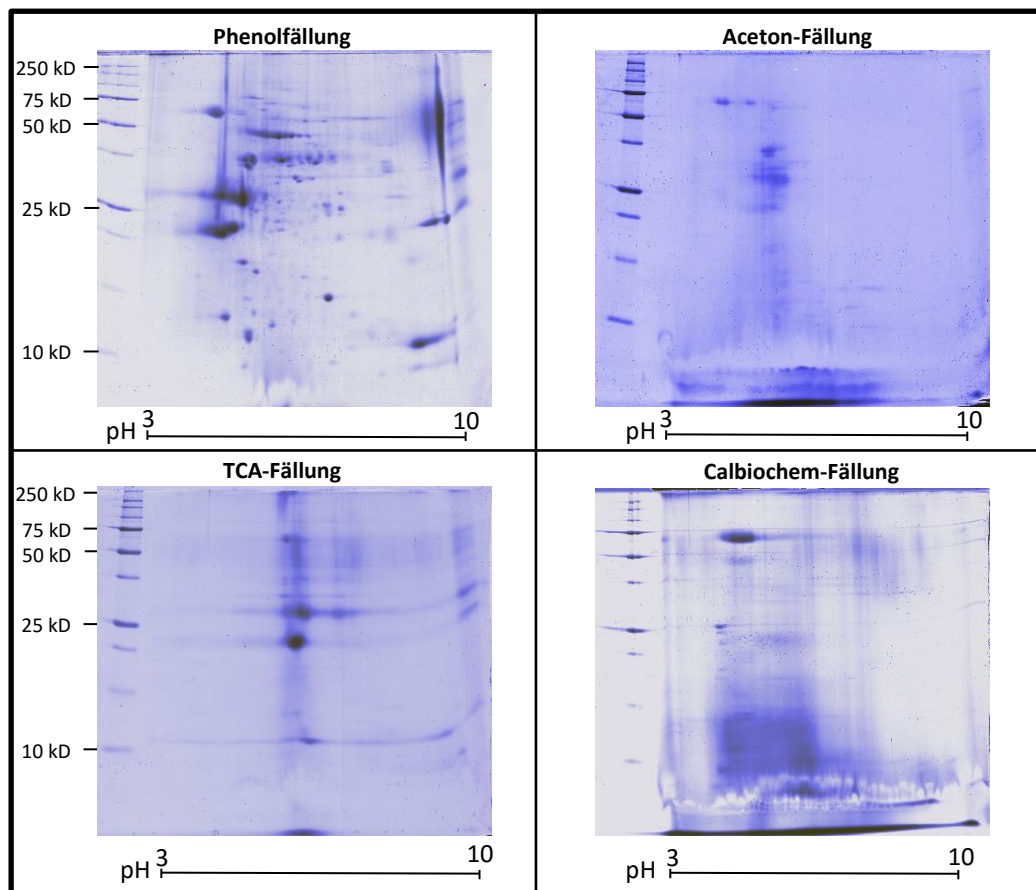


Abbildung 17: Vergleich verschiedener Proteinfällungsmethoden für 2D-SDS-PAGE
Auf diesen Gelen wurden die angegebenen Fällungen nach vorangegangener PVP-Behandlung getestet. Verwendet wurden Dornfeldertrauben vom 23.09.2011 (15 % SDS-Gel; pH 8,8; Coomassie Färbung).

Nach der Phenolfällung lassen sich über 100 Spots erkennen, die bei pH Werten zwischen ca. 4 und 10 liegen. Proteine mit einem isoelektrischen Punkt über pH 10 wurden nicht mehr horizontal aufgetrennt und erscheinen als Bandenmuster am rechten Rand des Gels. Die molekularen Massen der Proteine, die auf dem Gel visualisiert werden konnten, reichen von 10 – 75 kD. Auffällig sind die beiden größten Spotcluster in einem pH Bereich von ca. 4 - 6 bei molekularen Massen von ca. 23 und 30 kD. Diese entsprechend den prominenten Banden der Phenolfällung in Abbildung 13, die TLPs (23 kD) und Chitinasen (30 kD) zugeordnet werden können. Der prominente Spot bei 70 kD und einem pH Wert von 5 entspricht der Invertase. Alle anderen Fällungsmethoden weisen wesentlich weniger Proteinspots auf (siehe Abbildung 17). Bei der Acetonfällung sind die TLPs nur noch schwach sichtbar. Am stärksten ausgeprägt sind die Chitinasen. Lediglich vier bis fünf weitere Spots sind deutlich zu erkennen, zu denen auch die Invertase gehört. Zudem erscheinen TLPs und Chitinasen bei neutraleren pH Werten. von ca. 5 - 6,5. Nach der TCA-Fällung weisen die Spots der TLPs die höchste Intensität auf, wobei die der Chitinasen nur unwesentlich schwächer ausgeprägt ist. Auch hier sind TLPs und Chitinasen zu neutraleren pH Werten im Vergleich zur Phenolfällung verschoben. Im Gegensatz zur Acetonfällung bezieht sich diese Verschiebung auch auf die Invertase. Lediglich etwa neun weitere deutlich ausgeprägte Spots lassen sich erkennen. Allgemein weisen Proteinspots nach der TCA-Fällung im 2D-Gel horizontale Streifenbildung auf.

Nach der Calbiochemfällung ist die Intensität des Spots der Invertase mit Abstand am stärksten ausgeprägt. Chitinasen und TLPs sind nur noch schwach zu erkennen. Allgemein auffällig ist die vertikale und horizontale Streifenbildung, die eventuell weitere Spots auf dem Gel verschleiert.

3.4 Entwicklung des Proteoms von Rieslingtrauben des Jahrgangs 2012 während der Reifung

Zur Untersuchung des Proteoms von Rieslingtrauben während der Reifung wurden Trauben in einem Abstand von zwei Wochen gesammelt (siehe 2.3.2). Sobald die jungen Trauben eine durchschnittliche Größe von etwa 3 mm hatten, wurde mit der Probenakquise begonnen. Da es sich bei Riesling um eine weiße

Rebsorte handelt, ist der Zeitpunkt der *Véraison* schwerer zu bestimmen als bei roten Rebsorten. Subtile Farbänderungen und ein weicher werdendes Traubengewebe lassen jedoch darauf schließen, dass die *Véraison* in der achten Woche der Probenakquise stattfand, nachdem die insgesamt vierte Probe gesammelt wurde. Im Folgenden werden die ersten vier Wachstumsstadien als die Grünstadien und die nachfolgenden als die Reifestadien bezeichnet. Es wurden 2D-Gelelektrophoresen aller vier Grünstadien und von drei der Reifestadien durchgeführt (siehe Abbildung 18). Der zeitliche Abstand der Probenakquise der Reifestadien, welche mit 2D-Gelelektrophorese analysiert wurden, betrug 28 Tage. Obwohl die Auflösung der Proteinspots auf den Gelen das Erkennen vieler verschiedener Proteinspots zuließ, stellt die Co-Migration von Polypeptiden eine Limitierung der 2D-Gelelektrophoresentechnik dar (siehe Tabelle 5). Zu beachten ist, dass für jedes Entwicklungsstadium aus einem konstanten Volumen von 2 ml der phenolbehandelten Proteinstammlösung Proteine gefällt wurden. Somit bezieht sich die auf die Gele aufgetragene Probenmenge auf eine konstante Masse von Trauben (absolute Bestimmung) und nicht auf eine konstante Proteinmenge (relative Bestimmung).

Die Gele in Abbildung 18 zeigen einen deutlichen Anstieg der Proteinkonzentration und Proteinvarietät im Verlauf der Reifung. Jedoch sollte beachtet werden, dass Änderungen des Traubengewebes während der Reifung die Proteinextraktion beeinflussen können. Der relativ niedrige Proteingehalt der frühen Stadien könnte auch durch die limitierte Nachweisgrenze der 2D-Gelelektrophorese und Coomassie Färbung erklärt werden. Die Konzentration vieler Proteine ist eventuell nicht hoch genug, um die Detektierungsgrenze der Methode zu überschreiten, welche bei etwa 10 ng pro Spot liegt [128]. Generell auffällig ist die Zunahme von Proteinspots im basischen Bereich des letzten Reifestadiums. Die Auflösung der Proteinspots nimmt ab dem ersten Reifestadium leicht ab. Der Grund hierfür liegt in einer natürlich vorkommenden höheren Konzentration von phenolischen Substanzen der Trauben, die zur Schmierbildung führt. Phenole wurden bei Proben aus Rieslingtrauben nicht entfernt, da eine Behandlung mit PVP sich auch auf die Proteinzusammensetzung auswirken würde.

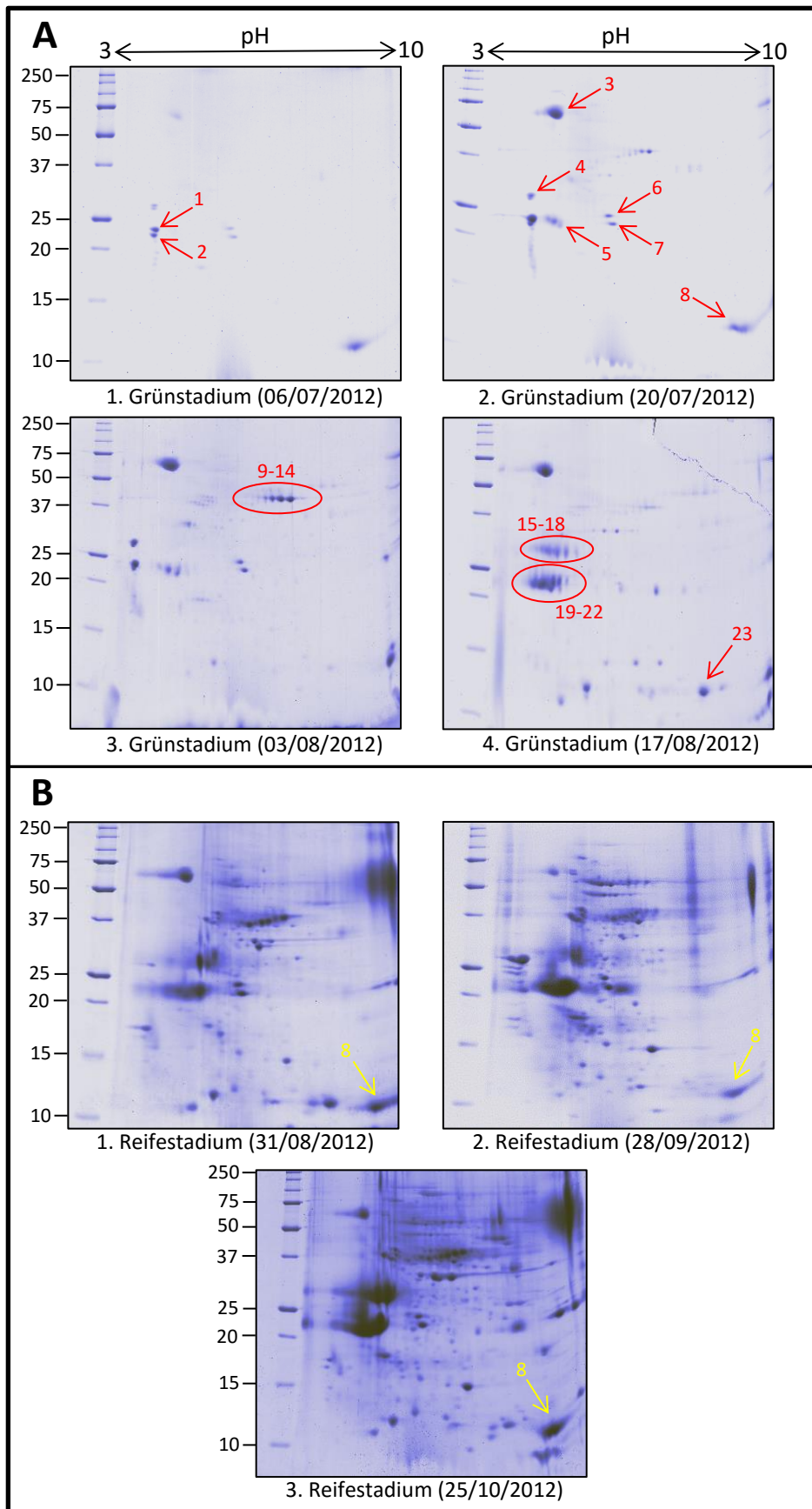


Abbildung 18: 2D-Gelelektrophorese von Rieslingtrauben des Jahrgangs 2012 während der Reifung

A: Zweidimensionale Auftrennung von Traubenproteinen aus Rieslingtrauben der **Grünstadien**
B: Zweidimensionale Auftrennung von Traubenproteinen aus Rieslingtrauben der **Reifestadien**
 Rote Markierung: Proteinspots wurden mittels Massenspektrometrie identifiziert; gelbe Markierung: korrespondierende Proteinspots. Alle Gele 15%, SDS; pH 8,8; Coomassie Färbung

Tabelle 5: Mittels Massenspektrometrie identifizierte Proteinspots von Rieslingtrauben in der Entwicklung

Proteinspots wurden in den in Abbildung 18 entsprechenden 2D-Gelen ausgeschnitten und massenspektrometrisch identifiziert. Angaben für Masse und pI beziehen sich auf die theoretischen Werte. Cov. = Coverage

Spot	Protein	Peptide	Cov. (%)	Masse [kD]	pI	NCBI Accession
1	putative ripening-related protein [<i>Vitis vinifera</i>]	26	91	15.9	3.75	NP_001268080
2	putative ripening-related protein [<i>Vitis vinifera</i>]	14	74	15.9	3.75	NP_001268080
3	vacuolar invertase 1, GIN1 [<i>Vitis vinifera</i>]	24	11	71.5	4.60	AAB47171.1
4	ripening-related protein-like [<i>Vitis vinifera</i>]	28	91	18.4	3.92	NP_001268143
5	vacuolar invertase 1, GIN1 [<i>Vitis vinifera</i>]	48	13	71.5	4.60	AAB47171.1
6	putative ripening-related protein [<i>Vitis vinifera</i>]	4	44	15.9	3.75	NP_001268080
7a	hypothetical protein VITISV_012905	1	2	34.5	9.43	CAN74232.1
7b	unnamed protein product, partial [<i>Vitis vinifera</i>]	1	0.66	10.2	9.79	CBI19688.3
8	non specific lipid transfer protein [<i>Vitis vinifera</i>]	12	42	11.8	9.00	NP_001268074.1
9a	polyphenol oxidase, chloroplastic [<i>Vitis vinifera</i>]	7	10	67.3	6.26	CAA81798.1
9b	glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase cytosolic [<i>Vitis vinifera</i>]	2	9	36.7	7.96	XP_002263145.2
10	polyphenol oxidase, chloroplastic [<i>Vitis vinifera</i>]	6	10	67.3	6.26	CAA81798.1
11a	polyphenol oxidase [<i>Vitis vinifera</i>]	15	24	67.4	6.39	AAB41022.1
11b	polyphenol oxidase chloroplastic like [<i>Vitis vinifera</i>]	3	7	48.3	5.61	XP_003634856.1
11c	glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase cytosolic [<i>Vitis vinifera</i>]	4	18	36.7	7.96	XP_002263145.2
11d	malate dehydrogenase [<i>Vitis vinifera</i>]	3	13	36.9	8.79	NP_001268095
12a	polyphenol oxidase, chloroplastic [<i>Vitis vinifera</i>]	12	16	67.3	6.26	CAA81798.1
12b	polyphenol oxidase chloroplastic like [<i>Vitis vinifera</i>]	4	9	48.3	5.61	XP_003634856.1
12c	glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase cytosolic [<i>Vitis vinifera</i>]	2	9	36.7	7.96	XP_002263145.2
13a	polyphenol oxidase [<i>Vitis vinifera</i>]	31	29	67.4	6.39	AAB41022.1
13b	polyphenol oxidase chloroplastic like [<i>Vitis vinifera</i>]	7	14	48.3	5.61	XP_003634856.1
13c	glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase cytosolic [<i>Vitis vinifera</i>]	3	15	36.7	7.96	XP_002263145.2
13d	unnamed protein product [<i>Vitis vinifera</i>]	3	10	31.5	5.82	CBI29476.3
13e	elongation factor 1 alpha like [<i>Vitis vinifera</i>]	3	6	49.3	9.41	XP_002284924.1
14a	polyphenol oxidase [<i>Vitis vinifera</i>]	47	30	67.4	6.39	AAB41022.1
14b	polyphenol oxidase chloroplastic like [<i>Vitis vinifera</i>]	12	14	48.3	5.61	XP_003634856.1
14c	glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase cytosolic [<i>Vitis vinifera</i>]	4	18	36.7	7.96	XP_002263145.2
15	class IV chitinase [<i>Vitis vinifera</i>]	2	13	27.5	5.38	NP_001268075
16	class IV chitinase [<i>Vitis vinifera</i>]	4	15	27.5	5.38	NP_001268075
17	class IV chitinase [<i>Vitis vinifera</i>]	4	23	27.5	5.38	NP_001268075
18	class IV chitinase [<i>Vitis vinifera</i>]	5	30	27.5	5.38	NP_001268075
19a	thaumatin-like protein [<i>Vitis vinifera</i>]	4	23	23.9	4.50	ABD64682
19b	protein P21 [<i>Vitis vinifera</i>]	4	24	23.9	4.56	XP_002282988
20a	vacuolar invertase 1, GIN1 [<i>Vitis vinifera</i>]	6	12	71.5	4.60	CBI24585.3
20b	putative thaumatin-like protein	3	18	20.1	4.54	CAB85636
20c	hypothetical protein VITISV_023047, partial [<i>Vitis vinifera</i>] (93% homology with TLP)	2	12	23.9	7.81	CAN65933.1

21a	Putative thaumatin-like protein	10	57	24.1	4.94	NP_001268061
21b	putative thaumatin-like protein [<i>Vitis vinifera</i>]	9	50	24.1	4.94	CAB85637
21c	protein P21 [<i>Vitis vinifera</i>]	3	12	28.8	8.54	XP_002282917
21d	vacuolar invertase 1, GIN1 [<i>vitis vinifera</i>]	6	12	71.5	4.60	AAB47171.1
22a	vacuolar invertase 1, GIN1 [<i>vitis vinifera</i>]	4	9	71.5	4.60	AAB47171.1
22b	Putative thaumatin-like protein	8	41	24.1	4.94	NP_001268061
22c	putative thaumatin-like protein [<i>Vitis vinifera</i>]	8	41	24.1	4.94	CAB85637
23	non-specific lipid-transfer protein A-like [<i>Vitis vinifera</i>]	24	38	11.9	8.09	XP_002282792.1

Im Folgenden wird die Expression einzelner identifizierter PR-Proteine im Verlauf der Reifung beschrieben.

3.4.1 Lipid Transfer Protein

Das Gel des ersten Grünstadiums zeigt nur wenige Proteinspots. Die stärkste Intensität weist hier ein non-specific Lipid Transfer Protein (nsLTP) mit einem pI Wert von knapp unter 10 und einer molekularen Masse von ca. 11 kD (siehe Abbildung 18, Spot 8) auf. Obwohl das nsLTP auch im zweiten Grünstadium erkennbar ist, kann es in den letzten zwei Grünstadien nicht mehr detektiert werden. Auffällig hier ist jedoch jeweils ein Spot der außerhalb des aufgetrennten pH Bereiches liegt (gelber Pfeil). Die molekulare Masse dieses Spots stimmt mit der des LTPs überein. Auch die Intensität dieses Spots liegt in derselben Größenordnung wie die des LTP-Spots. Da der Proteinspot des LTP in den ersten beiden Grünstadien bereits am äußersten Rand des Analysebereiches liegt, ist es vorstellbar, dass minimale Änderungen des Proteins in den letzten beiden Reifestadien dazu geführt haben, dass dessen pI -Wert nun größer als 10 ist. Eine Ungenauigkeit der IEF im Grenzbereich der pH -Skala ist ebenfalls nicht auszuschließen.

Im letzten Grünstadium wurde ein LTP A-like mit einem pI Wert von etwa 9 identifiziert (Spot 23). Ein zu dem nsLTP korrespondierender Spot ist in den Reifestadien wieder erkennbar. Dieser weist nur minimale Änderungen in der Intensität auf. Neben ihrer Rolle als PR-Proteine werden mehrere weitere Aufgaben von LTP in Pflanzen diskutiert. Zu diesen gehören Signalwege von Pflanzen (*plant signaling*), somatische Embryogenese, Cutinsynthese und β -Oxidation [153-159]. Da LTP von Beginn der Fruchtbildung synthetisiert wird, frühes Traubengewebe aber aufgrund eines niedrigen pH -wertes sowie gerin-

gem Wasser- und Zuckergehalt kein gutes Medium für Pathogene darstellt, spricht diese Tatsache für mindestens eine weitere Rolle von LTP neben seiner Hauptaufgabe als PR-Protein.

3.4.2 Tyrosinasen

Tyrosinasen können ab dem zweiten Grünstadium visuell im 2D-Gel detektiert werden. Eine Unterscheidung zwischen PPOs und Tyrosinasen ist an dieser Stelle nicht möglich, da dies eine genaue Sequenzierung der Proteine erfordern würde. Mit einer Masse von 37 kD sind vier Spots mit pI-Werten von ca. 6,5 bis 8 im Gel des zweiten Grünstadiums nebeneinander aufgereiht. Bis zum dritten Grünstadium nimmt deren Intensität zu. Insgesamt lassen sich zu diesem Zeitpunkt sechs verschiedene Spots erkennen, die alle die gleiche Masse, aber nur leicht unterschiedliche pI-Werte aufweisen. Im vierten Grünstadium hat die Intensität der Proteinspots deutlich nachgelassen. In den Reifestadien werden die Tyrosinasen auf konstant hohem Level exprimiert. Eine massenspektrometrische Untersuchung der Proteinspots weist diesen insgesamt drei verschiedenen Polyphenoloxidasen zu (siehe Abbildung 18, Spots 9-14), wobei zwei metabolische Enzyme, ein Elongationsfaktor und ein unbekanntes Protein mit den Polyphenoloxidasen co-migrierten, was eine genau Aussage über deren Expression erschwert. Hierbei ist zu erwähnen, dass die Datenbank, welche für die Auswertung der massenspektrometrischen Untersuchungen herangezogen wurde, nicht zwischen PPOs und Tyrosinasen unterscheidet. Ein Western Blot des ersten Reifestadiums gegen Traubentyrosinase zeigt sieben eindeutige Spots (siehe Abbildung 19). Ob diese möglichen Isoformen auf Gendublikation, differentiellem Spleißen oder unterschiedlicher posttranslationaler Modifikationen beruhen, kann hier nicht geklärt werden.

Wie im Fall des LTP werden auch die Tyrosinasen früh in der Traubenentwicklung exprimiert. Auch hier deutet dies auf zusätzliche Funktionen neben der Pathogenabwehr hin. Diesbezüglich diskutiert werden Involvierung in der Photosynthese, Amplifikation von Wundsignalen und eine Rolle im Phenylpropanoid Stoffwechsel. Neueste Studien zeigen letzten Punkt als den wahrscheinlichsten auf [42, 160-162].

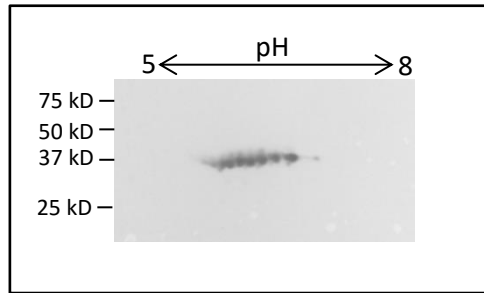


Abbildung 19: 2D-Western Blot des ersten Rieslingreifestadiums 2012 gegen Traubentyrosinase

Die Proteintrennung erfolgte auf einer 12,5 % SDS-PAGE (pH 8,8) nach vorangegangener IEF. Als Primär-Antikörper wurden Antikörper gegen Traubentyrosinase verwendet (Verdünnung 1:4000). Der sekundäre Antikörper war gegen Kaninchen gerichtet (Verdünnung 1:6000). Die Färbung erfolgte mit Hilfe einer an den sekundären Antikörper gekoppelten alkalischen Phosphatase und den Edukten NBT (3,3 mg/ml) und BCIP (1,65 mg/ml).

3.4.3 Chitinasen und TLPs

Chitinasen und TLPs sind ab dem letzten Grünstadium nachweisbar. Die Proteinspots der TLPs verteilen sich auf pI Werte zwischen 3,5 und 5 mit einer molekularen Masse von etwa 22-24 kD (Abb. 18, Spots 19-22). Proteinspots der Chitinasen zeigen die gleiche Verteilung bezüglich ihrer pI-Werte, weisen jedoch eine Masse von etwa 27-39 kD auf (Abb. 18, Spots 15-18). Bei Proteinspots die an gleicher Position in früheren Stadien nachzuweisen sind, handelt es sich um *ripening-related* Proteine bzw. Abbauprodukte der Invertase (Abb. 18, Spots 1,2,4,5). Ab der *Véraison* stellen TLPs die dominante Proteingruppe dar, wobei deren Expression im Laufe der Reifung weiter zunimmt. Die Expression der Chitinasen nimmt zwischen dem letzten Grünstadium und dem ersten Reifestadium zu, bleibt aber im zweiten Reifestadium konstant. Im letzten Reifestadium hat die Expression der Chitinasen ihr Maximum und damit eine vergleichbare Rate wie die der TLPs erreicht.

3.4.4 Invertase

Das häufigste Protein des zweiten und dritten Grünstadiums ist die Invertase (Abb. 18, Spot 3). Deren Expression variiert von hier ab bis zum zweiten Reifestadium kaum, wonach ihre Expression zurückgeht. Im letzten Reifestadium steigt die Expression der Invertase wieder an, erreicht aber nicht das Level der Grünstadien.

3.5 Vergleich der Entwicklung des Proteoms der Reifestadien von Rieslingtrauben der Jahrgänge 2012 und 2013

Um jahrgangsabhängige Unterschiede der Proteinexpression zu untersuchen wurden 2D-Gelelektrophoresen der Reifestadien des Jahrgangs 2012 durchgeführt (siehe Abbildung 20). Generell zeigt sich eine ähnliche Verteilung der Proteinspots im Vergleich zu den Gelen der Reifestadien des Jahrgangs 2012. Unterschiede finden sich jedoch im Detail. Die Expression der Invertase bleibt im Jahrgang 2013 stabil und unterliegt nicht den Schwankungen des Jahres 2012 (siehe Abbildung 20, roter Pfeil). Chitinasen werden im Vergleich zum Vorjahr in konstanten Raten exprimiert (violetter Pfeil). Es kommt hier nicht zu einem

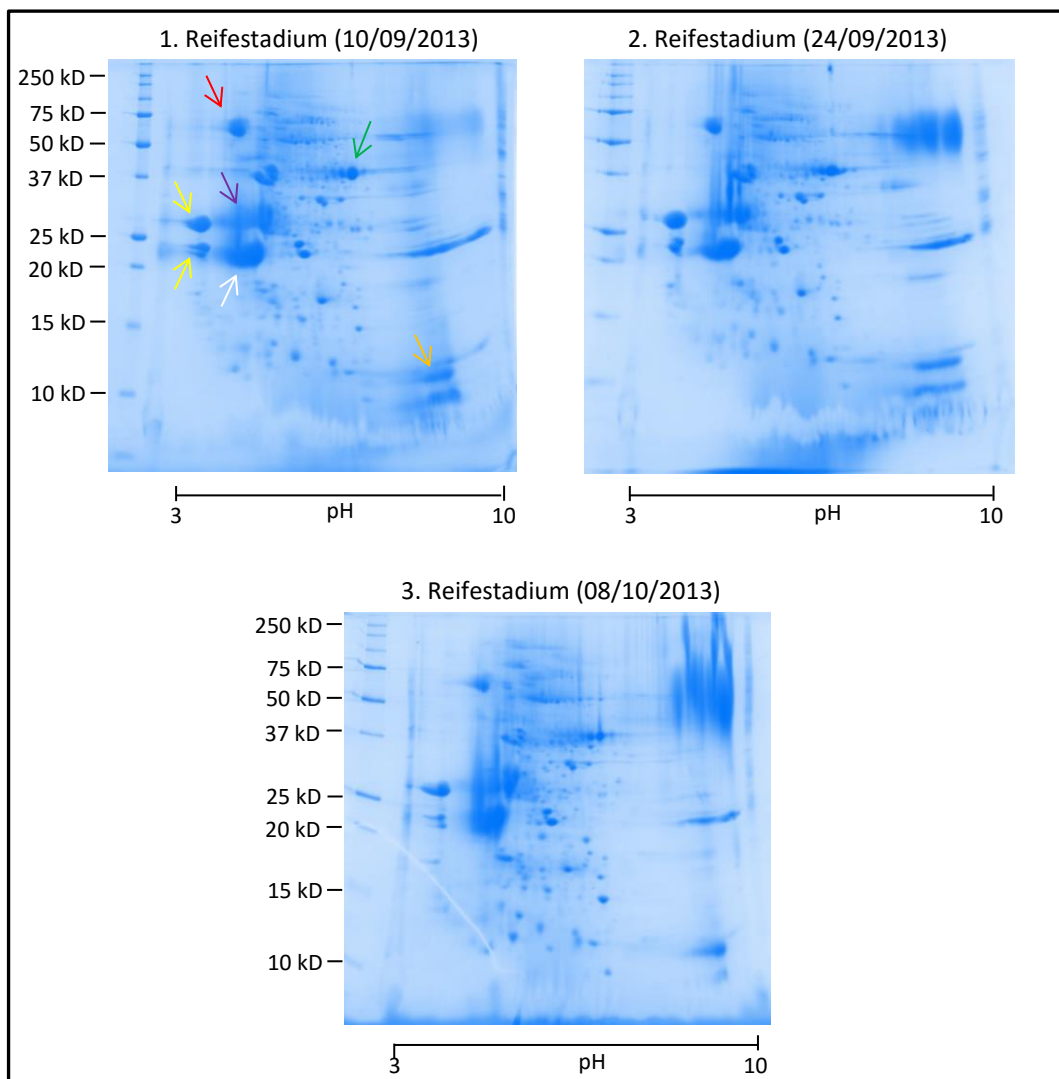


Abbildung 20: 2D-Gelelektrophorese von Rieslingtrauben des Jahrgangs 2013 während der Reifung

Zweidimensionale Auftrennung von Traubenproteinen aus Rieslingtrauben der Reifestadien nach Phenolfällung. Alle Gele 15%, SDS; pH 8,8; Coomassie Färbung

stetigen Anstieg wie noch 2012. Ebenso verhält es sich bezüglich der TLPs (weißer Pfeil) und LTP (orangener Pfeil), auch hier ist die Expression während des Reifestadiums konstant. Weiterhin fällt die verstärkte Expression der *Ripening-Related* Proteine auf (gelbe Pfeile). Bemerkenswert ist ein Proteinspot hoher Intensität unter den Tyrosinasen (grüner Pfeil) im Vergleich zu den restlichen Tyrosinasespots. Ob es sich hier um eine erhöhte Expression einer Isoform im Vergleich zum Vorjahr handelt oder ob ein co-migriertes Protein wie z.B. die Malatdehydrogenase im Jahr 2013 stärker exprimiert wurde (vgl. Tabelle 5), kann hier nicht eindeutig geklärt werden.

Die Zunahme von Proteinspots im basischen Bereich des letzten Reifestadiums des Jahrgangs 2012 lässt sich im Folgejahr nicht beobachten.

Die Unterschiede in der Entwicklung der Proteinzusammensetzung können anhand mehrerer Faktoren erklärt werden. Im Allgemeinen haben die Bodenbeschaffenheit, die Rebsorte, das Wetter sowie Stärke und Art von Pathogenbefällen Einfluss auf die Proteinzusammensetzung von Traube und Wein [17, 24, 36, 163-166]. Da sich Bodenbeschaffenheit und Rebsorte im vorliegenden Fall nicht geändert haben, sind die Gründe für Unterschiede der Proteinentwicklung in Witterung und Pathogenbefall zu suchen. Die Tatsache, dass es im Jahr 2013 nicht zu einem Anstieg der Chitinasenexpression in den Reifestadien gekommen ist, deutet darauf hin, dass in 2013 die Gefahr für Trauben durch Pilzbefall geringer war als in 2012. Da auch die Expressionslevel der PR-Proteine LTP und der TLPs in den Reifestadien von 2013 konstant blieb, scheint es, dass die generelle Belastung durch Pathogene im Jahr 2013 geringer ausfiel als im Jahr zuvor. Eine Ausnahme stellt die erhöhte Expression einer Tyrosinase im Vergleich zu 2012 dar (grüner Pfeil). Allerdings gilt es hier zu beachten, dass es sich bei diesem Proteinspot auch um ein co-migriertes Protein des Kohlenhydratstoffwechsels handeln könnte (vgl. Tabelle 5).

3.5.1 Wetteranalysen der Jahre 2012 und 2013

Abbildungen 21 und 22 zeigen Meteogramme der Jahre 2012 und 2013. Die Daten beziehen sich auf den Standort Mainz-Marienborn, der sich in einer Entfernung von etwa 4 km zum Weinberg befindet (Luftlinie).

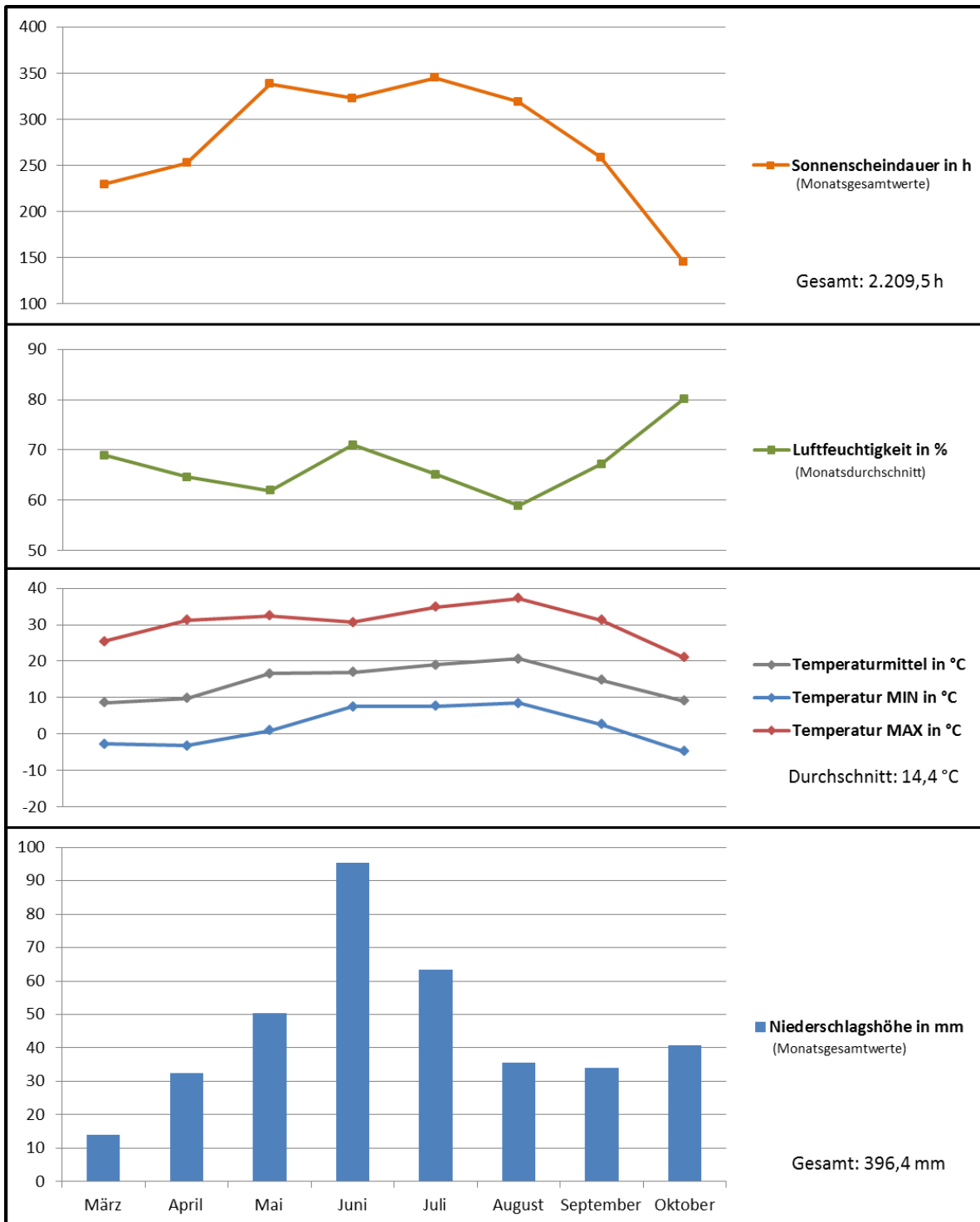


Abbildung 21: Meteogramm für Mainz-Marienborn 2012

Das Meteogramm zeigt Wetterdaten während der Wachstumsperiode der Rieslingtrauben bis zum Erntezeitpunkt. Die Rohdaten stammen von der Agrarmeteorologie Rheinland-Pfalz (www.am.rlp.de) und beziehen sich auf den 4 km vom Weinberg der Rieslingtrauben entfernten Standort Mainz-Marienborn.

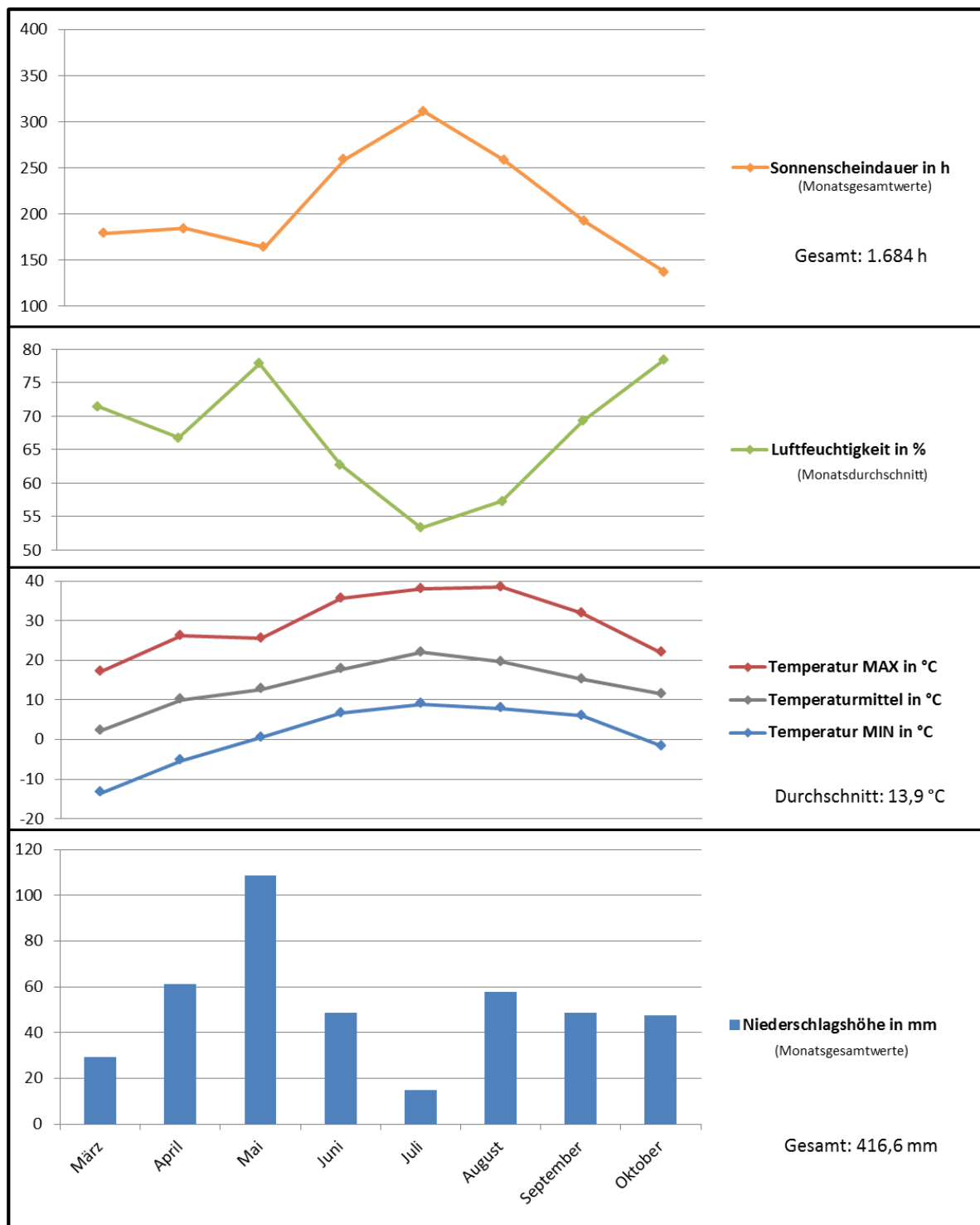


Abbildung 22: Meteogramm für Mainz-Marienborn 2012

Das Meteogramm zeigt Wetterdaten während der Wachstumsperiode der Rieslingtrauben bis zum Erntezeitpunkt. Die Rohdaten stammen von der Agrarmeteorologie Rheinland-Pfalz (www.am.rlp.de) und beziehen sich auf den 4 km vom Weinberg der Rieslingtrauben entfernten Standort Mainz-Marienborn.

Der Vergleich der Wetterverhältnisse der Jahre 2012 und 2013 zeigt, dass die Reben im Jahr 2012 wesentlich länger von der Sonne beschienen wurden. Die Sonnenscheindauer des Jahres 2012 übersteigt die des Folgejahres um mehr als 525 Stunden, was einer Zunahme von rund 31% entspricht. Auch war die Durchschnittstemperatur im Jahr 2012 um ein halbes Grad höher als 2013, wobei die Temperaturen nach der *Véraison* in beiden Jahren in etwa gleich waren. Auch bezüglich des Niederschlags gab es nach der *Véraison* keine großen Unterschiede im Vergleich der beiden Jahre. Im Jahresmittel fielen 2013 in etwa nur 5 % mehr Regen als 2012. Auffällig ist der heiße und trockene Juli 2013. Somit liegen die beiden Hauptunterschiede in der wesentlich längeren Sonnenscheindauer im Jahr 2012 sowie dem trockenen Juli 2013. Allerdings haben vorangegangene Untersuchungen gezeigt, dass die Sonnenscheindauer keinen Einfluss auf die Expression von PR-Proteinen der Traube zu haben scheint [167].

3.6 Entwicklung des Proteoms von Dornfeldertrauben des Jahrgangs 2012 während der Reifung

Das folgende Kapitel entstammt Versuchen, die von Marcel Odoguardi im Rahmen seiner von mir betreuten und ausgewerteten Masterarbeit im Jahr 2014 durchgeführt wurden [168].

3.6.1 Probenakquise

Zur Untersuchung des Proteoms von Dornfeldertrauben während der Reifung, wurden Trauben in einem Abstand von zwei Wochen gesammelt (siehe 2.3.2). Sobald die jungen Trauben eine durchschnittliche Größe von etwa 3 mm hatten, wurde mit der Probenakquise begonnen. Die *Véraison* fand statt nachdem die vierte Probe gesammelt wurde. Im Folgenden werden daher die ersten vier Wachstumsstadien als die Grünstadien, die nachfolgenden als die Reifestadien bezeichnet.

3.6.2 Vergleich der Proteinzusammensetzung von Dornfeldertrauben während der Reifung nach Calbiochem- und Phenolfällung

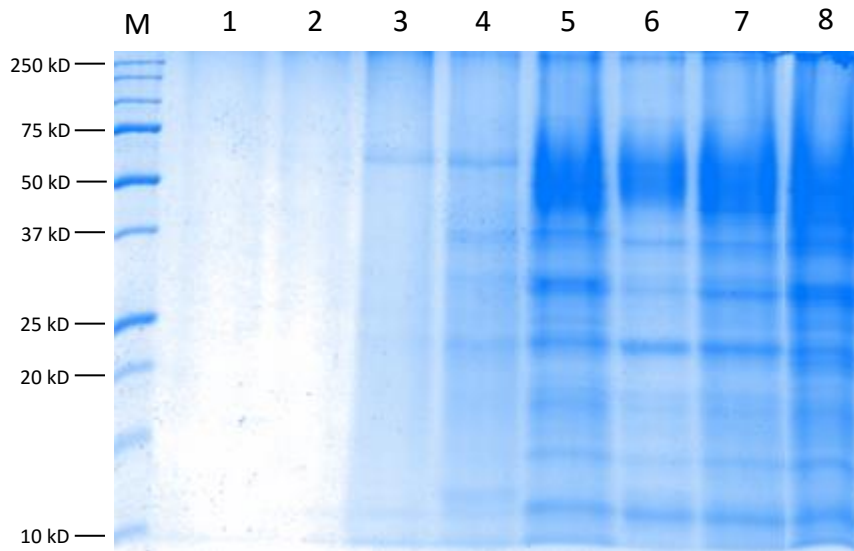


Abbildung 24: SDS-Gelelektrophorese extrahierter Dornfelderproteine während der Reifung

Auf diesem Gel wurden extrahierte Dornfelderproteine nach vorangegangener PVP-Behandlung aufgetragen. Verwendet wurden Dornfeldertrauben des Jahrgangs 2012. Die Proteine wurden mit der Calbiochem-Fällung gefällt. Das gewonnene Proteinpellet wurde mit 30 µl Probenpuffer versetzt und die Probe komplett auf das Gel aufgetragen. Die Zahlen 1-8 geben das Wachstumsstadium der Traubenproben an. 1-4 Grünstadien; 5-8 Reifestadien (12,5 % SDS-Gel; pH 8,8; Coomassie Färbung).

Abbildung 23 zeigt den Vergleich aller Wachstumsstadien nach PVP-Behandlung und Calbiochem-Fällung. In den Reifestadien sind stets identische Bandenmuster von unterschiedlicher Intensität zu sehen. Auf eine Zuordnung der jeweils etwa 11 Banden zu bestimmten Proteinen wird an dieser Stelle verzichtet, da 2D-Gelelektrophoresen eine genauere Zuordnung erlauben (siehe 3.6.3). Die Grünstadien weisen wesentlich weniger Proteinbanden als die Reifestadien auf. Im vierten Grünstadium sind noch etwa sechs Banden erkennbar, im dritten Stadium nur noch zwei Banden. Die Stadien 1 und 2 zeigen keinerlei Proteinbanden. Zum einen könnte es, wie im Fall des Riesling (siehe 3.4), daran liegen, dass der Proteingehalt von Dornfeldertrauben während der Reifung steigt oder sich Proteine in unreifen Trauben generell schwerer extrahieren lassen beziehungsweise eine hohe Varietät an Proteinen in geringer Konzentration vorliegt.

Um 2D-SDS-PAGEs durchzuführen, wurde für die Fällung der Proteine aus den Grünstadien zunächst die Phenolfällung mit einer Fällung von Martinez-Esteso et al. verglichen, die unterschiedliche Extraktionsprotokolle für Grün- und Reifestadien der ebenfalls roten Rebsorte Muscat Hamburg verwendeten hatten (Martinez-Fällung) [5]. Nachdem die Traubenproteine entsprechend der Fällungsmethoden isoliert wurden, erfolgte deren Konzentrationsbestimmung nach Bradford. Für die 2D-SDS-PAGE wurden jeweils 200 µg Protein aufgetragen. Abbildung 24 zeigt den Vergleich der beiden Fällungsmethoden.

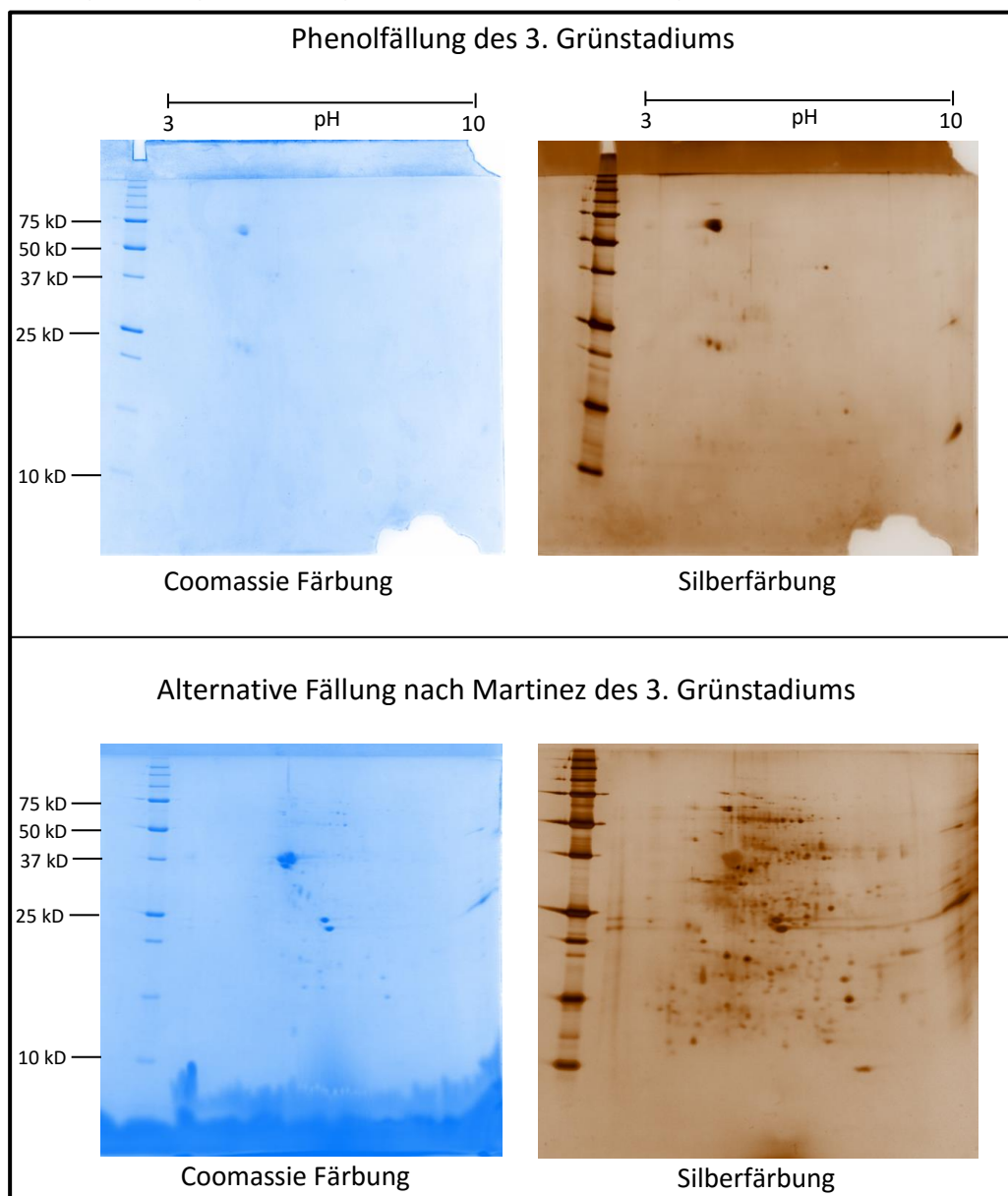


Abbildung 25: Vergleich von Phenol- und Martinez-Fällung von Proteinen aus Dornfeldertrauben im 3. Grünstadium

Die Gele zeigen verschieden gefällte Dornfelderproteine des 3. Grünstadiums nach einer 2D-SDS-PAGE. Verglichen werden Phenolfällung (oben) mit der Martinez-Fällung (unten) jeweils nach Coomassie und Silberfärbung. Alle Gele 15%, SDS; pH 8,8

Genutzt wurden Dornfeldertrauben des dritten Grünstadiums. Obwohl die aufgetragene Proteinmenge laut Bradford-Test gleich ist, sind auf dem Gel nach der Martinez-Fällung, besonders nach der Silberfärbung, wesentlich mehr Proteinspots zu sehen. Die Gründe hierfür könnten eine Verzerrung der Ergebnisse der Proteinkonzentration durch Traubenbestandteile sein oder viele verschiedenen Proteine liegen in einer Konzentration unter der Detektionsgrenze vor. Die zwei Banden, die im dritten Stadium in Abbildung 23 erkennbar sind, können auch als Proteinspots nach der Phenolfällung und Coomassiefärbung im 2D-Gel ausgemacht werden. Ein Vergleich mit den Ergebnissen unter 3.2 erlaubt eine Zuordnung der Spots. Der Proteinspot bei 75 kD kann der Invertase zugeordnet werden, die zwei Spots bei ca. 23 kD ähneln in ihrer Position und Anordnung zueinander stark den Abbauprodukten der Invertase (siehe Abbildung 18, sowie Tabelle 5). Nach der Silberfärbung können weitere sieben Proteinspots klar erkannt werden, wobei zwei außerhalb des verwendeten pH-Bereichs der IEF liegen. Relativ sicher lassen sich hierbei nur zwei Spots mit einer Masse von 37 kD den Tyrosinasen zuordnen. Da sich das Bradfordreagenz, welches für die Konzentrationsbestimmung der Proteine genutzt wurde, an basische und neutrale Aminosäurereste anlagert, wurde die Aminosäurezusammensetzung der Invertase mit der des als Standard verwendeten Trypsininhibitors verglichen. Hierbei zeigte sich, dass aufgrund der hohen Anzahl neutraler Aminosäuren der Invertase das Verhältnis von basischen und neutralen Aminosäuren zu den sauren Aminosäuren mit 6,6 etwas höher liegt als beim Trypsininhibitor mit 5,2. Nach der Invertase sowie deren Abbauprodukte zeigen die beiden Proteine, deren pI-Wert größer als 10 ist, die stärksten Intensitäten. Auch wenn es unbekannt ist, um welche Proteine es sich hierbei handelt, so deutet ihr hoher pI-Wert darauf hin, dass auch hier das Verhältnis von basischen und neutralen Aminosäuren zu sauren Aminosäuren höher einzuordnen ist als das des Trypsininhibitors.

Das bedeutet, dass die nach Bradford ermittelte Konzentrationsangabe des dritten Grünstadiums höher war als die tatsächliche. Ob diese Differenz jedoch groß genug war, um die Unterschiede zwischen Phenol- und Martinez-Fällung zu erklären, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Jedoch zeigt das Ergebnis der Martinez-Fällung klar, dass hier eine größere Varietät an Pro-

teinen extrahiert werden konnte. Somit wurde die Martinez-Fällung für alle Gele des Grünstadiums durchgeführt.

3.6.3 2D-Gelelektrophoresen der Grün- und Reifestadien von Dornfeldertrauben des Jahrgangs 2012

Es wurden 2D-Gelelektrophoresen aller vier Grün- und aller vier Reifestadien durchgeführt. Der zeitliche Abstand der Probenentnahme betrug jeweils zwei Wochen (siehe Abbildungen 25 und 26). Zu beachten ist, dass im Gegensatz zu Kapitel 3.2 für jedes Entwicklungsstadium eine konstante Proteinmenge von 200 µg auf jedes Gel aufgetragen wurde. Es handelt sich also um eine relative Bestimmung der Proteinzusammensetzung während der Reifung von Dornfeldertrauben.

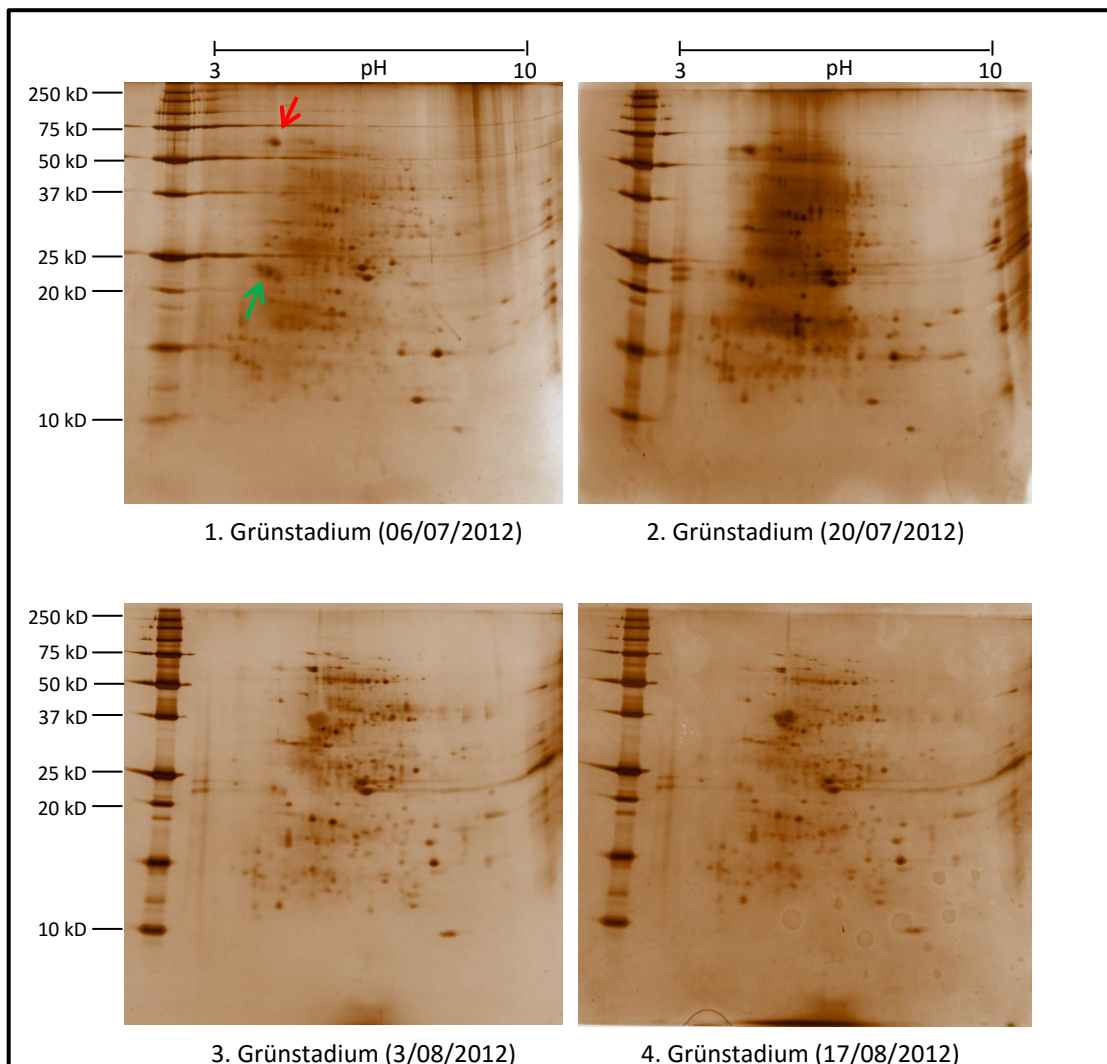


Abbildung 26: 2D-Gelelektrophorese der Grünstadien von Dornfeldertrauben des Jahrgangs 2012

Zweidimensionale Auftrennung von Traubenproteinen aus Dornfeldertrauben der Grünstadien nach Martinez-Fällung. Alle Gele 15%, SDS; pH 8,8; Silberfärbung

Da für die Grün- und Reifestadien unterschiedliche Fällungsmethoden genutzt wurden, müssen diese getrennt betrachtet werden. Zudem konnten im Rahmen dieser Arbeit keine massenspektrometrische Untersuchungen für die Versuche mit Dornfeldertauben durchgeführt werden, so dass Proteinspots hier anhand ihrer Position im Gel zugeordnet wurden. Dies ist bei den Gelen der Grünstadien nur eingeschränkt möglich. Relativ eindeutig können hier nur die Invertase (Abbildung 25, roter Pfeil) sowie deren Abbauprodukte (grüner Pfeil) zugeordnet werden. Die Spotmuster des ersten und zweiten Stadiums sind in ihrer Zusammensetzung sehr ähnlich. Vom zweiten zum dritten Grünstadium jedoch ändert sich das Spotmuster in weiten Bereichen. So ist zum Beispiel die Invertase im dritten Grünstadium nur noch schwer zu erkennen. Das Spotmuster des vierten Grünstadiums ist wieder fast identisch mit dem des dritten Grünstadiums. Somit lässt sich die erste Wachstumsphase der Dornfeldertrauben bezüglich ihrer Proteinzusammensetzung in zwei Phasen unterteilen, deren Grenze zwischen zweitem und drittem Grünstadium liegt. Abbildung 26 zeigt die 2D-Gelelektrophoresen der Reifestadien. Im Allgemeinen ist die Spotzahl in etwa konstant. Nur das erste Reifestadium weist etwas weniger Proteinspots im neutralen und basischen Bereich auf. Eine Zuordnung der Proteinspots anhand ihrer Position zu den prominenten PR-Proteingruppen ist bei den Reifestadien leichter zu treffen als bei den Grünstadien. Lediglich die Zuordnung von LTP fällt schwieriger aus. So könnte der Proteinspot außerhalb des pH-Bereichs der IEF (schwarzer Pfeil) eventuell dem nsLTP zugeordnet werden (vgl. Abbildung 7, Spot 8). Dies wäre vorstellbar, falls das nsLTP des Dornfelders etwas basischer ist, als das des Rieslings. Ein weiterer Proteinspot (orangener Pfeil) könnte eventuell dem LTP A-like zugeordnet werden (vgl. Abbildung 7, Spot 23). Im Folgenden wird die Expression einzelner PR-Proteine im Verlauf der Reifung beschrieben.

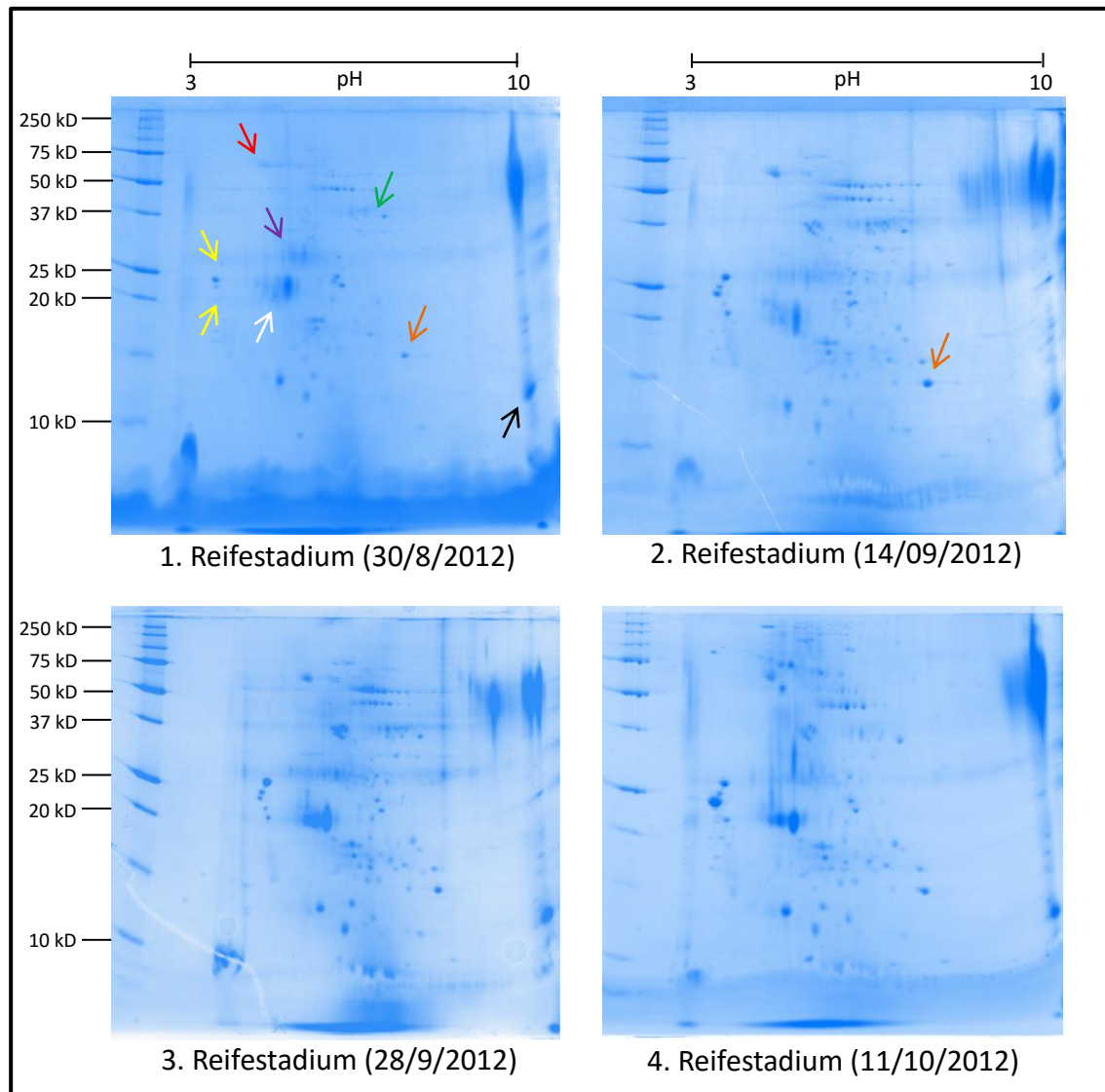


Abbildung 27: 2D-Gelelektrophorese der Reifestadien von Dornfeldertrauben des Jahrgangs 2012

Zweidimensionale Auftrennung von Traubenproteinen aus Dornfeldertrauben der Grünstadien nach Martinez-Fällung. Alle Gele 15%, SDS; pH 8,8; Coomassiefärbung

3.6.3.1 Tyrosinasen

Die Position der Tyrosinasen wurde in Abbildung 26 mit einem grünen Pfeil markiert. Die Intensität der hier lokalisierten Spots nimmt vom ersten zum zweiten Stadium zu, bleibt bis zum dritten Reifestadium in etwa konstant, bevor sie im letzten Reifestadium wieder abnimmt. In allen Stadien ist die Auflösung der Proteinspots im Bereich der Tyrosinasen sehr diffus, auch wenn einzelne Spots erkennbar sind. Abbildung 27 zeigt Western Blots des ersten und vierten Reifestadiums gegen Traubentyrosinase. Für das dritte Grünstadium wurde ebenfalls ein Western Blot durchgeführt, jedoch konnten hier keine Tyrosinasen

nachgewiesen werden. Um eine Vergleichbarkeit der Westernblots zwischen Grün- und Reifestadien zu gewährleisten, wurden hier alle Proteine mit der Martinez-Fällung isoliert. Erstes und viertes Reifestadium unterscheiden sich im Western Blot praktisch nicht. Bei beiden sind insgesamt fünf klar definierte Spots zu erkennen, zwei weniger als bei den Proben aus Rieslingtrauben. Auch hier kann nicht geklärt werden, ob diese möglichen Isoformen auf Gendublikation, differentiellem Spleißen oder unterschiedlichen posttranslationalen Modifikationen beruhen. Die Intensität und Größe der Tyrosinasespots nimmt zu, je basischer sie sind. Obwohl nach der Phenolfällung und Silberfärbung des dritten Grünstadiums Spots detektiert wurden, die der Tyrosinase zugeordnet werden können, (siehe Abbildung 24) konnte nach Martinez-Fällung und Western Blot des dritten Grünstadiums keine Tyrosinasen nachgewiesen werden. So zeigt sich, dass die beiden Fällungsmethoden Tyrosinasen in sehr unterschiedlichen Ausbeuten isolieren.

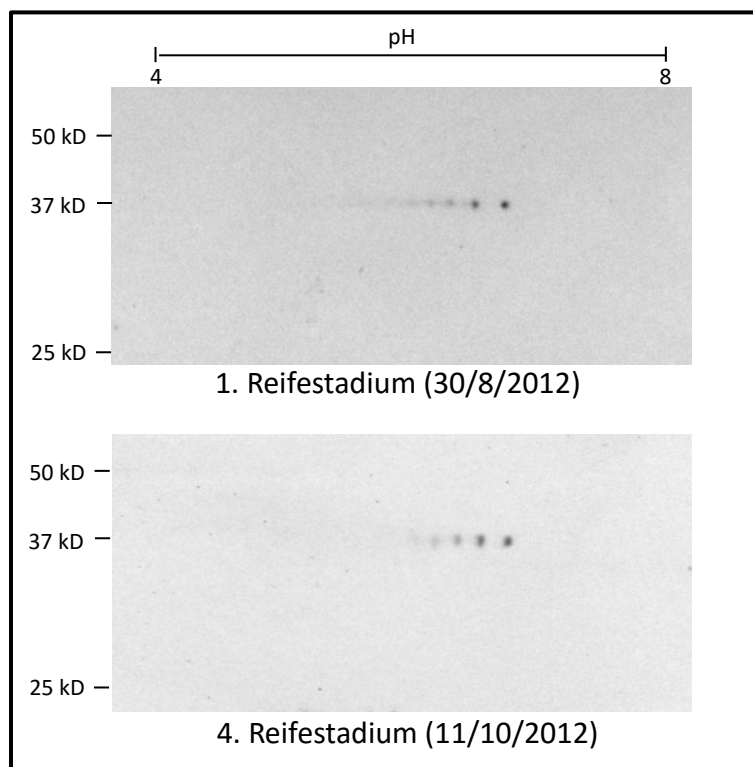


Abbildung 28: 2D-Western Blots des ersten und vierten Reifestadiums von Dornfeldertrauben gegen Tyrosinase

Die Proteintrennung erfolgte auf einer 12,5 % SDS-PAGE (pH 8,8) nach vorangegangener IEF. Als Primär-Antikörper wurden Antikörper gegen Traubentyrosinase verwendet (Verdünnung 1:4000). Der sekundäre Antikörper war gegen Kaninchen gerichtet (Verdünnung 1:6000). Die Färbung erfolgte mit Hilfe einer an den sekundären Antikörper gekoppelten alkalischen Phosphatase und den Edukten NBT (3,3 mg/ml) und BCIP (1,65 mg/ml).

3.6.3.2 Chitinasen

Über den gesamten Zeitraum der Reifestadien bleibt die Expression von Chitinasen konstant niedrig. Im Bereich der Chitinasen auf den 2D-Gelen sind keine klaren Spots, lediglich eine diffuse Färbung, erkennbar (siehe Abbildung 26, violetter Pfeil). Ein vertikaler Streifen in diesem Bereich des vierten Reifestadiums kann nur unter Vorbehalt Chitinasen zugeordnet werden, da es sich dem Aussehen nach um Streifenbildung handelt, die dem darunterliegenden Spot entstammen könnte. Insgesamt lässt sich sagen, dass besonders im Vergleich mit Rieslingtrauben der Jahrgänge 2012 und 2013 sehr wenige Chitinasen gebildet wurden, was auf einen geringen Pathogenbefall durch Pilze hindeutet.

3.6.3.3 TLPs

Während aller Reifestadien zeigen Proteinspots, die TLPs zugeordnet werden können, die höchste Intensität (siehe Abbildung 26, weißer Pfeil). Deren Expression bleibt vom ersten zum zweiten Reifestadium stabil, steigt jedoch zum dritten Stadium an. Im vierten Reifestadium scheint die Expression der TLPs wieder ein wenig zu fallen, ist jedoch noch weit über dem Niveau der ersten zwei Reifestadien. Neben einem prominenten Proteinspot entstehen im Laufe der Reifung aus einer diffusen Färbung zwei weitere Proteinspots. Diese weisen kleinere pI Werte, aber die gleiche Masse wie der Hauptspot auf.

3.7 Zusammenfassung der Untersuchungen des Traubenproteoms

Die Aufklärung des Gesamtproteoms reifer Dornfeldertrauben lieferte das bisher größte beschriebene Proteom einer Traube. Hierbei wurden mittels MS insgesamt 712 Proteine identifiziert. 650 dieser Proteine konnten biologische Funktionen und Lokalisationen zugeordnet werden. Hierbei waren „*stress response*“ und metabolische Prozesse die dominierenden Funktionen. Es stellte sich heraus, dass im Kontrast zur bekannten Literatur, die Glukoneogenese in reifen Trauben im Gegensatz zur Glykolyse keine dominante Rolle zu spielen scheint. Die Untersuchungen über den Verlauf der Proteinkomposition von Dornfelder- und Rieslingtrauben während der Reifung bestätigte im Wesentlichen die bekannten Entwicklungen von PR-Proteinen im Vergleich zu anderen

Rebsorten. Jedoch konnte gezeigt werden, dass in Rieslingtrauben die zu den PR-Proteinen zugehörigen Chitinasen und TLPs bereits vor der *Véraison* in der Traube exprimiert wurden.

Für MS-Untersuchungen stellte sich die Calbiochemfällung als die effektivste der hier getesteten Fällungsmethoden für Traubenproteine heraus. Bei 2D-Gelanalysen zeigte jedoch die Phenolfällung die meisten Proteinspots. Westernblots von Riesling- und Dornfelderproteinen gegen Traubentyrrosinase zeigten sieben mögliche Isoformen in Riesling und fünf in Dornfeldertrauben. Welche der Isoformen Tyrosinasen oder PPOs sind, konnte an dieser Stelle nicht geklärt werden.

3.8 Isolierung und Aufreinigung traubeneigener Tyrosinasen

Zur Untersuchung der Tyrosinasen aus Trauben mussten diese zuerst isoliert und aufgereinigt werden. Hierbei sollte eine höchstmögliche Reinheit der Enzyme in guter Ausbeute erzielt werden. Um letzteres zu erreichen, wurden Trauben der Rebsorte Riesling für die Extraktion der Tyrosinasen gewählt, da bei weißen Rebsorten auf eine Behandlung der Proteinlösung mit PVP verzichtet werden konnte. Wie bereits erwähnt, kann PVP neben Phenolen auch Proteine binden und somit die deren Ausbeute während der Extraktion erniedrigen. Um die Reinheit der isolierten Tyrosinasen schon vor der eigentlichen Aufreinigung zu maximieren, wurde diese nicht aus reifen Trauben extrahiert, sondern aus dem dritten Grünstadium des Jahrgangs 2012. Der Grund hierfür liegt in der hohen Konzentration der Tyrosinasen relativ zu den restlichen Proteinen (vgl. Abbildung 18 A).

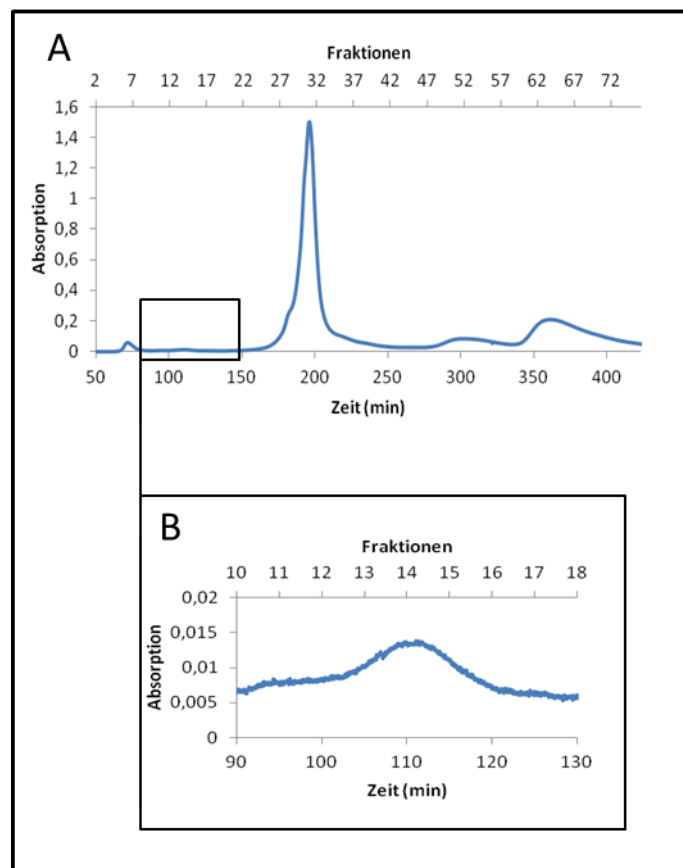


Abbildung 29: Elutionsprofil der SEC von Rieslingproteinen

A: Elutionsprofil nach Größenausschlusschromatographie von Rieslingproteinen

B: Vergrößerung des Elutionsprofils der tyrosinasehaltigen Fraktionen

Verwendet wurde eine Sephacryl S-200 Säule. Die Flussrate während der Auftrennung betrug 8 ml/min. Es wurde ein Phosphatpuffer (0,1M, pH 8) verwendet.

Dank dieser spezifischen Probenwahl war es möglich, dass nach der Extraktion der Proteine aus der Traube lediglich eine Größenausschlusschromatographie benötigt wurde, um die Tyrosinasen in einer Reinheit von über 95% zu erhalten. Abbildung 28 A zeigt das Elutionsprofil der Größenausschlusschromatographie von Proteinen aus Rieslingtrauben. Tyrosinasehaltige Fraktionen wurden mit Hilfe eines Dot-Blots und Dopamin als Substrat bestimmt (siehe Abbildung 29).

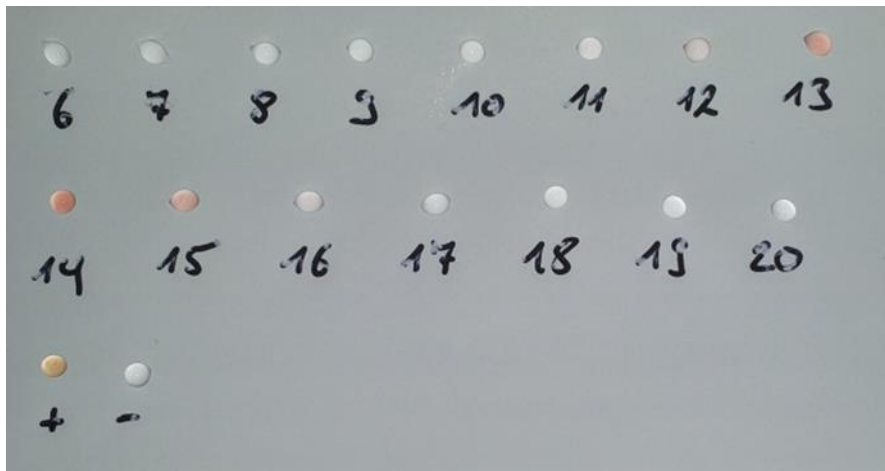


Abbildung 30: Dot Blot der tyrosinasehaltigen Fraktionen nach SEC
Aufgetragen sind die Fraktionen 6-20 einer Größenausschlusschromatographie von Proteinen aus Rieslingtrauben. Verwendet wurde ein Citratpuffer (0,1M, pH 5), als Substrat diente Dopamin (10 mM), als Positivkontrolle wurde Tyrosinase aus *Agaricus bisporus* (50,7 U/ml) verwendet.

Hierbei waren Tyrosinasen stets in den Fraktionen 11-16 nachweisbar, wobei die höchste Konzentration in den Fraktionen 13-15 zu finden war. Anschließend wurden die einzelnen Fraktionen mit Hilfe eines Zentrifugalfilters (Molekulargewicht cut-off: 3000 kD) von einem Volumen von 3 ml auf etwa 250 µl konzentriert. Mittels Gelelektrophorese wurde anschließend die Reinheit der einzelnen Fraktionen untersucht. Unabhängig von der Fraktion wurde Proben ähnlicher Reinheit danach in Pools vereinigt. In Pool A wurden Proben höchster Reinheit vereinigt, d.h. es waren auch nach Silberfärbung keine Banden neben den Tyrosinasen erkennbar. In Pool B wurden Proben hoher Reinheit vereinigt, hier waren nach Coomassie-Färbung keine Banden neben den Tyrosinasen zu erkennen. In Pool C wurden die restlichen Proben zusammengefügt.

Abbildung 30 zeigt ein SDS-Gel der Pools A, B und M. Pool M wurde von Margarita Bauer im Rahmen Ihrer Diplomarbeit erstellt [169].

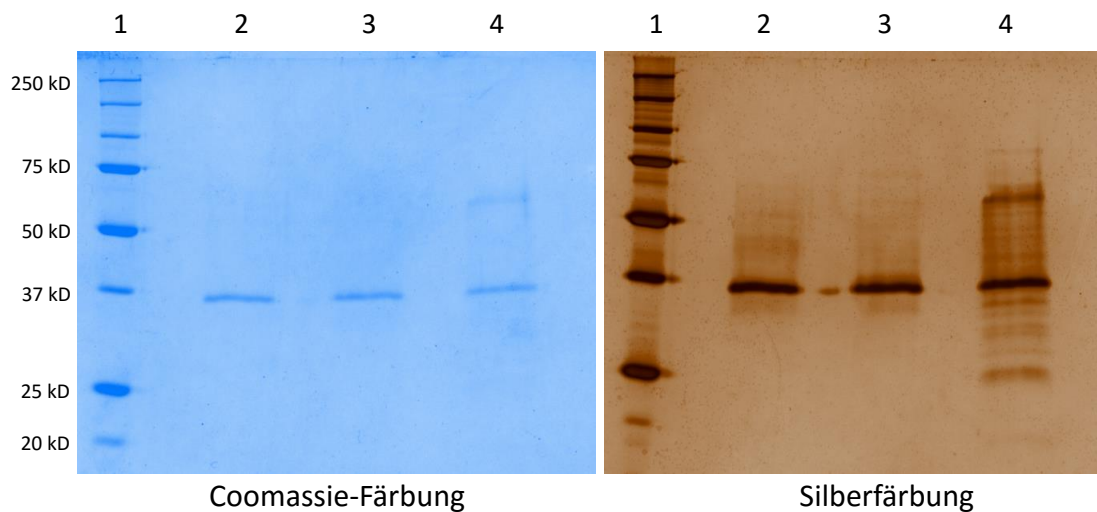


Abbildung 31: SDS-Gel der vereinigten tyrosinasehaltiger Fraktionen nach SEC

1: Marker; 2: Pool A; 3: Pool B; 4: Pool M

Auf diesem Gel (10 % SDS, pH 8,8) wurden vereinte tyrosinasehaltige Fraktionen nach Größenausschlusschromatographie aufgetragen. Verwendet wurden Rieslingtrauben des Jahrgangs 2012 im dritten Grünstadium. Zu 20 μ l Probe wurden jeweils 10 μ l Denaturierungspuffer gegeben.

Trotz der Auswahlkriterien für die Vereinigung der Fraktionen zu Pools ist in Abbildung 30 kein wesentlicher Unterschied der Pools A und B zu erkennen. Beide weisen eine sehr hohe Reinheit von etwa 95 % auf. Pool B erscheint nach der Silberfärbung sogar etwas reiner als Pool A. Verunreinigungen, die in einzelnen Fraktionen sichtbar waren, könnten nach der Vereinigung in Pool B unter der Detektionsgrenze liegen. In Pool M ist eine schwach sichtbare Bande bei ca. 60 kD zu erkennen, was der Größe der latenten Form der Tyrosinase entspricht. Um dies zu klären, wurde ein Western Blot mit Pool M sowie mit Pool B als Kontrolle durchgeführt (siehe Abbildung 31).

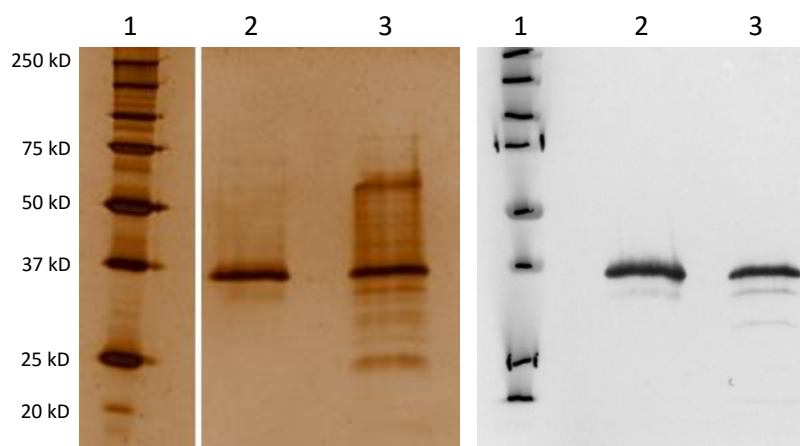


Abbildung 32: Westernblot der aufgereinigten Tyrosinasen aus Rieslingtrauben

1: Marker; 2: Pool B; 3: Pool M

Die Proteintrennung erfolgte auf einer 10 % SDS-PAGE (pH 8,8). Als Primär-Antikörper wurden Antikörper gegen Traubentyrosinase verwendet (Verdünnung 1:4000). Der sekundäre Antikörper war gegen Kaninchen gerichtet (Verdünnung 1:6000). Die Färbung erfolgte mit Hilfe einer an den sekundären Antikörper gekoppelten alkalischen Phosphatase und den Edukten NBT (3,3 mg/ml) und BCIP (1,65 mg/ml).

Dieser zeigt eindeutig, dass es sich bei der Bande von etwa 60 kD nicht um die latente Form der Tyrosinasen handelt. Dies bedeutet, dass in allen folgenden Untersuchungen ausschließlich mit der aktiven Form der Tyrosinase gearbeitet wurde.

Um in den folgenden Versuchen einheitliche Mengen aktiven Enzyms einzusetzen wurde sich stets auf die Aktivität der eingesetzten Enzymlösungen bezogen und nicht auf deren Masse. Die Aktivität wurde mit Hilfe des MBTH-Assays und Dopamin (2,1 mM) als Substrat bestimmt (in Citratpuffer; 0,1 M; pH 5; 20°C). Hierbei wurde die durch Tyrosinaseoxidation bedingte Absorptionzunahme bei 505 nm im *steady state* beobachtet und mit Hilfe des Gesetzes von Lambert-Beer der Umsatz berechnet. Verwendet wurde der Extinktionkoeffizient des Dopachinon-MBTH-Addukts von $29000 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$ bei 505 nm. Hierbei ergab sich eine Aktivität von 1003 U/ml für Pool A, 966 U/ml für Pool B und 648 U/ml für Pool M.

3.9 Umsatz phenolischer Weininhaltsstoffe durch Tyrosinase

Im Folgenden wird der Umsatz von phenolischen Weininhaltsstoffen durch die Tyrosinase betrachtet. Hierbei wurden vier verschiedenen Substanzklassen untersucht: Hydroxyzimtsäuren, Benzoessäuren, Stilbene und Chalkone. Der Umsatz wurde mittels Produktspektren und Sauerstoffverbrauchsmessungen bestimmt. Bei der Messung der Produktspektren wurde stets der MBTH-Assay angewandt. In der Reaktionslösung befand sich immer 2,1 mM Substrat und 4,2 mM MBTH. Die Messungen wurden in Citratpuffer (0,1 M, pH 5) bei 20°C durchgeführt. Die Enzymmenge unterschied sich für o-Diphenole (o-Diphenolansatz, 1,62 U/ml Tyrosinase aus Rieslingtrauben) und jene Phenole die über keine benachbarten Hydroxylgruppen (Monophenolansatz, 8,1 U/ml Tyrosinase aus Rieslingtrauben) verfügten. Dies liegt darin begründet, dass o-Diphenole in der Regel wesentlich schneller umgesetzt werden, als Substrate, die über keine benachbarten Hydroxylgruppen verfügen. Durch den Einsatz höherer Enzymmengen konnte so die Messzeit verkürzt werden.

3.9.1 Umsatz von Hydroxyzimtsäuren durch Tyrosinase aus Rieslingtrauben

Untersucht wurden fünf Vertreter der Hydroxyzimtsäuren: die Diphenole Kaffeesäure und dessen Tartratester die Kaftarsäure sowie das Monophenol p-Cumarsäure und die methylierten Phenole Ferulasäure und Sinapinsäure.

3.9.1.1 Kaffee- und Kaftarsäure

Produktspektren zum Umsatz von Kaffee- und Kaftarsäure, die mit dem MBTH-Assay gemessen wurden, werden in Abbildung 32 gezeigt. Es handelt sich um die beiden Substrate, die am besten von den Tyrosinasen aus Rieslingtrauben umgesetzt werden. Kaftarsäure wird bei der verwendeten Substratkonzentration noch etwas schneller umgesetzt. Bei Kaffeesäure ist 5 Minuten nach Start der Reaktion eine Trübung zu erkennen, die über Nacht sedimentiert. Die Zugabe von MBTH sollte eigentlich unterbinden, dass die durch Oxidation der Kaffeesäure gebildeten Chinone autoreaktiv über diverse Zwischenstufen polymerisieren (siehe 2.4.2.1). Im Fall der Kaffeesäure gelingt es jedoch nicht diese Prozesse mit MBTH zu inhibieren. Da nach der Oxidation der Kaftarsäure keine Polymerisation eintritt, ist davon auszugehen, dass die freie Carboxylgruppe der Kaffeesäure eine essentielle Rolle bei der Polymerisierung spielt.

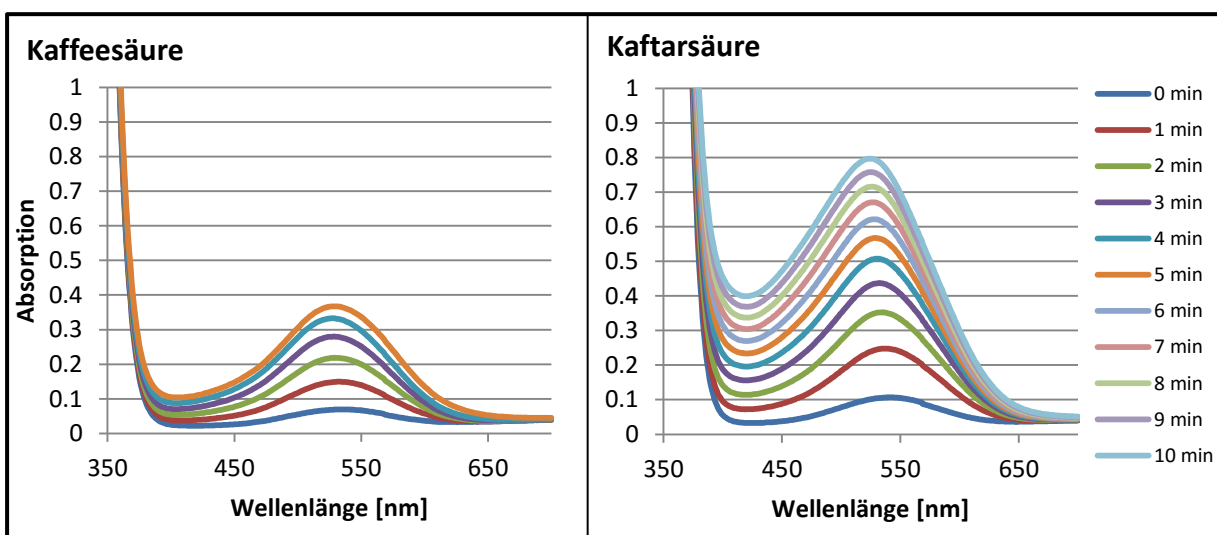


Abbildung 33: Produktspektren von Kaffee- und Kaftarsäure bei Katalyse mit Tyrosinase aus Rieslingtrauben

Dargestellt ist jeweils ein MBTH-Assay als Produktspektrum von 350 bis 700 nm. Die Substratkonzentration war jeweils 2,1 mM, die Aktivität der Tyrosinase betrug 1,62 U/ml. Weiterhin befand sich, mit einer Konzentration von 4,2 mM, MBTH im Ansatz. Puffer: Citratpuffer 0,1M, pH 5

3.9.1.2 p-Cumarsäure

Abbildung 33 zeigt das Produktspektrum der p-Cumarsäure. Bei der p-Cumarsäure handelt es sich um ein Monophenol. Da sich ein Umsatz der p-Cumarsäure beobachten ließ, handelt es sich bei den isolierten PPOs zumindest teilweise um Tyrosinasen. Ob alle oder nur bestimmte Isoformen, die in Abbildung 19 gezeigt wurden, für die Tyrosinaseaktivität verantwortlich sind, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden.

Wie im Fall der Kaffeesäure kommt es auch beim Umsatz der p-Cumarsäure zur Niederschlagsbildung, weshalb die Reaktion abgebrochen wurde, sobald Streueffekte zu beobachten waren. Da Kaffee- und p-Cumarsäure die gleichen Oxidationsprodukte nach Umsatz mit Tyrosinase bilden, kann auch hier die Niederschlagsbildung mit autokatalytischen Polymerisationsreaktionen der MBTH-Chinonkondensate erklärt werden. Das Monophenol p-Cumarsäure wird erst nach einer Lag-Phase von etwa 15 Minuten messbar umgesetzt.

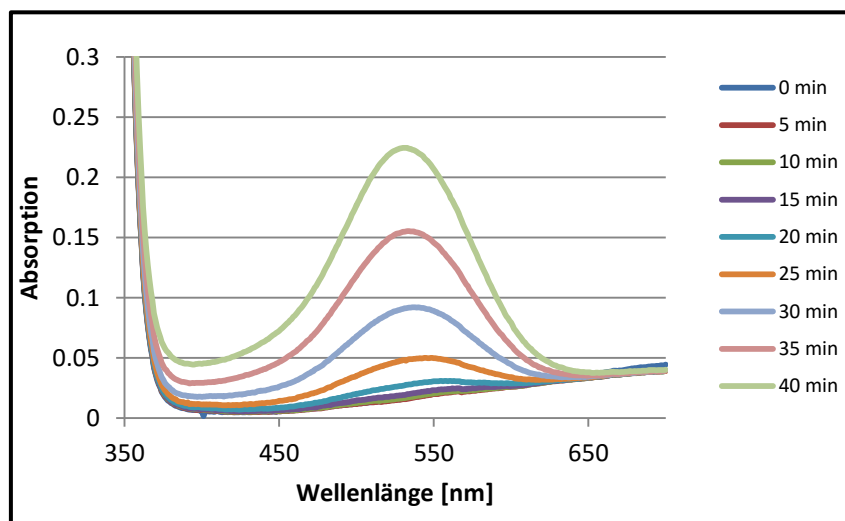


Abbildung 34: Produktspektrum von p-Cumarsäure bei Katalyse mit Tyrosinase aus Rieslingtrauben

Dargestellt ist ein MBTH-Assay als Produktspektrum von 350 bis 700 nm. Die Substratkonzentration war 2,1 mM, die Aktivität der Tyrosinase betrug 8,1 U/ml. Weiterhin befand sich, mit einer Konzentration von 4,2 mM, MBTH im Ansatz. Puffer: Citratpuffer 0,1M, pH 5

3.9.1.3 Ferula- und Sinapinsäure

Die methylierten Hydroxycimtsäuren Ferula- und Sinapinsäure werden nicht von Tyrosinase aus Rieslingtrauben umgesetzt. Selbst nach 48 h konnte, auch in Ansätzen mit doppelter Enzymkonzentration, im MBTH-Assay keine Aktivität

festgestellt werden. Tyrosinase aus *Agaricus bisporus* ist jedoch in der Lage beide Substrate zu oxidieren wie Abbildung 34 zeigt.

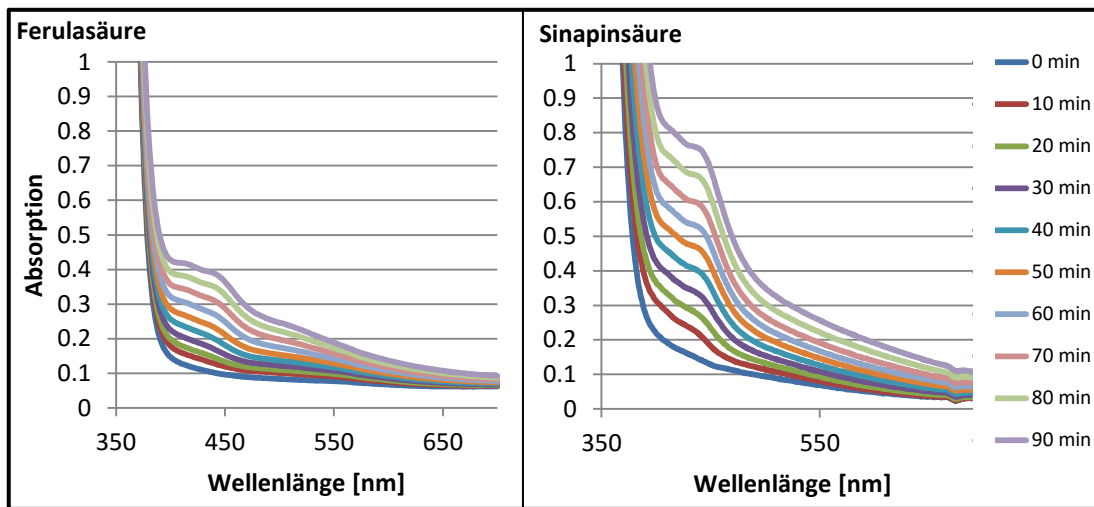


Abbildung 35: Produktspektren von Ferula- und Sinapinsäure bei Katalyse mit Tyrosinase aus *Agaricus bisporus*

Dargestellt sind MBTH-Assays als Produktspektren von 350 bis 700 nm. Die Substratkonzentration war 2,1 mM, die Aktivität eingesetzter Tyrosinase aus *Agaricus bisporus* betrug 50,7 U/ml. Weiterhin befand sich, mit einer Konzentration von 4,2 mM, MBTH im Ansatz. Puffer: Citratpuffer 0,1M, pH 5

3.9.2 Umsatz von trans-Stilbenen durch Tyrosinase aus Rieslingtrauben

Der Vergleich der Produktspektren von Resveratrol und seinem 3-O-Glykosid Polydatin zeigt, dass hier trotz MBTH-Zusatz nicht die gleichen Produkte entstehen (siehe Abbildung 35). Im Gegensatz zu Resveratrol sind im Fall von Polydatin zwei verschiedene Maxima im Produktspektrum zu sehen. Bei beiden Reaktionen kam es zu keiner Niederschlagsbildung. Der Umsatz beider Substrate ist erst nach einer Lag-Phase messbar. Bei Resveratrol dauerte es 20 Minuten, bei Polydatin sogar 60 Minuten bis ein Anstieg der Absorption bei 540 nm zu beobachten war.

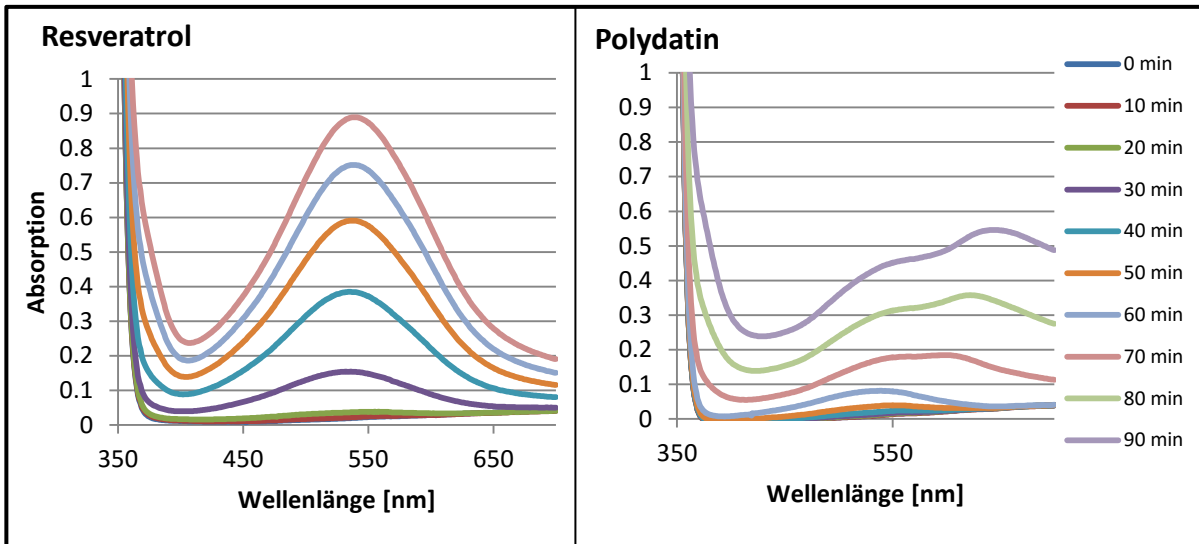


Abbildung 36: Produktspektren von Resveratrol und Polydatin bei Katalyse mit Tyrosinase aus Rieslingtrauben

Dargestellt ist jeweils ein MBTH-Assay als Produktspektrum von 350 bis 700 nm. Die Substratkonzentration war jeweils 2,1 mM, die Aktivität der Tyrosinase betrug 8,1 U/ml. Weiterhin befand sich, mit einer Konzentration von 4,2 mM, MBTH im Ansatz. Puffer: Citratpuffer 0,1M, pH 5

3.9.3 Umsatz von Chalkonen durch Tyrosinase aus Rieslingtrauben

In Abbildung 36 ist der Vergleich der Produktspektren von Phloretin sowie seinem 5-O-Glykosid Phlorizin dargestellt. Hierbei unterscheiden sich die beiden Chalkone kaum. Bei beiden Substraten bildet sich ein Absorptionsmaximum bei etwa 510 nm aus. Obwohl die beiden Chalkone über keine benachbarten aromatischen Hydroxylgruppen verfügen, lässt sich der Anstieg bei 510 nm ohne eine vorherige Lag-Phase feststellen. Bei beiden Reaktionen bildet sich nach etwa 50 Minuten eine Trübung, die sich über Nacht abgesetzt hat.

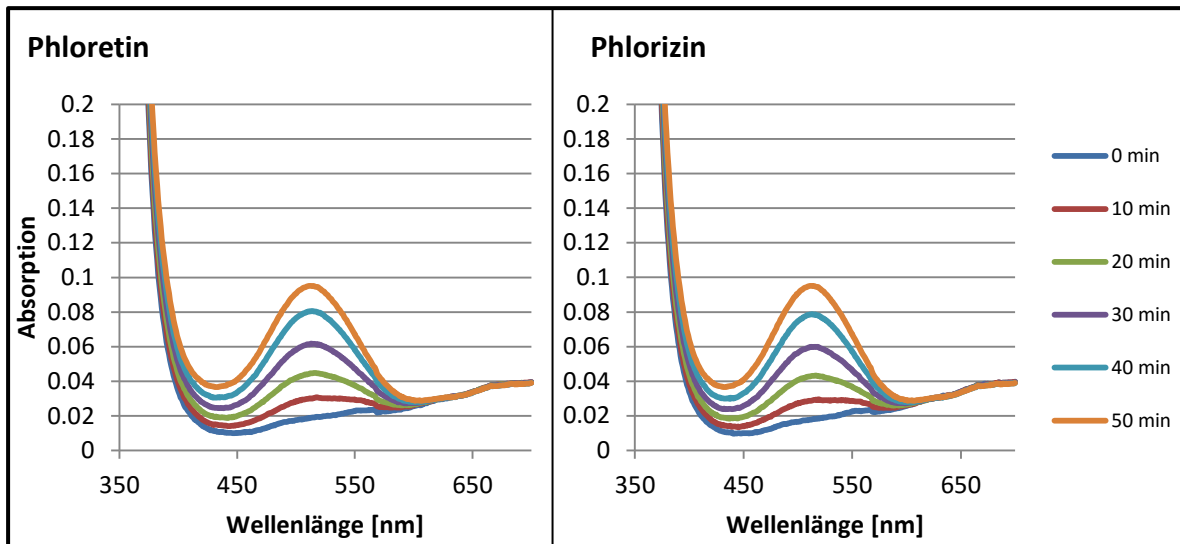


Abbildung 37: Produktspektren von Phloretin und Phlorizin bei Katalyse mit Tyrosinase aus Rieslingtrauben

Dargestellt ist jeweils ein MBTH-Assay als Produktspektrum von 350 bis 700 nm. Die Substratkonzentration war jeweils 2,1 mM, die Aktivität der Tyrosinase betrug 8,1 U/ml. Weiterhin befand sich, mit einer Konzentration von 4,2 mM, MBTH im Ansatz. Puffer: Citratpuffer 0,1M, pH 5

3.9.4 Umsatz von Hydroxybenzoesäuren durch Tyrosinase aus Rieslingtrauben

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Umsatz von insgesamt fünf verschiedenen Hydroxybenzoesäuren untersucht. Im Einzelnen handelt es sich um die beiden Triphenole Gallussäure und Ethylgallat, außerdem 4-Hydroxybenzoesäure (4-HB), 3,4-Dihydroxybenzoesäure (3,4-DHB) sowie dessen monomethylierte Form Vanillinsäure.

3.9.4.1 Gallussäure und Ethylgallat

Obwohl sich Ethylgallat lediglich durch die Veresterung seiner Carboxylgruppe von Gallussäure unterscheidet, wird es wesentlich langsamer von Rieslingtyrosinase umgesetzt (siehe Abbildung 37). Mit bloßem Auge ist eine Färbung erst am nächsten Tag zu beobachten. Obwohl es sich bei beiden Substraten um 3,4,5-Triphenole handelt, musste für die Messung der Monophenolansatz mit 8,1 U/ml Tyrosinase verwendet werden, da unter Verwendung des Diphenolan-

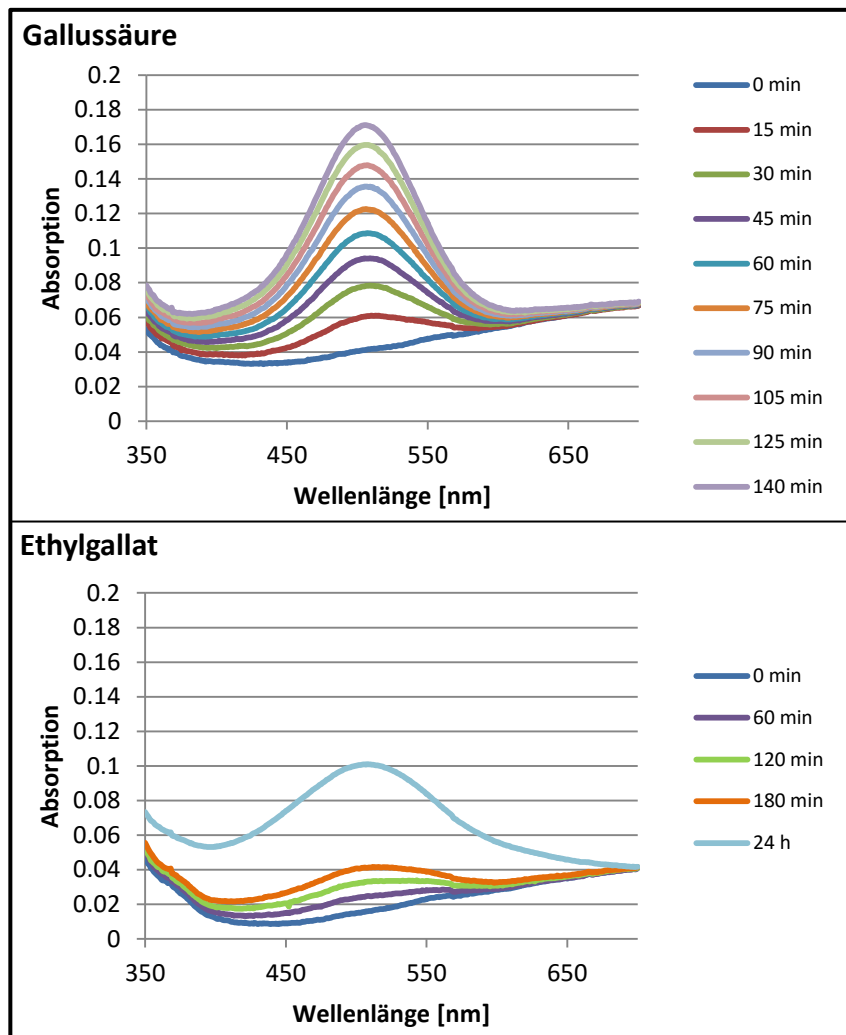


Abbildung 38: Produktspektrum von Gallussäure und Ethylgallat bei Katalyse mit Tyrosinase aus Rieslingtrauben

Dargestellt ist ein MBTH-Assay als Produktspektrum von 350 bis 700 nm. Die Substratkonzentration war 2,1 mM, die Aktivität der Tyrosinase betrug 8,1 U/ml. Weiterhin befand sich, mit einer Konzentration von 4,2 mM, MBTH im Ansatz. Puffer: Citratpuffer 0,1M, pH 5

satzes mit 1,62 U/ml kein Umsatz festzustellen war. Der im Vergleich zur Gallussäure erniedrigte Umsatz von Ethylgallat könnte vermutlich durch eine verringerte Substratspezifität aufgrund der Veresterung der Carboxylgruppe erklärt werden.

3.9.4.2 4-Hydroxybenzoesäure und 3,4-Dihydroxybenzoesäure

Abbildung 38 zeigt den Vergleich der Produktspektren von 4-Hydroxybenzoesäure und 3,4-Dihydroxybenzoesäure. Beide bilden im MBTH-Assay Absorptionsmaxima bei 510 nm aus. 4-Hydroxybenzoesäure wird nur

sehr langsam von Tyrosinase aus Rieslingtrauben umgesetzt. Ein Anstieg der Absorption konnte erst einen Tag nach Start der Reaktion festgestellt werden.

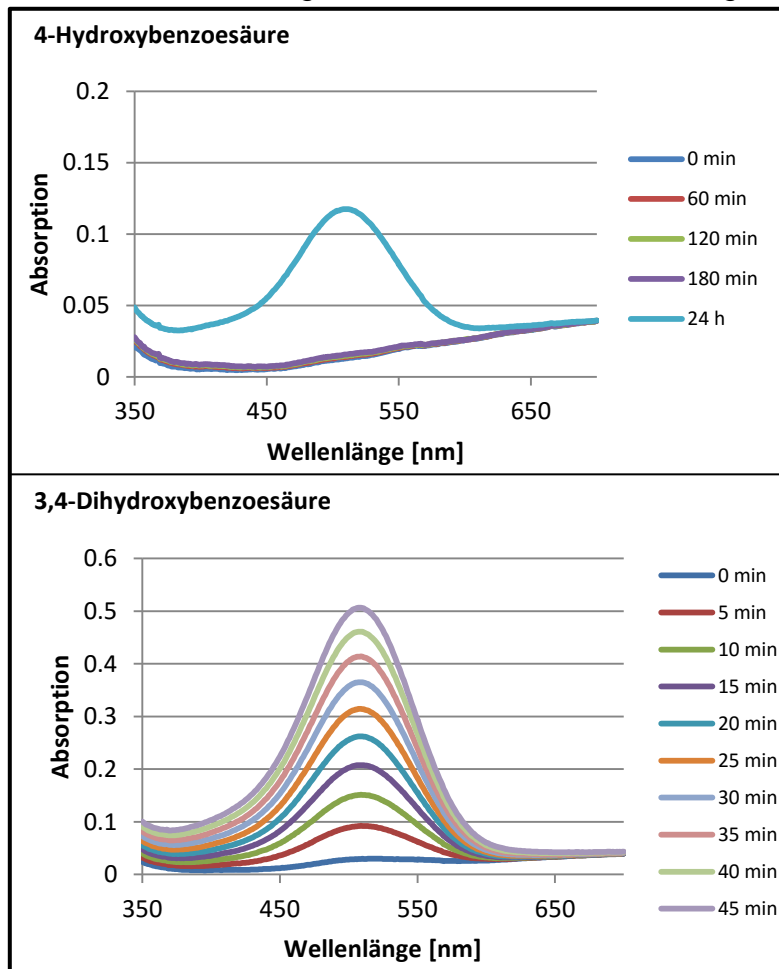


Abbildung 39: Produktspektrum von 4-Hydroxybenzoesäure und 3,4-Dihydroxybenzoesäure bei Katalyse mit Tyrosinase aus Rieslingtrauben

Dargestellt ist ein MBTH-Assay als Produktspektrum von 350 bis 700 nm. Die Substratkonzentration war 2,1 mM, die Aktivität der Tyrosinase betrug 8,1 U/ml. Weiterhin befand sich, mit einer Konzentration von 4,2 mM, MBTH im Ansatz. Puffer: Citratpuffer 0,1M, pH 5

Obwohl es sich bei 3,4-Dihydroxybenzoesäure um ein o-Diphenol handelt, konnte nach 120 min kein Umsatz festgestellt werden, wenn der o-Diphenolansatz mit der Tyrosinaseaktivität 1,62 U/ml verwendet wurde. Das in Abbildung 38 gezeigte Produktspektrum von 3,4-Dihydroxybenzoesäure wurde nach dem Monophenolansatz mit einer Tyrosinaseaktivität von 8,1 U/ml erstellt.

3.9.4.3 Vanillinsäure

Bei Vanillinsäure handelt es sich um die monomethylierte Form der 3,4-Dihydroxybenzoesäure, wobei hier die Hydroxylgruppe in Position 3 (in meta-Stellung zur Carboxylgruppe) methyliert wurde. Dies entspricht im chemischen

Aufbau dem Verhältnis von Kaffeesäure zur Ferulasäure. Im Gegensatz zur Ferulasäure jedoch lässt sich im Fall von Vanillinsäure ein zumindest schwacher Umsatz mit Tyrosinase aus Rieslingtrauben beobachten (siehe Abbildung 39).

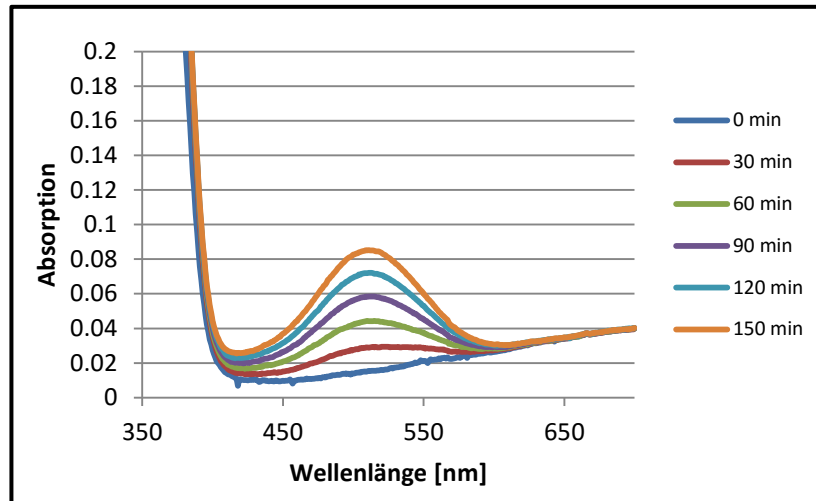


Abbildung 40: Produktspektrum von Vanillinsäure bei Katalyse mit Tyrosinase aus Rieslingtrauben

Dargestellt ist ein MBTH-Assay als Produktspektrum von 350 bis 700 nm. Die Substratkonzentration war 2,1 mM, die Aktivität der Tyrosinase betrug 8,1 U/ml. Weiterhin befand sich, mit einer Konzentration von 4,2 mM, MBTH im Ansatz. Puffer: Citratpuffer 0,1M, pH 5

3.9.4.4 Vergleich des Umsatzes von phenolischen Weininhaltsstoffen durch Tyrosinase aus Rieslingtrauben

Da die verschiedenen Oxidationsprodukte der phenolischen Substanzen auch unterschiedliche Extinktionskoeffizienten aufweisen ist ein quantitativer Vergleich der Katalyse durch Tyrosinase nicht möglich. Um jedoch eine Abschätzung treffen zu können wurde die Zeit herangezogen die benötigt wurde, um im jeweiligen Produktspektrum eine Absorption von 0,1 im Maximum zu erreichen. Hierbei ergab sich folgende Reihenfolge:

Kaftarsäure > Kaffeesäure >> 3,4-Dihydroxybenzoesäure > Resveratrol > Cumarsäure > Gallussäure, Phlorizin, Phloretin > Polydatin >> Vanillinsäure >> 4-Hydroxybenzoesäure > Ethylgallat.

3.9.5 Sauerstoffverbrauchsmessungen mit Tyrosinase aus *Agaricus bisporus*

Um den Umsatz der phenolischen Weininhaltsstoffe durch Tyrosinase quantifizieren zu können, wurde der Sauerstoffgehalt während deren Oxidation gemessen. Über den Sauerstoffverbrauch konnte der molekulare Umsatz der Tyrosinase berechnet werden. Verwendet wurde hierfür der NomaSense O₂ P300 Analyser. Das Messprinzip beruht auf dynamischem Quenching von Lumineszenz durch molekularen Sauerstoff [135]. Aufgrund des sehr hohen Enzymbedarfs wurde Tyrosinase aus *Agaricus bisporus* für die Messung genutzt. Abbildung 40 zeigt den Verlauf der Sauerstoffkonzentration während des Umsatzes eines phenolischen Weininhaltsstoffes am Beispiel der p-Cumarsäure. Hierbei

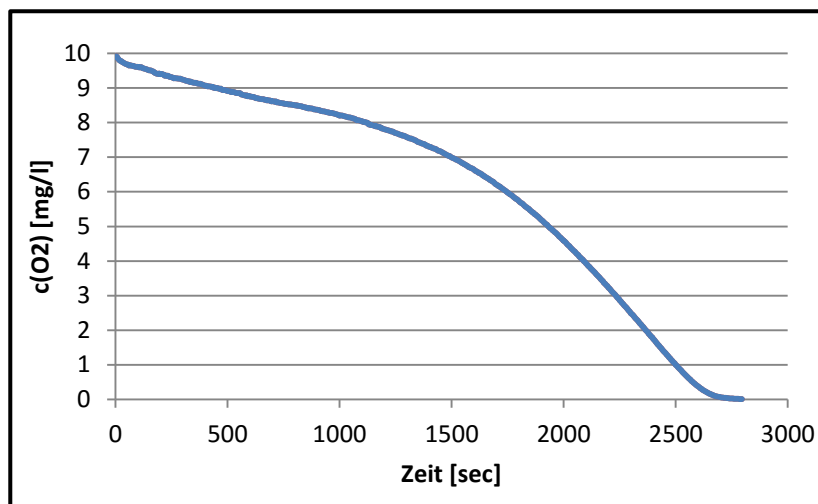


Abbildung 41: Sauerstoffverbrauch beim Umsatz von Cumarsäure durch Tyrosinase

Gezeigt ist der Rückgang der Sauerstoffkonzentration während des Umsatzes eines phenolischen Weininhaltsstoffes am Beispiel der Cumarsäure. Verwendet wurde Tyrosinase aus *Agaricus bisporus* (50,7 U/ml). Die Substratkonzentration betrug 5 mM. Gemessen wurde in Citratpuffer (0,1M, pH 5).

diente die steilste Steigung des Graphen zur Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs. Tabelle 6 zeigt den Vergleich des Umsatzes von phenolischen Weininhaltsstoffen anhand der Abnahme der Sauerstoffkonzentration in der Messlösung. Wie im Fall der Tyrosinase aus Rieslingtrauben sind auch hier die o-Diphenole Kaffee- und Kaftarsäure die Substrate, die mit Abstand am schnellsten umgesetzt werden. Ethylgallat wird im Vergleich zur Gallussäure von Tyrosinase aus *Agaricus bisporus* wesentlich schneller umgesetzt als von Tyrosinase aus Rieslingtrauben (vgl. Abbildung 37). Die Chalkone Phlorizin und Phlore-

tin sowie Resveratrol werden schneller umgesetzt als 3,4-Dihydroxybenzoesäure,

Tabelle 6: Sauerstoffverbrauchsmessung beim katalytischen Umsatz von phenolischen Weininhaltsstoffen durch Tyrosinase aus *Agaricus bisporus*

Gezeigt ist der Umsatz von phenolischen Weininhaltsstoffen anhand des Sauerstoffverbrauchs. Genutzt wurde Tyrosinase aus *Agaricus bisporus*. Die Substratkonzentration betrug jeweils 5 mM, die Enzymaktivität 50,7 U/ml (außer bei Kaffee- und Kaftarsäure, hier 5,07 U/ml Enzymaktivität und 0,5 mM Substratkonzentration). Gemessen wurde in Citratpuffer 0,1 M, pH 5 bei 20°C. O₂-Gehalt wurde alle 5 Sekunden bestimmt. Als Maß für den O₂-Verbrauch diente die größte Abnahme des O₂-Gehalts zwischen mindestens drei Messpunkten.

Substrat	$\Delta c(\text{O}_2)$ [mg/l*min]
Kaffeesäure	33,1
Kaftarsäure	21,2
Ethylgallat	12,0
Phloretin	3,52
Phlorizin	3,31
Resveratrol	3,24
3,4-Dihydroxybenzoesäure	1,99
Polydatin	1,14
Gallussäure	0,924
2,5-Dihydroxybenzoesäure	0,840
Vanillinsäure	0,714
Sinapinsäure	0,708
4-Hydroxybenzoesäure	0,630
p-Cumarsäure	0,457
Ferulasäure	0,444

obwohl es sich bei letzterem um ein o-Diphenol handelt. Wie im Fall der Tyrosinase aus Rieslingtrauben, wird 3,4-Dihydroxybenzoesäure für ein o-Diphenol sehr langsam umgesetzt. Ein Vergleich der pK_s Werte von 3,4-Dihydroxybenzoesäure (4,26) [170] und Kaffeesäure (4,62) [171] zeigt, dass die Säuregruppen beider Phenole bei den angewandten Messbedingungen mit pH 5 protoniert und somit ungeladen vorlagen. Eine Erniedrigung der Umsatzrate aufgrund unterschiedlicher Säurestärke kann somit ausgeschlossen werden. Eine weitere Erklärung für den niedrigen Umsatz der Hydroxybenzoesäuren im Vergleich zu den Hydroxycimtsäuren könnte eine allgemein erniedrigte Substratspezifität aufgrund des molekularen Aufbaus sein.

Glykosylierung der Phenole resultiert stets in einer Erniedrigung des Umsatzes, wie der Sauerstoffverbrauch der Paarungen Resveratrol/Polydatin und Phloretin/Phlorizin zeigt. Während der Unterschied zwischen Phloretin und Phlorizin, wie im Fall der Tyrosinase aus Rieslingtrauben (vgl. Abbildung 36), vernachlässigbar ist, wird Resveratrol mehr als doppelt so schnell wie Polydatin umgesetzt. Die Erklärung hierfür könnte eventuell die, aus sterischen Gründen bedingte, erniedrigte Substratspezifität sein.

3.10 Bestimmung des Temperaturoptimums der Rieslingtyrosinase

Für die Bestimmung des Temperaturoptimums der isolierten Tyrosinase wurden drei Substrate verwendet: Kaffeesäure, p-Cumarsäure und Dopamin.

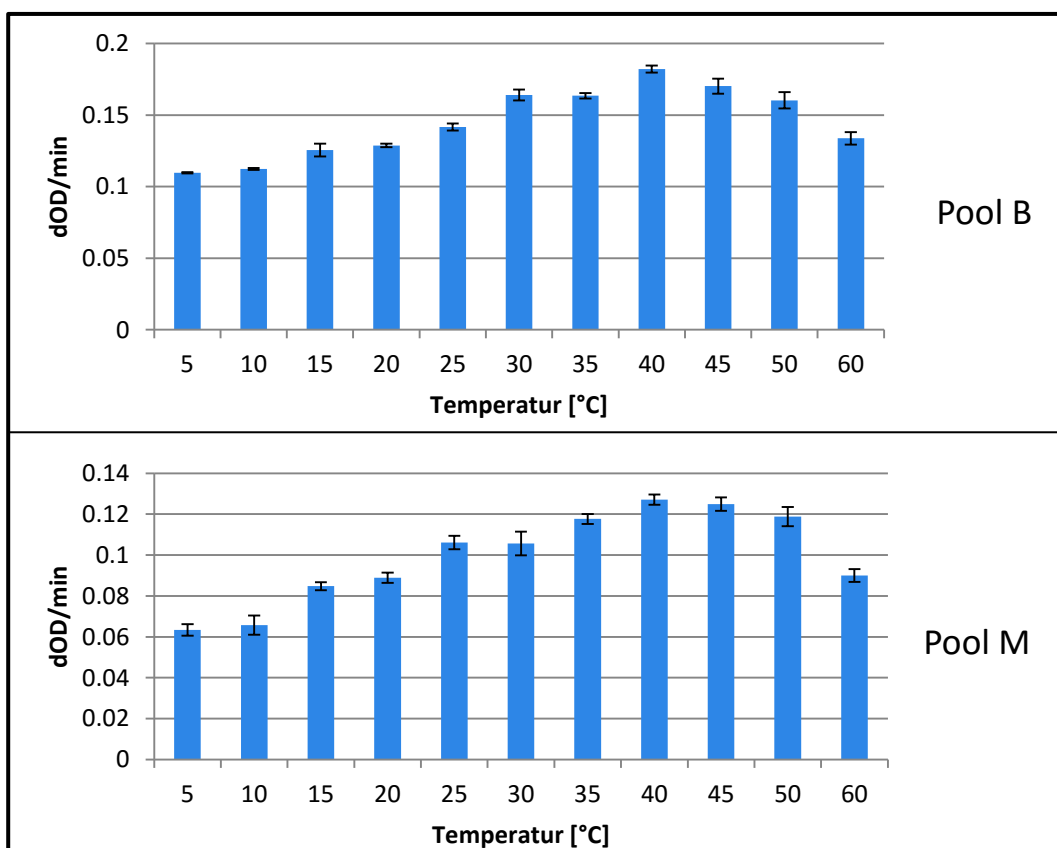


Abbildung 42: Bestimmung des Temperaturoptimums von Rieslingtyrosinase mit Kaffeesäure

Dargestellt ist die Aktivität der Tyrosinase des jeweiligen Pools bei Temperaturen von 5 bis 60°C. Es wurde die Absorptionsänderung bei 525 nm im *steady state* gemessen (Dreifachbestimmung). Verwendet wurde der Diphenolansatz des MBTH-Assays mit 2,1 mM Substrat, 4,2 mM MBTH und einer Tyrosinaseaktivität von 1,62 U/ml. Gemessen wurde in Citratpuffer 0,1 M, pH 5.

Verwendet wurde hierfür der MBTH-Assay, wobei der genutzte Citratpuffer keine Temperaturabhängigkeit bezüglich des pH Wertes aufweist. Der Versuch mit Kaffeesäure wurde sowohl mit Pool B als auch mit Pool M durchgeführt (siehe Abbildung 41). Es wurde jeweils ein Volumen von 2,5 µl Tyrosinase eingesetzt. Dies entspricht einer eingesetzten Aktivität von 2,41 U/ml für Pool B und 1,62 U/ml für Pool M.

In Abbildung 41 ist zu erkennen, dass die Tyrosinase aus Rieslingtrauben mit Kaffeesäure als Substrat in einem sehr breiten Temperaturspektrum arbeitet. Die höchste Aktivität wird zwischen Temperaturen von 25 – 50°C erreicht. Allerdings erreicht die Tyrosinase selbst bei 5°C noch eine Aktivität, die etwa 50% des Maximums entspricht. Der Vergleich der beiden Pools zueinander zeigt, dass sich die Ergebnisse reproduzieren lassen, auch wenn die Enzyme in Pool B und M nicht aus ein und derselben Aufreinigung stammen. Die geringere Reinheit von Pool M resultierte in einer geringeren Aktivität insgesamt (vgl. 3.6), hatte jedoch keinen Einfluss auf die relative Veränderung der Aktivitäten bei verschiedenen Temperaturen.

Abbildung 42 zeigt die Bestimmung des Temperaturoptimums der Rieslingtyrosinase mit Dopamin als Substrat. Auch hier zeigt die Tyrosinase, dass sie über

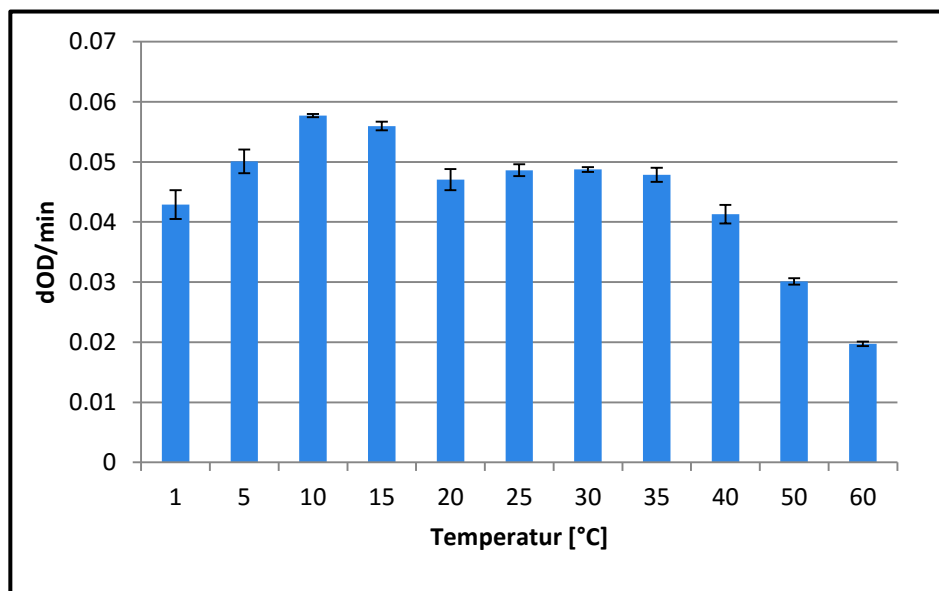


Abbildung 43: Bestimmung des Temperaturoptimums von Rieslingtyrosinase mit Dopamin

Dargestellt ist die Aktivität der Tyrosinase bei Temperaturen von 1 bis 60°C. Es wurde die Absorptionsänderung bei 505 nm im steady state gemessen (Dreifachbestimmung). Verwendet wurde der Diphenolansatz des MBTH-Assays mit 2,1 mM Substrat, 4,2 mM MBTH und einer Tyrosinaseaktivität von 1,62 U/ml. Gemessen wurde in Citratpuffer 0,1 M, pH 5.

ein breites Temperaturspektrum hinweg aktiv ist. Im Gegensatz zur Kaffeesäure wird Dopamin jedoch am besten bei geringeren Temperaturen umgesetzt. Das Temperaturoptimum liegt hier bei 10 -15°C. Allerdings ist die Aktivität der Tyrosinase bis 35°C nur unwesentlich geringer. Erst bei Temperaturen über 35°C kommt es zu einer deutlichen Abnahme der Aktivität.

In Abbildung 43 wurde das Temperaturoptimum mit dem Monophenol p-Cumarsäure bestimmt. Aufgrund des fünffach höheren Bedarfs an Tyrosinase beim Umsatz mit Monophenolen im MBTH-Assay sowie der geringen Fehler der vorherigen Messungen wurde hier auf eine Dreifachbestimmung verzichtet. Beim Umsatz des Monophenols zeigt die Tyrosinase wesentlich geringere Aktivitäten bei niedrigen Temperaturen im Vergleich zu den Diphenolen. Es ist ein klares Temperaturoptimum bei 35°C zu erkennen.

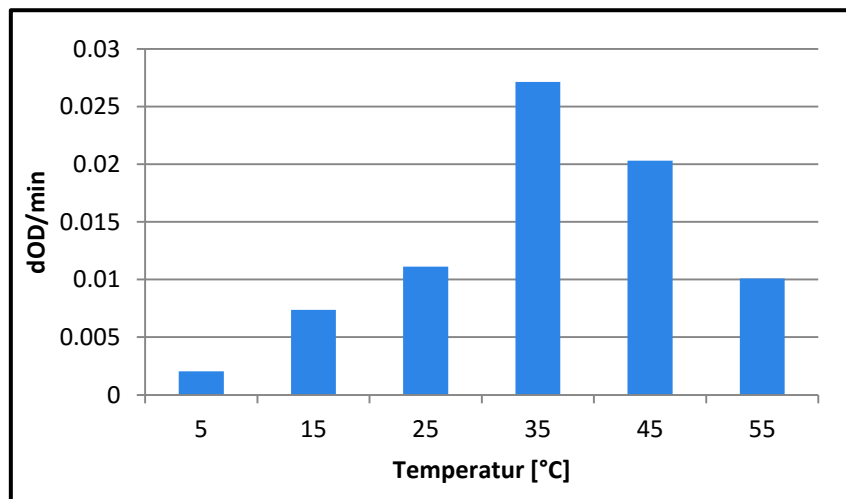


Abbildung 44: Bestimmung des Temperaturoptimums von Rieslingtyrosinase mit Cumarsäure

Dargestellt ist die Aktivität der Tyrosinase bei Temperaturen von 5 bis 55°C. Es wurde die Absorptionsänderung bei 505 nm im steady state gemessen (Einfachbestimmung). Verwendet wurde der Monophenolanatz des MBTH-Assays mit 2,1 mM Substrat, 4,2 mM MBTH und einer Tyrosinaseaktivität von 8,1 U/ml. Gemessen wurde in Citratpuffer 0,1 M, pH 5.

Insgesamt betrachtet zeigt die Rieslingtyrosinase stark substratabhängige Temperaturoptima. Bei Diphenolen arbeitet die Tyrosinase über ein sehr breites Temperaturspektrum. Hierbei nimmt die Aktivität im Vergleich zum Temperaturoptimum zu höheren und niedrigeren Temperaturen nur geringfügig ab. Dies ist mit dem getesteten Monophenol nicht der Fall. Hier kommt es zu einem stärkeren Abfall der Aktivität bei vom Optimum abweichenden Temperaturen.

3.11 Einfluss von Wein und Tyrosinase auf die antioxidative Kapazität von Zellkulturen

Um die gesundheitsfördernde Eigenschaft von Wein bezüglich seiner antioxidativen Wirkung zu untersuchen, wurde diese mit Hilfe des L-012 Assays bestimmt. Dabei wurde Wein auf zwei verschiedene menschliche Zelllinien (THP1 und EA.hy 926) gegeben und deren Gehalt an ROS ermittelt.

Bei THP1 Zellen handelt es sich um humane Monozyten, die durch die Aufnahme von oxidiertem LDL zu Schaumzellen werden können, welche an der Entstehung von Arteriosklerose beteiligt sind (vgl. 1.2.3). EA.hy 926 sind humane venöse Epithelzellen. Während der Genese von Arteriosklerose docken Schaumzellen an Epithelzellen der Blutgefäße an. Aufgrund der Beteiligung von Monozyten und Epithelzellen der Blutgefäße an den Prozessen der Arteriosklerose wurden diese beiden Zelllinien für die folgenden Untersuchungen ausgewählt.

Die ROS-Konzentration der Zellen wird durch den Zusatz von Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) für THP1 Zellen bzw. 2,3-dimethoxy-1,4-naphtaquinon (DMNQ) für EA.hy 926 Zellen künstlich erhöht. Die zugesetzte Substanz Luminol reagiert hierbei mit den ROS unter Freisetzung von Licht, welches detektiert wird. Je höher also das gemessene Signal, desto höher ist die Konzentration an ROS in der Zelle. Werden ROS jedoch durch antioxidativ wirkende Substanzen reduziert, können sie nicht mehr mit Luminol reagieren und das gemessene Signal ist schwächer. Tyrosinase aus *Agaricus bisporus* wurde dem Wein in verschiedenen Konzentrationen zugegeben, um den Einfluss der Tyrosinase auf die antioxidative Kapazität zu untersuchen. Als Kontrolle diente der Wein ohne Zugabe von Tyrosinase. Der L-012 Assay wurde von der Arbeitsgruppe Li der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt. Abbildung 44 zeigt den Einfluss von Wein sowie Wein mit zugesetzter Tyrosinase auf die antioxidative Kapazität von menschlichen THP1 Zellen. Verwendet wurde ein Merlot des Jahres 2011 des Weingutes Gres in Appenheim.

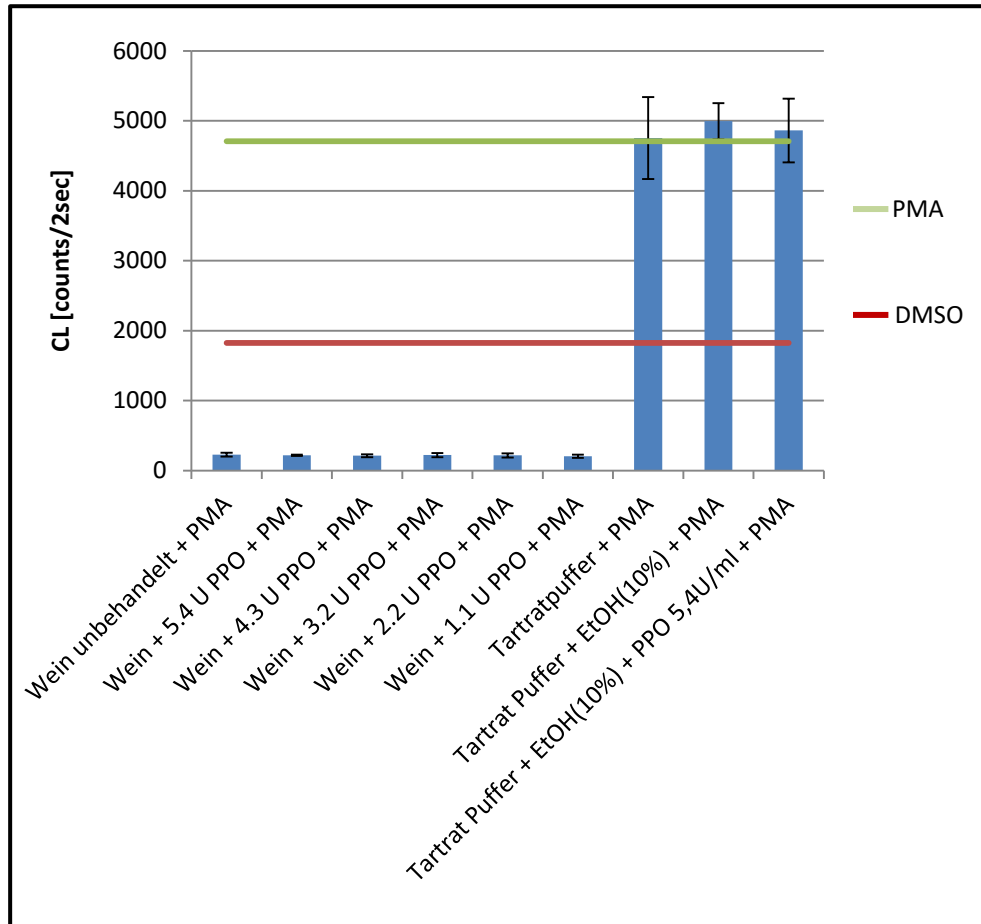


Abbildung 45: Einfluss von Rotwein und Tyrosinase auf die antioxidative Kapazität von THP1 Zellen

Gezeigt ist die antioxidative Wirkung von Rotwein (Merlot, 2011, Weingut Gres, Appenheim) sowie dem Wein zugesetzte Tyrosinase aus *Agaricus bisporus*. Um die Bildung von ROS zu stimulieren, wurde den Zellen PMA zugesetzt. Die ROS reagieren mit L-012 unter Aussendung von Licht (Chemilumineszenz = CL), welches detektiert wird. Die PMA-Linie repräsentiert die maximale ROS-Produktion der stimulierten Zellen. Die DMSO-Linie stellt das ROS-Signal ohne Stimulierung dar. Gezeigt sind die CL-Werte nach 120 min Inkubation.

Es ist deutlich zu erkennen, dass Wein das ROS-Signal fast vollständig unterdrückt, was für eine sehr starke antioxidative Wirkung spricht. Der Zusatz von Tyrosinase hat keinen Einfluss auf die antioxidative Wirkung von Wein. Außerdem wurde ein „weihnähnlicher“ Puffer aus Tartrat und Malat getestet. Weder die häufig im Wein vorkommenden Salze der Wein- und Äpfelsäure noch zugesetztes Ethanol hatten einen Einfluss auf die antioxidative Kapazität von THP1 Zellen. Auch dem Puffer zugesetzte Tyrosinase aus *Agaricus bisporus* zeigte diesbezüglich keine Wirkung. Abbildung 45 zeigt den gleichen Versuchsansatz mit menschlichen EA.hy 926 Zellen. Hier zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei THP1 Zellen. Unbehandelter Wein hat auch hier eine sehr große antioxidative Wirkung auf die Zellen. Ein Zusatz von Tyrosinase macht hier ebenfalls keinen Un-

terschied. Allerdings zeigt bei EA.hy 926 Zellen der Puffer schon eine antioxidative Wirkung, die jedoch weit unter der des Weins liegt.

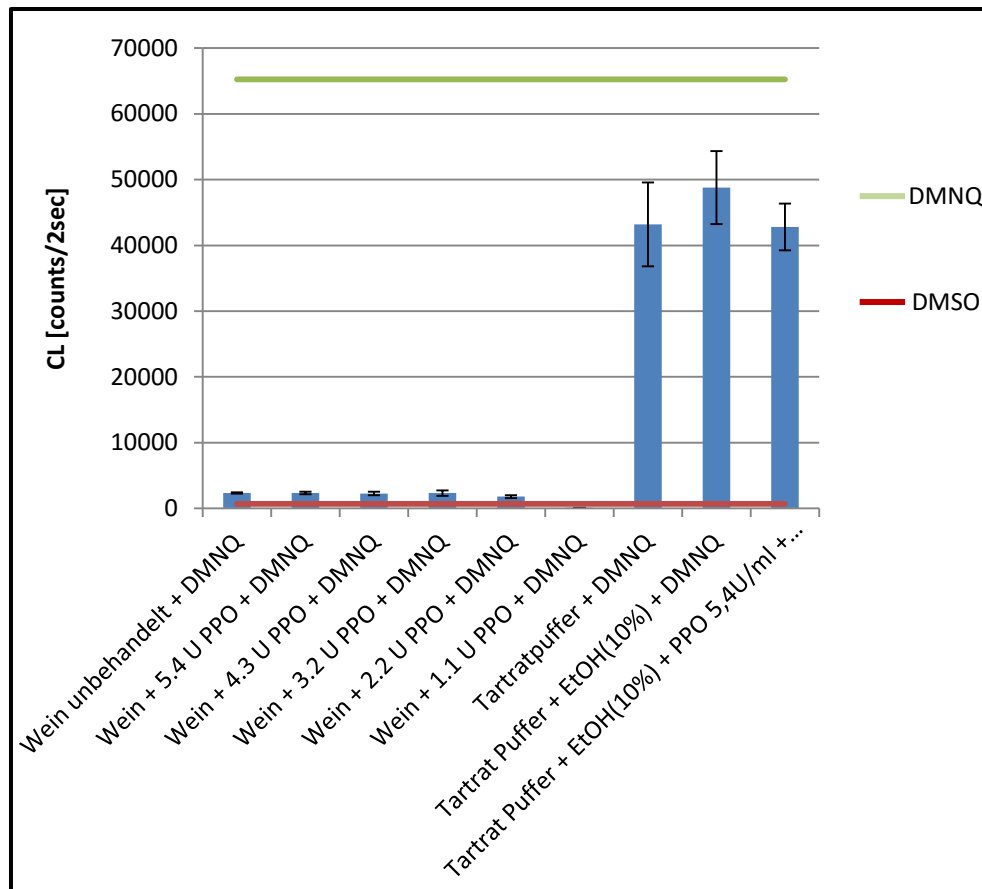


Abbildung 46: Einfluss von Rotwein und Tyrosinase auf die antioxidative Kapazität von EA.hy 926 Zellen

Gezeigt ist die antioxidative Wirkung von Rotwein (Merlot, 2011, Weingut Gres, Appenheim) sowie dem Wein zugesetzte Tyrosinase aus *Agaricus bisporus*. Um die Bildung von ROS zu stimulieren, wurde den Zellen DMNQ zugesetzt. Die ROS reagieren mit L-012 unter Aussendung von Licht (Chemilumineszenz = CL), welches detektiert wird. Die DMNQ-Linie repräsentiert die maximale ROS-Produktion der stimulierten Zellen. Die DMSO-Linie stellt das ROS-Signal ohne Stimulierung dar. Gezeigt sind die CL-Werte nach 120 min Inkubation.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der untersuchte Wein auf beide Zelllinien eine starke antioxidative Wirkung zeigt. Diese entstammt zumindest bei EA.hy 926 Zellen nur in einem geringen Anteil den Salzen der Wein- und Äpfelsäure. In THP1 Zellen zeigen diese keine Wirkung. Auch der Zusatz von Tyrosinase hat keinen Einfluss auf die antioxidative Kapazität. Die antioxidative Wirkung von Wein scheint somit fast ausschließlich von anderen Weinhaltstoffen auszugehen, wobei in den folgenden Kapiteln im Besonderen die Rolle der phenolischen Weinhaltstoffe untersucht wird.

3.12 Einfluss von Tyrosinase aus *Agaricus bisporus* auf die antioxidative Wirkung von phenolischen Weinhaltstoffen

Neben der Untersuchung der antioxidativen Wirkung einzelner phenolischer Weinhaltstoffen war auch die Bestimmung der antioxidativen Wirkung der entsprechenden Tyrosinaseoxidationsprodukte ein Ziel dieser Arbeit. Für diesen Zweck wurden in Vorversuchen sieben Substrate über Nacht mit Tyrosinase aus *Agaricus bisporus* umgesetzt und deren antioxidative Wirkung in zwei Testsystemen überprüft. Um die Scavenger-Aktivität der Substrate sowie deren Oxidationsprodukte zu bestimmen, wurde ein DPPH-Test durchgeführt. Der Einfluss der Substrate auf den Oxidationszustand menschlicher Zellen wurde mit dem L-012 Test erfasst.

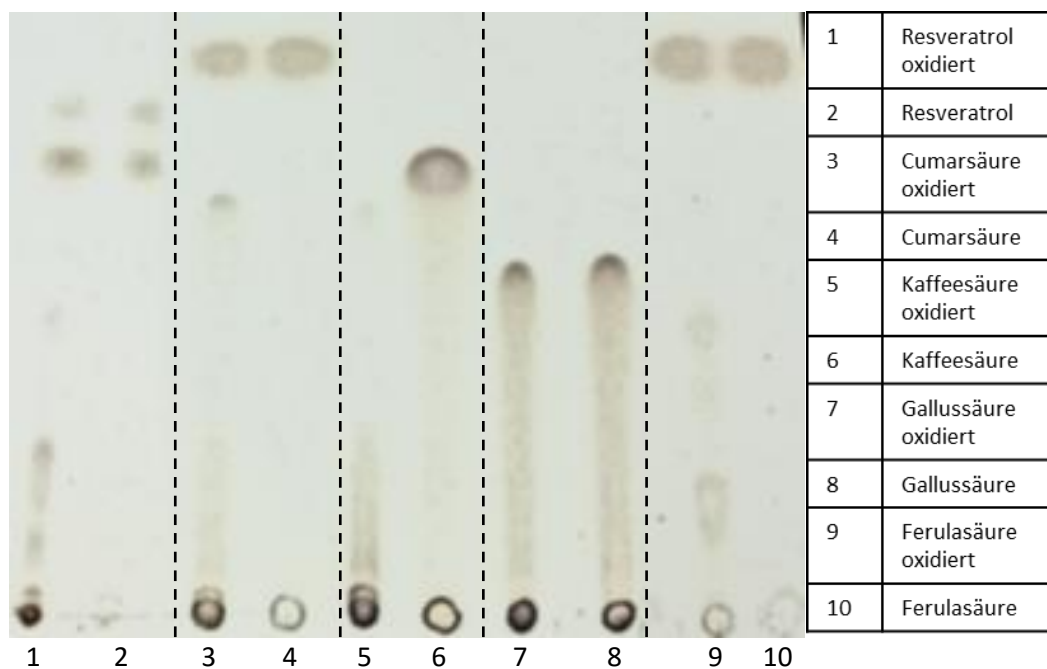


Abbildung 47: DC von phenolischen Weinhaltstoffen sowie deren Tyrosinaseoxidationsprodukten

Gezeigt ist eine DC von Substraten der Traubentyrosinase sowie deren Oxidationsprodukte, umgesetzt durch Tyrosinase aus *Agaricus bisporus*. Die Substratkonzentration während der Oxidation war 5 mM, die Aktivität der Tyrosinase betrug 50,7 U/ml (Citratpuffer 0,1 M, pH 5 bei Raumtemperatur). Die Inkubationszeit war 24 h. Das Laufmittel setzte sich aus Hexan, Essigester und Essigsäure im Verhältnis 1:1:0,05 zusammen. Als Färbemittel diente Iod.

Abbildung 46 zeigt eine DC ausgewählter Substrate sowie deren Tyrosinaseoxidationsprodukte. Substrat- und Enzymkonzentration sowie Inkubationsdauer entsprachen denen der DPPH und L-012 Versuche. In Abbildung 46 ist zu erkennen, dass mit Ausnahme der Kaffeesäure, stets noch Edukt in den oxi-

dierten Probeansätzen enthalten gewesen ist. Da es nicht möglich war, die Edukte vor Durchführung des DPPH-Tests und des L-012 Assays abzutrennen, musste dies in der Auswertung berücksichtigt werden. Der Trend zu erhöhter oder erniedrigter antioxidativer Kapazität der Oxidationsprodukte wird jedoch nicht durch die Edukte beeinflusst. Weiterhin ist zu erkennen, dass die Oxidation durch Tyrosinase zu einer Vielzahl von Produkten führt. Dies ist besonders im Fall von Resveratrol und Ferulasäure zu erkennen. Erklären lässt sich die hohe Zahl an verschiedenen Produkten durch autokatalytische Reaktionen der Chinone, die durch den Tyrosinaseumsatz entstehen. Deutlich erkennbar ist, dass Kaffeesäure und das entsprechende Monophenol p-Cumarsäure die gleichen Oxidationsprodukte bilden.

Abbildung 47 zeigt die Ergebnisse des DPPH-Tests mit den Substraten Resveratrol, Polydatin, Kaffeesäure, p-Cumarsäure, Ferulasäure, Gallussäure und Phlorizin.

Neben der Scavenger-Aktivität wurden außerdem der Effekt der phenolischen Weininhaltsstoffe sowie deren Tyrosinaseoxidationsprodukte auf den ROS-Gehalt von Zellkulturen untersucht. Hierbei wurden die Zellen mit den Weininhaltsstoffen inkubiert und anschließend die Superoxidproduktion der Zellen angeregt. Der Gehalt an Superoxid wurde über die Reaktion mit L-012, bei der

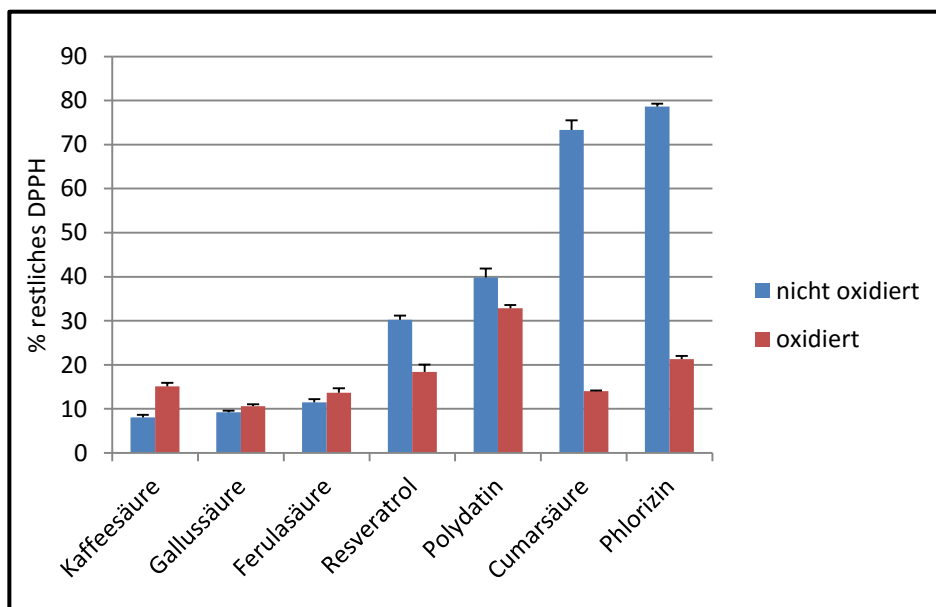


Abbildung 48: Einfluss von Tyrosinase aus *Agaricus bisporus* auf Scavenger-Aktivität phenolischer Weininhaltsstoffe

Die Absorption des gefärbten DPPH Radikals bei 515 nm verringert sich bei Reduktion durch Antioxidantien. Dargestellt ist die auf Absorption beruhende Konzentration von reduziertem DPPH nach 30 min Inkubation mit den Phenolen. Blau ist die Scavenger-Aktivität der Phenole, rot ist diese nach 24-stündiger Inkubation mit Tyrosinase.

Licht in Form von Chemilumineszenz freigesetzt wird, bestimmt. Je niedriger das gemessene Signal, desto geringer war die Superoxidkonzentration in der Zelle. Abbildungen 48 und 49 zeigen den Einfluss von Oxidation phenolischer Weinhaltstoffe durch Tyrosinase aus *Agaricus bisporus* auf THP1 und EA.hy 926 Zellen. Im Folgenden werden die phenolischen Weinhaltstoffe einzeln in ihrer Scavenger-Aktivität und Einfluss auf den oxidativen Zustand von Zellkulturen betrachtet.

3.12.1 Kaffeesäure

Kaffeesäure, eine o-diphenolische Hydroxyzimtsäure, zeigt vor Oxidation durch Tyrosinase mit die stärkste Scavenger-Aktivität der in dieser Versuchsreihe getesteten Substanzen (siehe Abbildung 47). Der Grund hierfür ist in der chemischen Struktur der Kaffeesäure zu finden. Den größten Einfluss haben hier die benachbarten aromatischen Hydroxylgruppen, die einen HAT-Mechanismus begünstigen. Das durch den H-Atom-Transfer entstehende Phenoxyradikal wird durch die benachbarte Hydroxylgruppe mittels Wasserstoffbrücke stabilisiert. Zusätzlich liefert die Hydroxylgruppe zusammen mit der Acrylsäuregruppe

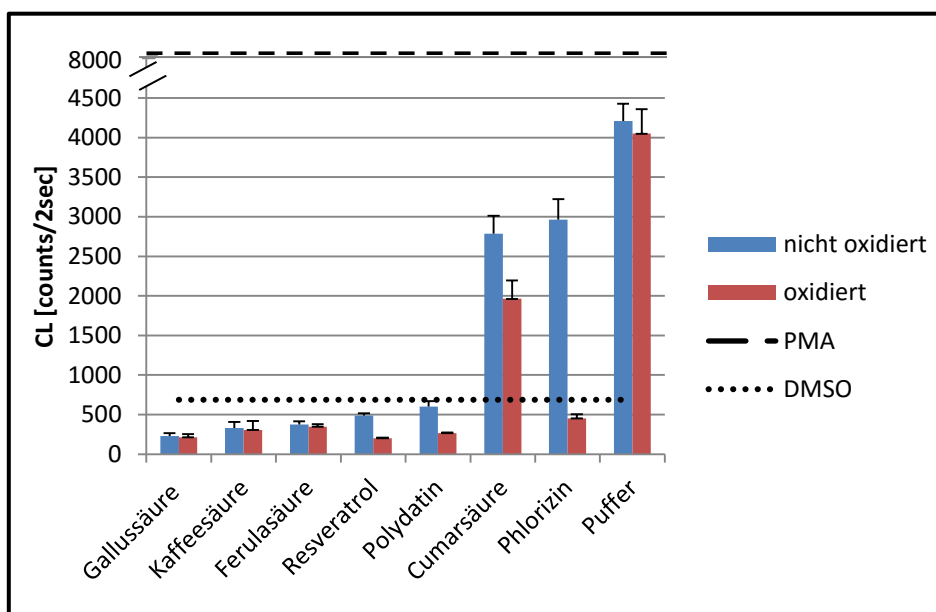


Abbildung 49: Antioxidative Kapazität von phenolischen Weinhaltstoffen sowie deren Tyrosinaseoxidationsprodukte in THP1 Zellen

Um die Bildung von ROS zu stimulieren, wurde den Zellen PMA zugesetzt. Die ROS reagieren mit L-012 unter Aussendung von Licht (Chemilumineszenz = CL), welches detektiert wird. Die PMA-Linie repräsentiert die maximale ROS-Produktion der stimulierten Zellen. Die DMSO-Linie stellt das ROS-Signal ohne Stimulierung dar. Gezeigt sind die CL-Werte nach 120 min Inkubation. Verwendet wurde 50,7 U/ml Tyrosinase aus *Agaricus bisporus*. Puffer: Citratpuffer (0,1 M, pH 5) ohne phenolische Weinhaltstoffe.

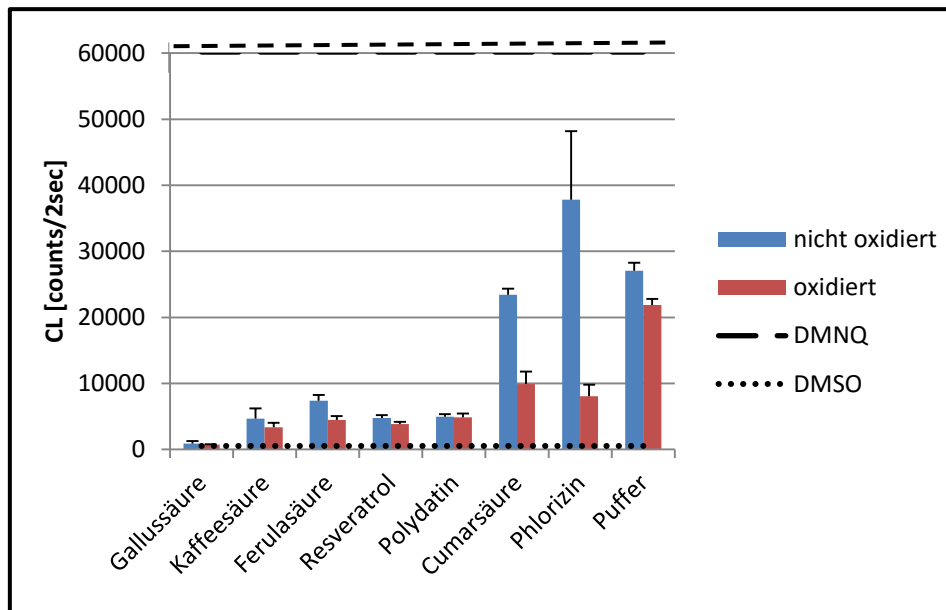


Abbildung 50: Antioxidative Kapazität von phenolischen Weininhaltsstoffen sowie deren Tyrosinaseoxidationsprodukte in EA.hy 926 Zellen

Um die Bildung von ROS zu stimulieren, wurde den Zellen DMNQ zugesetzt. Die ROS reagieren mit L-012 unter Aussendung von Licht (Chemilumineszenz = CL), welches detektiert wird. Die DMNQ-Linie repräsentiert die maximale ROS-Produktion der stimulierten Zellen. Die DMSO-Linie stellt das ROS-Signal ohne Stimulierung dar. Gezeigt sind die CL-Werte nach 120 min Inkubation. Verwendet wurde 50,7 U/ml Tyrosinase aus *Agaricus bisporus*. Puffer: Citratpuffer (0,1 M, pH 5) ohne phenolische Weininhaltsstoffe.

einen positiven mesomeren Effekt (+M-Effekt), der die Elektronendichte im Ringsystem erhöht und somit einerseits die O-H Bindung schwächt, was in einer erleichterten Abspaltung resultiert, zum anderen wird hierdurch das Phenoxyradikal weiter stabilisiert. Der H-Atom Transfer findet mit erhöhter Wahrscheinlichkeit an der 4-OH Gruppe (p-Position) statt, da in diesem Fall das entstehende Radikal über die Acrylsäuregruppe delokalisiert werden kann. Dies wäre für eine Radikalisierung an der 3-OH (m-Position) Gruppe nicht der Fall. Die Scavenger-Aktivität der Kaffeesäure wird erniedrigt, wenn sie mit Tyrosinase umgesetzt wurde. Allerdings ist dieser Rückgang nur sehr schwach ausgeprägt, obwohl die Kaffeesäure komplett von der Tyrosinase umgesetzt wurde (siehe Abbildung 46). Kaffeesäure wirkt auch in der Zellkultur sehr stark antioxidativ, wobei der Effekt in THP1 Zellen stärker ausgeprägt ist. In beiden Zelllinien lassen sich, im Rahmen der Fehler, keine Unterschiede der antioxidativen Wirkung von Kaffeesäure und ihrer Oxidationsprodukte feststellen. Dies bedeutet, dass die Tyrosinaseoxidationsprodukte der Kaffeesäure bzw. die durch weitere Autooxidation entstandenen Produkte zum einen bioverfügbar bleiben und zum anderen ebenfalls sehr starke Antioxidantien sind.

3.12.2 Gallussäure

Die Scavenger-Aktivität der Gallussäure ist, im Rahmen der Fehler, vergleichbar mit der Scavenger-Aktivität der Kaffeesäure (siehe Abbildung 47). Zwar verfügt die Gallussäure über insgesamt drei benachbarte aromatische Hydroxylgruppen, jedoch sorgt die Carboxylgruppe für einen negativen mesomeren Effekt (-M-Effekt), der über *push-pull* Effekte zwar ebenfalls zur Stabilisierung des Radikals beiträgt, jedoch nicht so einen großen Einfluss wie die Acrylsäuregruppe der Hydroxyzimtsäuren aufzuweisen scheint. Gallussäure wird von der Tyrosinase nur schwach umgesetzt (siehe Abbildungen 37 und 46 sowie Tabelle 6). Dies ist mit Sicherheit ein Hauptgrund für den geringen Unterschied der Scavenger-Aktivität von Gallussäure und ihrer Oxidationsprodukte. Ein weiterer Grund könnte aber, wie im Fall der Kaffeesäure, darin liegen, dass die Oxidationsprodukte ähnlich antioxidativ wirken wie ihr Edukt. Dafür spricht auch die Anordnung der Hydroxylgruppen zueinander. Eine Oxidation aller drei Hydroxylgruppen unter Erhalt der Ringstruktur ist im Rahmen der bekannten Reaktionsmechanismen der Tyrosinase, nicht möglich [41, 43, 44, 107]. Somit verbleibt zumindest eine Hydroxylgruppe stets intakt, die im Rahmen ihrer Aromatizität zur antioxidativen Wirkung beitragen kann. Um jedoch einen klaren Trend der Oxidationsprodukte bezüglich ihrer antioxidativen Kapazität erkennen zu können, müsste das Edukt von den Produkten getrennt werden. In beiden verwendeten Zelllinien zeigt Gallussäure die stärkste antioxidative Wirkung aller getesteten Phenole. Auch hier lassen sich keine Unterschiede zwischen Edukten und Tyrosinaseoxidationsprodukten ausmachen.

3.12.3 Ferulasäure

Ferulasäure unterscheidet sich von Kaffeesäure nur durch eine methylierte 3-OH Gruppe (m-Position). In der Theorie müsste dies die Scavenger-Aktivität erniedrigen, da nur eine OH-Gruppe radikalisiert werden kann. Allerdings ist wie bereits unter 3.10.1 erwähnt, die Wahrscheinlichkeit, dass die 4-OH Gruppe ihr H-Atom transferiert höher einzuschätzen. Diese liegt auch in der Ferulasäure frei vor und kann somit antioxidativ wirken. Der DPPH-Test bestätigt dies (siehe Abbildung 47), da hier die Ferulasäure nur eine minimal geringere Scavenger-Aktivität aufweist. Allerdings kann durch die Methylierung der 3-OH Gruppe kei-

ne Wasserstoffbrücke mehr ausgebildet werden, die das Phenoxyradikal stabilisieren könnte. Zudem ist der +M-Effekt einer Methoxygruppe geringer als der einer Hydroxylgruppe. Ferulasäure sollte also eigentlich eine deutlicher abgeschwächte Scavenger-Aktivität zeigen. Betrachtet man die Reaktion von DPPH mit Kaffee- und Ferulasäure über die Zeit, so wird deutlich, dass Kaffeesäure sofort sämtliches DPPH reduziert, wohingegen Ferulasäure hierfür mehr Zeit benötigt (siehe Abbildung 50). Auch in THP1 Zellen zeigt Ferulasäure eine ähnlich starke antioxidative Wirkung wie Gallus- und Kaffeesäure. In EA.hy 926 Zellen ist die antioxidative Kapazität der Ferulasäure etwas schwächer ausgeprägt.

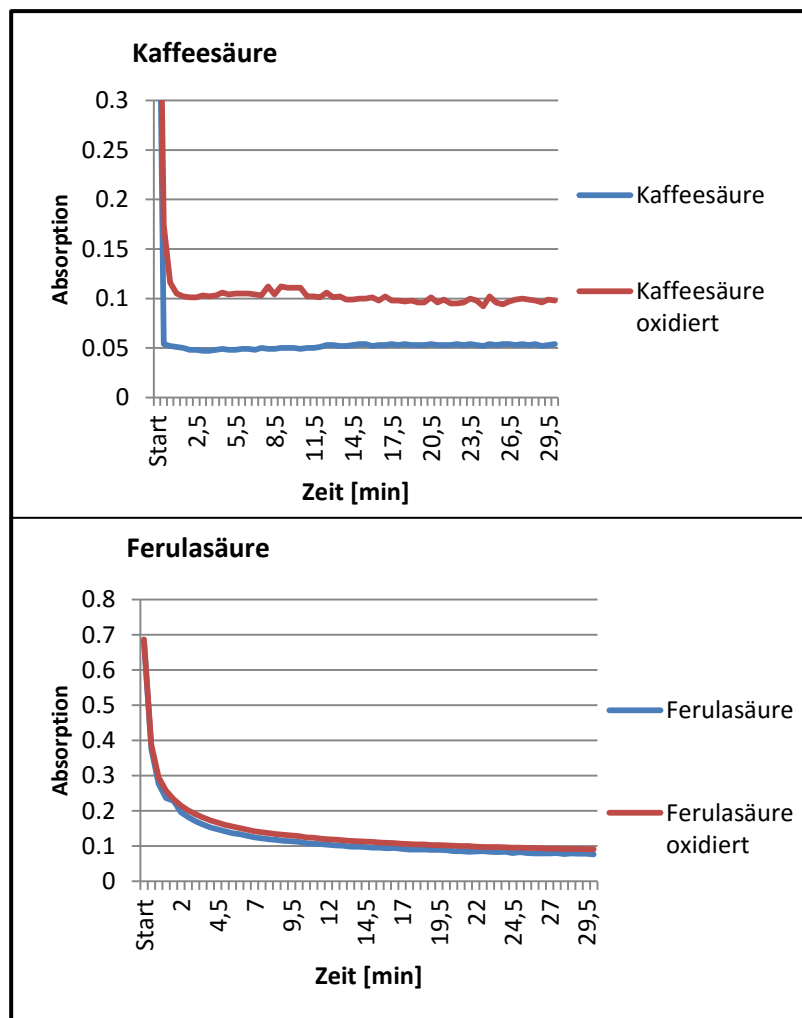


Abbildung 51: Vergleich der Reduktion von DPPH von Kaffee- und Ferulasäure über die Zeit

Dargestellt ist die Reduktion des DPPH Radikals über 30 min. Gemessen wurde die Asorption des DPPH Radikals bei 515 nm

3.12.4 Resveratrol und Polydatin

Resveratrol und sein 3-O-Glykosid Polydatin verfügen über keine benachbarten aromatischen Hydroxylgruppen. Weiterhin zeichnet beide ein großes delokalisiertes π -System aus, welches das Ionisierungspotential der OH-Gruppen senkt. Diese beiden Faktoren sprechen dafür, dass Resveratrol und Polydatin nach dem SET Mechanismus oxidiert werden. Resveratrol zeigt im Vergleich zur Kaffee- oder Gallussäure eine deutlich schwächere Scavenger-Aktivität, obwohl diese immer noch ausgeprägt ist (siehe Abbildung 47). Auch wenn Polydatin eine Hydroxylgruppe weniger zur Verfügung hat, ist dessen Scavenger-Aktivität nur geringfügig weniger stark ausgeprägt als die von Resveratrol. Der Grund hierfür liegt darin, dass Polydatin in Position 3, die sich in m-Position zur Vinylgruppe befindet, glykosyliert ist. Das stabilste Radikal entsteht jedoch durch SET der 4'-OH Gruppe [103]. In diesem Fall kann das Ar-OH^{•+} Radikal über das gesamte π -System delokalisiert werden. Die Tyrosinaseoxidationsprodukte beider Stilbene weisen eine höhere Scavenger-Aktivität als ihre Edukte auf. Der Unterschied fällt diesbezüglich bei Resveratrol größer aus als bei Polydatin. Da Resveratrol von der Tyrosinase über Nacht nicht komplett umgesetzt wurde (siehe Abbildung 46), ist der Unterschied in der Scavenger-Aktivität wahrscheinlich noch größer. In THP1 Zellen gehört Resveratrol zu den am stärksten wirkenden Phenolen und zeigt eine ähnliche Wirkung wie Kaffee- und Ferulasäure. In EA.hy 926 Zellen wirkt Resveratrol sogar stärker als die beiden Hydroxyzimtsäuren. Die Oxidationsprodukte von Resveratrol zeigen nur in THP1 Zellen eine stärkere Wirkung als ihr Edukt, in EA.hy 926 Zellen ist kein Unterschied zu erkennen. Polydatin wirkt in THP1 Zellen fast so stark wie Resveratrol und gleich stark in EA.hy 926 Zellen. Auch hier wirken die Tyrosinaseoxidationsprodukte in THP1 Zellen etwas stärker, aber es kann kein Unterschied in EA.hy 926 Zellen erkannt werden.

3.12.5 p-Cumarsäure

Cumarsäure ist das Monophenol der Kaffeesäure. Da sie über nur eine aromatische Hydroxylgruppe verfügt, ist ihre Scavenger-Aktivität nur sehr schwach ausgeprägt. Zudem kann das durch Oxidation entstehende Phenoxyradikal nicht über intramolekulare Wasserstoffbrücken stabilisiert werden. Dank der

Fähigkeit der Tyrosinase o-Chinone aus Monophenolen zu bilden entstehen beim Umsatz der p-Cumarsäure die gleichen Oxidationsprodukte wie im Fall der Kaffeesäure (vgl. Abbildung 46). Aus diesem Grund ist ein sehr großer Unterschied zwischen p-Cumarsäure und ihrer Tyrosinaseoxidationsprodukten im DPPH-Test zu erkennen. Aus dem allenfalls milden Radikalscavenger p-Cumarsäure entstehen Produkte die ähnlich stark wirken wie Kaffee-, Gallus- und Ferulasäure. In der Zellkultur ist der Unterschied der antioxidativen Wirkung zwischen p-Cumarsäure und ihrer Oxidationsprodukte nicht ganz so deutlich ausgeprägt. In THP1 Zellen erreichen die Oxidationsprodukte nicht annähernd das antioxidative Niveau von Kaffee-, Gallus- und Ferulasäure, wohingegen es in EA.hy 926 Zellen fast erreicht wird. Das die Oxidationsprodukte in der Zellkultur nicht die gleiche Wirkung wie die der Kaffeesäure zeigen, kann nur durch den geringeren Umsatz der Tyrosinase (vgl. Abbildung 46) und der daraus resultierenden geringeren Konzentration der Oxidationsprodukte erklärt werden. Warum sich dieses Bild nicht auch beim DPPH-Test zeigt, kann nicht eindeutig geklärt werden. Wahrscheinlich würde sich beim DPPH-Test ein ähnliches Bild abzeichnen, wenn geringere Substratkonzentrationen verwendet worden wären, denn ein Vergleich der DPPH-Reduktion über die Zeit zeigt, dass die Oxidationsprodukte der Kaffeesäure DPPH sofort reduzieren, während die der p-Cumarsäure länger benötigen (siehe Abbildung 51). Da es sich theoretisch um die gleichen Oxidationsprodukte handelt, kann es nur an deren geringeren Konzentration liegen.

3.12.6 Phlorizin

Das Chalkon Phlorizin verfügt über keine benachbarten Hydroxylgruppen. Im Gegensatz zu den Stilbenen besitzt Phlorizin auch kein sich über das gesamte Molekül erstreckende delokalisierte π -System. Dies erklärt die nur schwache Scavenger-Aktivität von Phlorizin (siehe Abbildung 47). Oxidation durch Tyrosinase erhöht diese jedoch massiv. Dieser Effekt zeigt sich auch in der Zellkultur. In THP1 Zellen erreicht die antioxidative Wirkung der Oxidationsprodukte sogar das Niveau von Resveratrol. Eine mögliche Erklärung für die positive Wirkung der Oxidation durch Tyrosinase auf die antioxidative Wirkung der phenolischen Weinhaltstoffe erfolgt im nächsten Abschnitt.

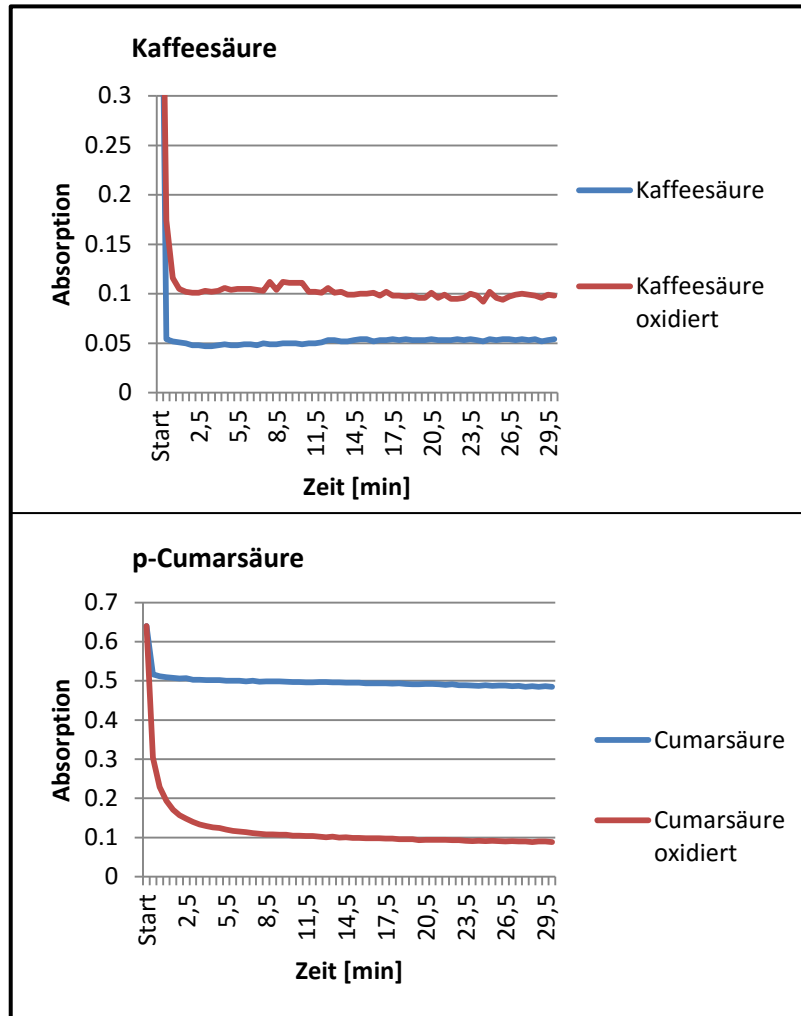


Abbildung 52: Vergleich der Reduktion von DPPH von Kaffeesäure und p-Cumarsäure über die Zeit

Dargestellt ist die Reduktion des DPPH Radikals über 30 min. Gemessen wurde die Asorption des DPPH Radikals bei 515 nm

3.12.7 Zusammenfassende Betrachtung der Versuche zum Einfluss von Tyrosinase aus *Agaricus bisporus* auf die antioxidative Wirkung von phenolischen Weininhaltsstoffen

Mit Ausnahme der Kaffeesäure erhält oder erhöht eine Oxidation durch Tyrosinase die antioxidative Wirkung der getesteten phenolischen Weininhaltsstoffe. Auf den ersten Blick erscheint dies der Theorie zu widersprechen, da durch die Tyrosinaseoxidation reaktive Chinone entstehen, die stark oxidativ wirken. Nachgeschaltete autokatalytische Reaktionen führen jedoch zur Bildung weiterer Strukturen. Die Melaninbiosynthese ist ein Beispiel der durch Tyrosinase induzierten Polymerisation einer simplen phenolischen Substanz, in diesem Fall Tyrosin. Tyrosinase konvertiert Tyrosin zu Dopachinon. Nachgeschaltet kommt

es durch mehrere autokatalytische intramolekulare Konversionen zu Intermediaten wie Leukodopachrom oder 5,6-Dihydroxyindol, die über benachbarte aromatische Hydroxylgruppen verfügen und somit Strukturmerkmale eines antioxidativ wirkenden Stoffes aufweisen (siehe Abbildung 52). Deren weitere Oxidation führt zur Bildung von Eumelanin, welches selbst über eine sehr große

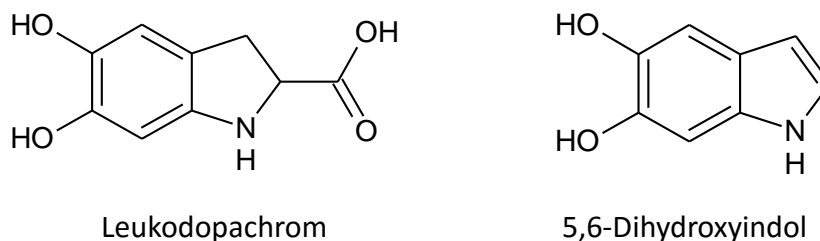


Abbildung 53: Strukturen von Zwischenprodukten der Melaninsynthese

Anzahl an aromatischen Hydroxylgruppen verfügt, die über ein massives delokalisiertes π -System verknüpft sind [172]. Autokatalytische Reaktionen von oxidierten Hydroxycimtsäuren, Stilbenen, Hydroxybenzoesäuren und Chalkonen wurden bisher nicht so ausführlich untersucht wie die des Tyrosins. Allerdings führen die Ergebnisse dieser Arbeit zu dem Schluss, dass auch hier Produkte entstehen, die über eine ausreichende Zahl von aromatischen Hydroxylgruppen verfügen, welche an ein genügend großes delokalisiertes π -System gebunden sind, um eine ähnlich große oder höhere antioxidative Wirkung zu erzielen wie ihre Edukte. Den größten Einfluss hat Tyrosinase hierbei auf p-Cumarsäure und Phlorizin. Wahrscheinlich ist hierfür die Möglichkeit der Tyrosinase o-Chinone aus Monophenolen zu bilden verantwortlich, die, wie im Fall des Tyramins, den Grundstein dafür legt, dass, nach autokatalytischen intramolekularen Konversionen, oder auch Kondensationen mit anderen Chinonen, benachbarte aromatische Hydroxylgruppen entstehen. Dieser Effekt kommt auch bei den Stilbenen Resveratrol und Polydatin zum Tragen. Allerdings sind in diesem Fall die Edukte schon starke Antioxidantien, so dass der Unterschied durch die Tyrosinasebehandlung nicht mehr so groß ausfällt.

Weiterhin zeigt der Vergleich der DPPH-Tests zu den Versuchen der Zellkultur, dass, zumindest in den verwendeten Konzentrationen, die antioxidative Kapazität der getesteten phenolischen Weininhaltsstoffen hauptsächlich in deren Scavenger-Aktivität begründet liegt. Dafür sprechen die äquivalenten Ergebnisse des DPPH-Tests und der Zellkulturversuche sowie die Tatsache, dass das

Chemilumineszenzsignal bereits direkt nach der Zeit der *dark adaption* zurückging. Eine Aktivierung der endogenen Enzyme zur Senkung des oxidativen Potentials der Zellen (wie z.B. Superoxiddismutasen) hatte längere Zeit benötigt. Eine Inhibierung der NADPH-Oxidase oder von PKC kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, da diese ebenfalls eine sofortige Wirkung zeigen würde.

3.13 Einfluss von Tyrosinase aus Rieslingtrauben auf die antioxidative Wirkung von phenolischen Weinhaltstoffen

Um die Ergebnisse des Kapitels 3.10 auch für Tyrosinase aus Trauben bestätigen zu können und somit einen Bezug zu den Oxidationsprozessen während der Weinbereitung zu bekommen, wurden die Versuche zur Untersuchung der antioxidativen Wirkung mit isolierter und aufgereinigter Tyrosinase aus Rieslingtrauben sowie weiteren Substraten durchgeführt. Abbildung 53 zeigt eine Auswahl der getesteten phenolischen Weinhaltstoffe jeweils vor und nach Oxidation durch Tyrosinase aus Rieslingtrauben, welche zu gelben bis bräunlichen Lösungen führt.

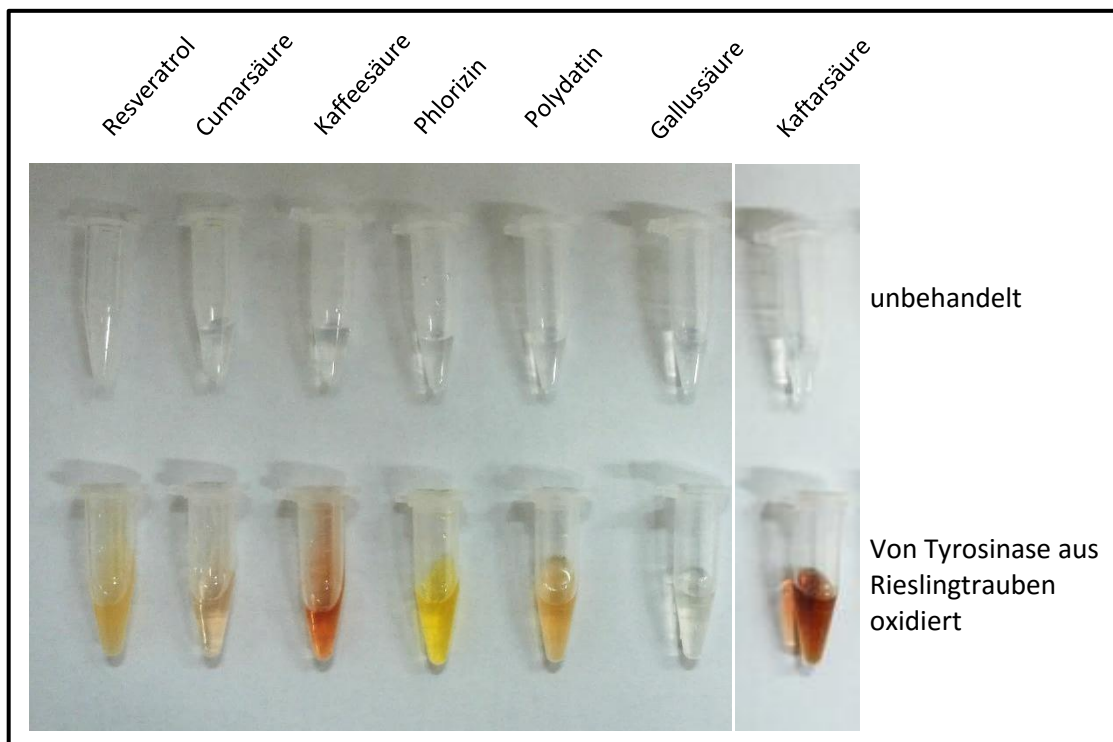


Abbildung 54: Phenolische Weinhaltstoffe vor und nach Oxidation durch Tyrosinase aus Rieslingtrauben

Gezeigt sind die Versuchsansätze zur Untersuchung der antioxidativen Kapazität von phenolischen Weinhaltstoffen. 5 mM Substrat wurde über Nacht mit 19,4 U/ml Tyrosinase in Citratpuffer (0,1M, pH 5) inkubiert.

Neben den unter 3.7 beschriebenen Substraten wurden außerdem die Hydroxizimtsäuren Sinapin- und Kaftarsäure, das Chalkon Phloretin sowie die Benzoesäuren Ethylgallat, Vanillinsäure, 4-Hydroxybenzoesäure, und 3,4-Dihydroxybenzoesäure getestet. Abbildung 54 zeigt die Ergebnisse des DPPH-Tests mit den obengenannten Substraten. Neben der Untersuchung der Scavenger-Aktivität wurden ebenfalls wieder Untersuchungen zur antioxidativen Kapazität der phenolischen Weinhaltstoffe sowie deren Tyrosinaseoxidationsprodukte durchgeführt. Die Ergebnisse hierzu sind in den Abbildungen 55 und 56 zu sehen.

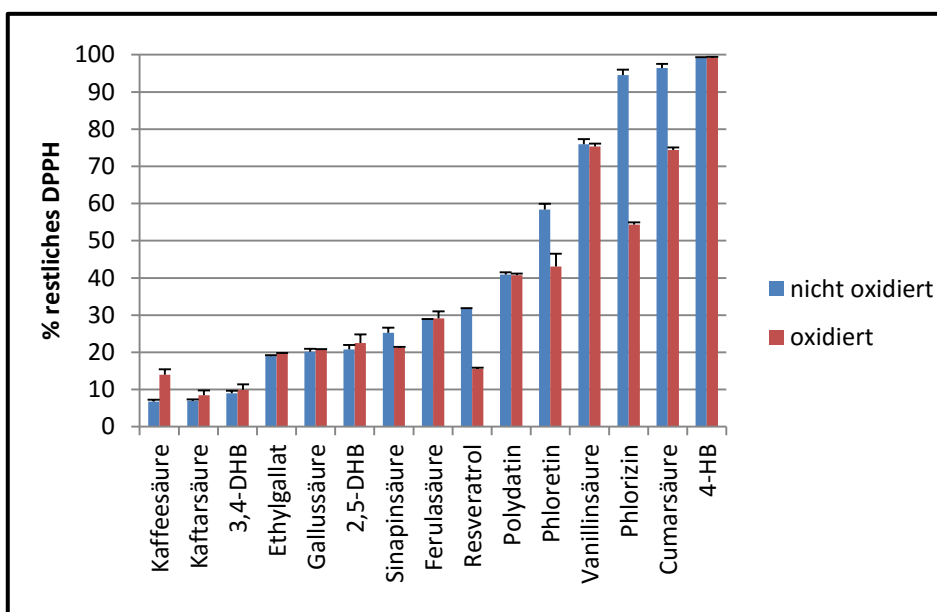


Abbildung 55: Einfluss von Tyrosinase aus Rieslingtrauben auf Scavenger-Aktivität phenolischer Weinhaltstoffe

Die Absorption des gefärbten DPPH Radikals bei 515 nm verringert sich bei Reduktion durch Antioxidantien. Dargestellt ist die auf Absorption beruhende Konzentration von reduziertem DPPH nach 30 min Inkubation mit den Phenolen. In blau ist die Scavenger-Aktivität der Phenole dargestellt, in rot diese nach vierundzwanzigstündiger Inkubation mit Tyrosinase.

Im Folgenden werden die phenolischen Weinhaltstoffe einzeln in ihrer Scavenger-Aktivität und Einfluss auf den oxidativen Zustand von Zellkulturen betrachtet.

3.13.1 Hydroxizimtsäuren

Kaffeesäure zeigt zusammen mit Kaftarsäure die höchste Scavenger-Aktivität. Bei Kaftarsäure handelt es sich um den Tartratester der Kaffeesäure. Das bedeutet, dass das aromatische System bei beiden Substanzen gleich aufgebaut

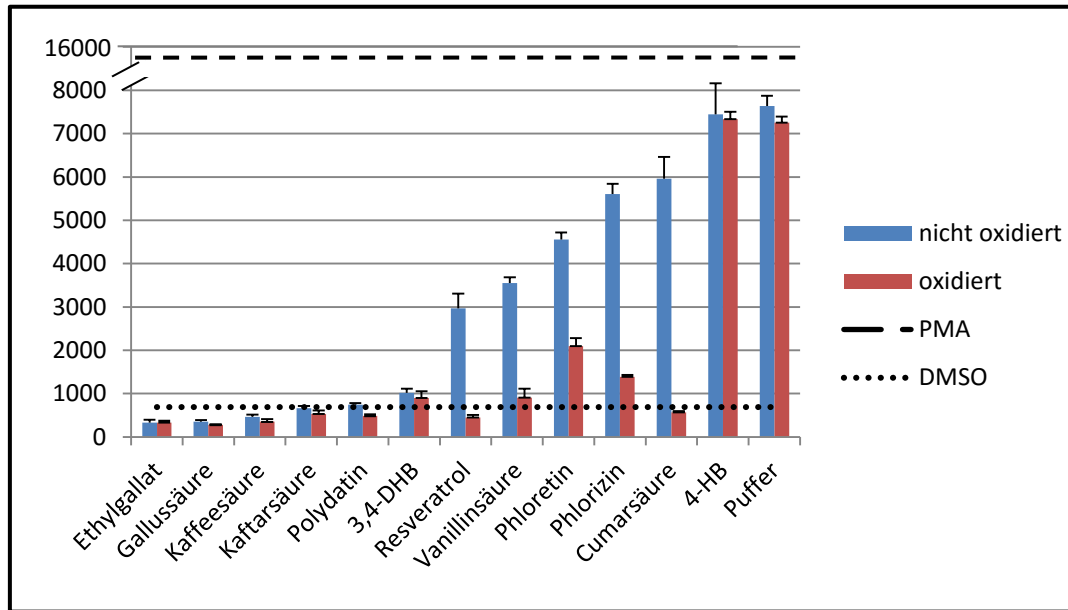


Abbildung 56: Antioxidative Kapazität von phenolischen Weininhaltsstoffen sowie deren Tyrosinaseoxidationsprodukten in THP1 Zellen

Um die Bildung von ROS zu stimulieren, wurde den Zellen PMA zugesetzt. Die ROS reagieren mit L-012 unter Aussendung von Licht (Chemilumineszenz = CL), welches detektiert wird. Die PMA-Linie repräsentiert die maximale ROS-Produktion der stimulierten Zellen. Die DMSO-Linie stellt das ROS-Signal ohne Stimulierung dar. Dargestellt sind die CL-Werte nach 120 min Inkubation. Verwendet wurden 19,4 U/ml Tyrosinase aus Rieslingtrauben. Puffer: Citratpuffer (0,1 M, pH 5) ohne phenolische Weininhaltsstoffe.

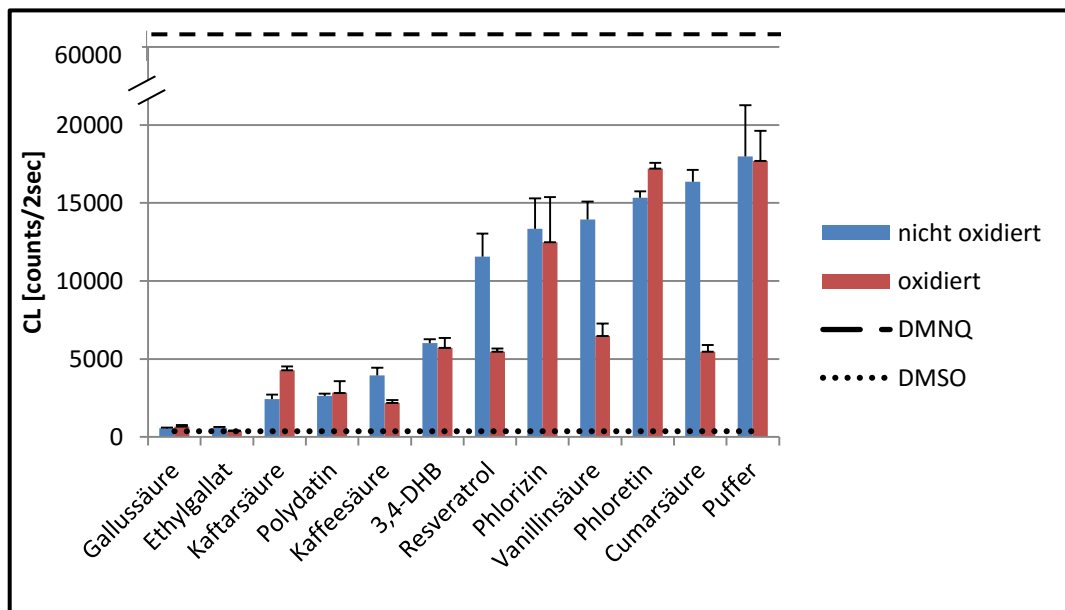


Abbildung 57: Antioxidative Kapazität von phenolischen Weininhaltsstoffen sowie deren Tyrosinaseoxidationsprodukten in EA.hy 926 Zellen

Um die Bildung von ROS zu stimulieren, wurde den Zellen DMNQ zugesetzt. Die ROS reagieren mit L-012 unter Aussendung von Licht (Chemilumineszenz = CL), welches detektiert wird. Die DMNQ-Linie repräsentiert die maximale ROS-Produktion der stimulierten Zellen. Die DMSO-Linie stellt das ROS-Signal ohne Stimulierung dar. Dargestellt sind die CL-Werte nach 120 min Inkubation. Verwendet wurden 19,4 U/ml Tyrosinase aus Rieslingtrauben. Puffer: Citratpuffer (0,1 M, pH 5) ohne phenolische Weininhaltsstoffe.

ist und beide somit in der Theorie die gleiche Scavenger-Aktivität aufweisen sollten, was durch den DPPH-Test bestätigt werden kann (siehe Abbildung 54). Die Oxidationsprodukte der Kaffeesäure weisen, wie bereits bei den Versuchen mit Tyrosinase aus *Agaricus bisporus*, eine erniedrigte Scavenger-Aktivität auf, wohingegen die Oxidation der Kaftarsäure keinen Einfluss auf diese zu haben scheint. Beide Substanzen werden in etwa gleich gut von Rieslingtyrosinase umgesetzt (siehe Abbildung 32), so dass der beobachtete Unterschied nicht durch den Umsatz erklärt werden kann. Allerdings wird die Veresterung der Carboxylgruppe der Kaftarsäure wahrscheinlich Auswirkungen auf die der Oxidation nachgeschalteten autokatalysierten Reaktionen haben und somit zu anderen Produkten führen als im Fall der Kaffeesäure.

In der Zellkultur zeigt sich kein einheitliches Bild für Kaffee- und Kaftarsäure. In THP1 Zellen (siehe Abbildung 55) gehören beide Phenole zu den Substraten mit der höchsten antioxidativen Wirkung. Eine Oxidation durch Tyrosinase zeigt hier keinen Einfluss. In EA.hy 926 Zellen gehören Kaffee- und Kaftarsäure nicht mehr zu den am stärksten wirkenden Antioxidantien (siehe Abbildung 56). Die Wirkung der Kaffeesäure wird hier durch Oxidation verbessert, im Fall der Kaftarsäure stellt sich jedoch eine Verminderung der antioxidativen Kapazität ein. Dies zeigt, dass sich die Verhältnisse der antioxidativen Wirkung von oxidierten zu nicht-oxidierten Phenolen zwischen zwei Zelllinien unterscheiden können. Eine Begründung für die ausschließlich in EA.hy 926 Zellen erniedrigte antioxidative Kapazität der Oxidationsprodukte von Kaftarsäure ist eventuell in einer verminderten Bioverfügbarkeit zu finden.

Die Ergebnisse der p-Cumarsäure entsprechen in ihrer Tendenz den Versuchen mit Tyrosinase aus *Agaricus bisporus*. Die Scavenger-Aktivität der Oxidationsprodukte scheint im Vergleich niedriger als jene, die durch Tyrosinase aus *Agaricus bisporus* entstanden sind. Dies kann allerdings durch die geringere Konzentration der Tyrosinase aus Rieslingtrauben und dem damit verbundenen erniedrigten Umsatz erklärt werden. In der Zellkultur jedoch, vor allem in THP1 Zellen, wirken die Oxidationsprodukte, die durch Rieslingtyrosinase entstanden sind, stärker als jene, deren Oxidation durch Tyrosinase aus *Agaricus bisporus* katalysiert wurde. Hier zeigt sich deutlich, dass die Oxidationsprodukte der p-Cumarsäure in ihrer antioxidative Kapazität den theoretisch identischen Oxidationsprodukten der Kaffeesäure entsprechen.

3.13.2 Hydroxybenzoesäuren

Die Ergebnisse der Gallussäure sind äquivalent zu den Versuchen mit Tyrosinase aus *Agaricus bisporus*. Bei Ethylgallat handelt es sich um den Ethylester der Gallussäure. Wie im Fall von Kaffee- und Kaftarsäure hat die Veresterung keinen Einfluss auf die starke Scavenger-Aktivität der beiden Benzoesäuren. In der Zellkultur gehören beide Substrate zu den Stoffen mit der höchsten antioxidativen Wirkung. Eine Oxidation durch Tyrosinase zeigt weder im DPPH-Test noch in der Zellkultur einen Einfluss auf die antioxidative Wirkung.

3,4-Dihydroxybenzoesäure gehört zusammen mit Kaffee- und Kaftarsäure zu den stärksten Radikalfängern in dieser Testreihe, was durch das gemeinsame Strukturelement der benachbarten aromatischen Hydroxylgruppen erklärt werden kann. Wie im Fall der beiden o-Dihydroxycimtsäuren kann ein Radikal, das durch den HAT-Mechanismus entstanden ist, von der benachbarten Hydroxylgruppe über Wasserstoffbrücken stabilisiert werden. Die Carboxylgruppe der Benzoesäure erniedrigt die Elektronendichte im aromatischen System durch einen –M-Effekt. Im Gegensatz zum +M-Effekt der Acrylsäuregruppe der Hydroxycimtsäuren führt dies nicht zu einer Erniedrigung des BDE der Hydroxylgruppe und somit zu einer erleichterten Oxidation, jedoch stabilisiert der –M-Effekt der Carboxylgruppe ein bereits entstandenes Radikal. In THP1 Zellen gehört 3,4-Dihydroxybenzoesäure zu den Substanzen mit starker antioxidativer Kapazität. Diese fällt jedoch in EA.hy 926 Zellen wesentlich moderater aus. Die Ergebnisse der Oxidationsprodukte der 3,4-Dihydroxybenzoesäure unterscheiden sich weder im DPPH-Test noch in der Zellkultur von denen ihres Edukts.

4-Hydroxybenzoesäure weist, trotz einer aromatischen Hydroxylgruppe, keinerlei Scavenger-Aktivität im DPPH-Test auf. Wie im Fall von Kaffee- und p-Cumarsäure bilden 4-Hydroxy- und 3,4-Dihydroxybenzoesäure theoretisch die gleichen Oxidationsprodukte. Allerdings lässt sich keine Erhöhung der Scavenger-Aktivität oder der antioxidativen Wirkung in Zellen durch Tyrosinaseoxidation beobachten. Erklären lässt sich dies durch den sehr geringen Umsatz der 4-Hydroxybenzoesäure durch Tyrosinase aus Rieslingtrauben. Eine erhöhte Konzentration der Tyrosinase oder eine längere Inkubationszeit würden hier sicherlich zu differenzierteren Ergebnissen führen.

Vanillinsäure zeigt nur eine schwache Scavenger-Aktivität. Der Grund hierfür liegt in der Methylierung der 3-OH-Gruppe. Somit steht eine aromatische Hyd-

roxylgruppe weniger für HAT zur Verfügung und ein durch Reduktion entstandenes Radikal kann nicht über Wasserstoffbrücken stabilisiert werden. Die Oxidationsprodukte der Vanillinsäure zeigen die gleiche nur schwach ausgeprägte Scavenger-Aktivität. In EA.hy 926 Zellen ist die antioxidative Kapazität ebenfalls schwach, in THP1 Zellen ist ihre antioxidative Wirkung stärker ausgeprägt. Die Oxidationsprodukte unterscheiden sich in ihrer Wirkung jedoch deutlich in der Zellkultur. In beiden Zelllinien wird die antioxidative Kapazität massiv erhöht. Da die Scavenger-Aktivität jedoch nicht durch Oxidation beeinflusst wird, ist dies ein starkes Indiz für einen anderen antioxidativ wirkenden Mechanismus. Da sich die antioxidative Wirkung hier schnell eingestellt hat, spricht vieles für eine Inhibition der NADPH-Oxidase oder PKC durch die Oxidationsprodukte der Vanillinsäure.

3.13.3 Chalkone

Die Ergebnisse der Versuche mit Tyrosinase aus Rieslingtrauben und *Agaricus bisporus* bezüglich Phlorizin sind im Wesentlichen identisch mit Ausnahme der Versuche mit EA.hy 926 Zellen. Allerdings streuen die Ergebnisse hier bei beiden Versuchsreihen stark, was eine Interpretation schwierig gestalten lässt. Das entsprechende Aglykon Phloretin zeigt aufgrund einer zusätzlichen freien Hydroxylgruppe eine erhöhte Scavenger-Aktivität im Vergleich zu Phlorizin. Oxidation durch Tyrosinase aus Rieslingtrauben erhöht bei beiden Chalkonen die Fähigkeit DPPH zu reduzieren. In der Zellkultur zeigen beide Chalkone eine moderate antioxidative Wirkung, wobei die des Aglykons Phloretin etwas stärker ausfällt. In THP1 Zellen bestätigt sich der positive Effekt von Tyrosinase auf die antioxidative Wirkung beider Chalkone. Hier erreichen die Oxidationsprodukte von Phlorizin sogar eine effizientere Reduktion von ROS als die des Aglykons Phloretin. In EA.hy 926 Zellen ist die antioxidative Kapazität von Phloretin sogar minimal erhöht und stellt somit die einzige Ausnahme der positiven Wirkung von Tyrosinase auf die antioxidative Wirkung der in dieser Arbeit untersuchten phenolischen Weininhaltsstoffe dar.

3.13.4 Stilbene

Resveratrol und sein 3-O-Glykosid Polydatin zeigen beide, wie bereits die Versuche mit Tyrosinase aus *Agaricus bisporus* verdeutlichten, moderate Scavenger-Aktivität, wobei die des Resveratrol etwas stärker ausfällt, da hier eine zusätzliche aromatische Hydroxylgruppe vorliegt (vgl. 3.12.4). In der Zellkultur jedoch ist die antioxidative Kapazität von Resveratrol im Vergleich zu Polydatin stark erniedrigt. Dies steht im Widerspruch zu den Versuchen mit Tyrosinase aus *Agaricus bisporus*. Hier gehörten beide Stilbene zu den Phenolen mit der stärksten antioxidativen Wirkung. Da bei beiden Versuchen die Probenvorbereitung der nicht-oxidierten Proben identisch war, kann dies nur durch einen Fehler bei der Probenvorbereitung oder der Versuchsdurchführung der Zellkulturexperimente erklärt werden. Die Oxidation durch Tyrosinase aus Rieslingtrauben führt bei Resveratrol, wie im Fall der Oxidation durch Tyrosinase aus *Agaricus bisporus*, zu einer Erhöhung der Scavenger-Aktivität. Bei Polydatin ließ sich jedoch, im Gegensatz zu den vorigen Versuchen, keine Änderung durch Behandlung mit Tyrosinase feststellen. Der Unterschied zu den Oxidationsprodukten von Resveratrol lässt sich damit erklären, dass wie unter 3.9.2 gezeigt, Polydatin grundlegend andere Oxidationsprodukte bildet als Resveratrol. In der Zellkultur gehört Polydatin, wie schon Versuche mit Tyrosinase aus *Agaricus bisporus* zeigten, zu den Phenolen mit der höchsten antioxidativen Kapazität. Die Oxidation durch Tyrosinase aus Rieslingtrauben führt hierbei ebenfalls zu keiner Änderung.

3.13.5 Zusammenfassende Betrachtung der Versuche zum Einfluss von Tyrosinase aus *Agaricus bisporus* und Rieslingtrauben auf die antioxidative Wirkung von phenolischen Weininhaltsstoffen

Im Wesentlichen konnten die Ergebnisse der Versuche mit *Agaricus bisporus* durch die Versuche mit Tyrosinase aus Rieslingtrauben bestätigt werden. Unterschiede waren nur bei den Oxidationsprodukten von p-Cumarsäure und Phlorizin zu beobachten. Im Fall der p-Cumarsäure zeigten die Oxidationsprodukte der Tyrosinase aus Rieslingtrauben trotz des geringeren Umsatzes eine stärkere antioxidative Kapazität in der Zellkultur als die Produkte, die durch Oxidation der Tyrosinase aus *Agaricus bisporus* entstanden sind. Eine mögliche

Erklärung könnte in der Substratspezifität der autokatalysierten Produkte nach der Tyrosinaseoxidation zu finden sein. Wie unter 3.10.7 beschrieben, entstehen nach der Bildung hochreaktiver Chinone durch Tyrosinaseoxidation dank autokatalytischer intramolekularer Konversionen oder Kondensationen mit anderen Chinonen Substanzen, die wieder aromatische Hydroxylgruppen enthalten können. Theoretisch könnten diese wieder als Substrate für Tyrosinasen dienen. Unterscheidet sich hierbei deren Substratspezifität für die Tyrosinasen aus Pilz und Traube kann es zur Bildung sehr unterschiedlicher Oxidationsprodukte im Gesamten kommen. Dieser Effekt müsste theoretisch auch bei Kaffeesäure zu beobachten sein, da hier allerdings die antioxidative Kapazität bereits von Anfang an sehr hoch ist, könnten diese Unterschiede in den verwendeten Konzentration nicht merkbar auftreten.

Polydatin zeigt, wenn es von Tyrosinase aus *Agaricus bisporus* umgesetzt wird, eine minimal erhöhte Scavenger-Aktivität. Dieser Effekt war beim Umsatz mit Tyrosinase aus Rieslingtrauben nicht zu beobachten. Der Grund hierfür liegt wahrscheinlich an der geringeren Konzentration der Tyrosinase aus Rieslingtrauben.

Wie bei den Versuchen mit Tyrosinase aus *Agaricus bisporus* können die größten Unterschiede in der Scavenger-Aktivität zwischen Substrat und Oxidationsprodukt bei jenen Substanzen festgestellt werden, die über aromatische Hydroxylgruppen verfügen, deren ortho-Positionen unsubstituiert vorliegen. Dies gilt für Resveratrol, Phloretin, Phlorizin und p-Cumarsäure. Hier kommt die Möglichkeit der Tyrosinase o-Chinone aus Monophenolen zu bilden zum Tragen (vgl. 3.12.7). Die Ausnahmen stellen hierbei Polydatin und 4-Hydroxybenzoesäure dar, was allerdings durch den geringen Umsatz dieser beiden Substrate erklärt werden kann (vgl. 3.13.2 und 3.13.4)

Wie bereits unter 3.10.7 beschrieben, ist auch bei den zusätzlich getesteten Substraten die antioxidative Kapazität auf die Scavenger-Aktivität zurückzuführen. Eine Ausnahme stellen hierbei, wie unter 3.13.2 erläutert, die Oxidationsprodukte der Vanillinsäure dar.

3.14 Verlauf der Tyrosinaseaktivität während der Weinbereitung von Riesling

Eine Fragestellung, die im Laufe dieser Arbeit beantwortet werden sollte, war, wie lange Tyrosinase während der Weinbereitung aktiv ist. Hierbei musste jedoch das Vorkommen einer weiteren Polyphenoloxidase beachtet werden. Das Auftreten der Edelfäule, die auf einem Befall von Trauben durch den Pilz *Botrytis cinerea* beruht, ist meist ein vom Winzer erwünschter Prozess während der Traubenreife. Hierbei gelangt Laccase aus *Botrytis cinerea* in die Traube. Laccase ist, wie die traubeneigene Tyrosinase, in der Lage phenolische Wein- bzw. Traubeninhaltsstoffe zu oxidieren [173, 174]. Für die Untersuchung der Tyrosinaseaktivität während der Weinbereitung musste also ein Substrat gefunden werden, welches nur von Tyrosinase und nicht von Laccase umgesetzt wird. Um dies zu erreichen, wurde Laccase, die direkt aus *Botrytis cinerea* isoliert wurde, vom Institut für Mikrobiologie und Weinforschung der Universität Mainz für Versuche zur Verfügung gestellt. Zuerst wurde die Aktivität der Laccase mit dem Substrat 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) bestätigt (siehe Abbildung 57 A). Anschließend wurden Produktspektren von mehreren monophenolischen Substraten mit Laccase aufgenommen. Hierbei zeigte sich, dass p-Tyrosol nicht von Laccase aus *Botrytis cinerea* umgesetzt wird (siehe Abbildung 57 B).

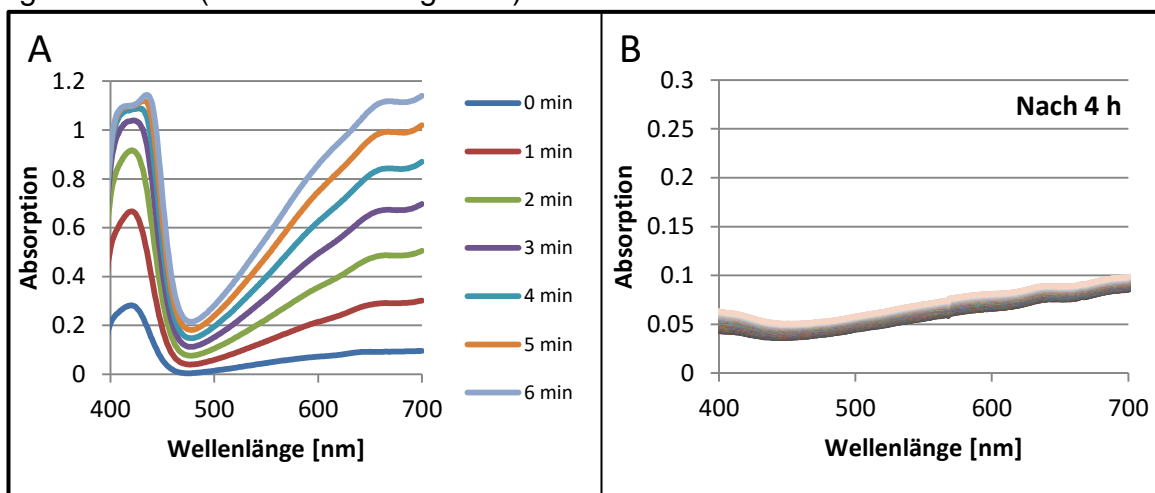


Abbildung 58: Überprüfung der Substratspezifität von Laccase aus *Botrytis cinerea* bezüglich Tyrosol

A: Produktspektren von ABTS (4,2 mM) bei Katalyse mit Laccase aus *Botrytis cinerea* (2 μ l / unbekannter Aktivität) zur Überprüfung der Aktivität. Gemessen in Citratpuffer, 0,1 M, pH 5

B: Produktspektren von Tyrosol (4,2 mM) bei Katalyse mit Laccase aus *Botrytis cinerea* (2 μ l / unbekannter Aktivität). Gemessen in Citratpuffer, 0,1 M, pH 5. Auch nach 4 Stunden ist kein Umsatz zu erkennen.

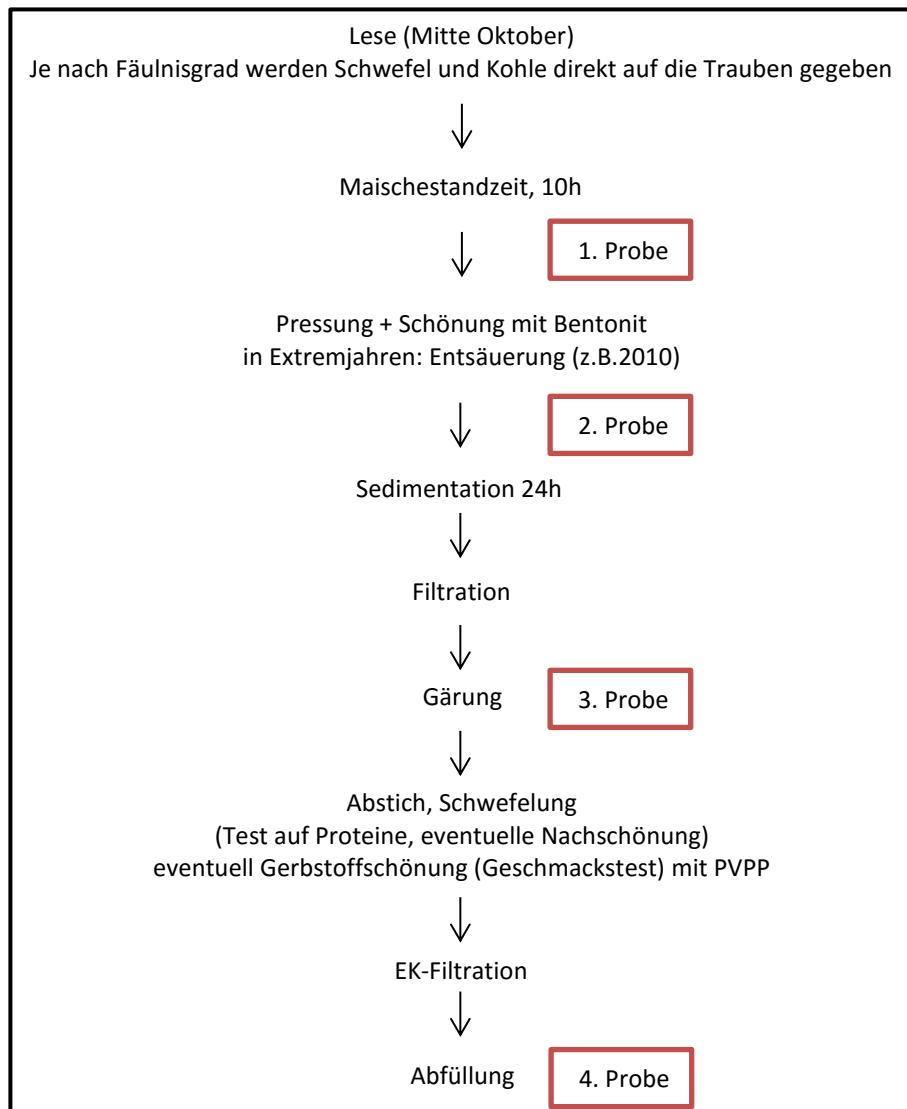


Abbildung 59: Rieslingweinerstellung im Weingut der Stadt Mainz

Gezeigt ist der Prozessablauf der Rieslingherstellung im Weingut der Stadt Mainz der Familie Fleischer in Hechtsheim. Die zur Untersuchung der Tyrosinaseaktivität entnommenen Proben wurden eingezeichnet. Die Proben wurden im Jahr 2014 entnommen.

Um den Verlauf der Tyrosinaseaktivität während der Weinbereitung zu bestimmen, wurden Proben während des Herstellungsprozesses gesammelt, dialysiert und gefriergetrocknet. Die Weinvorstufen stammen aus dem Jahr 2014 und wurden vom Weingut der Stadt Mainz zur Verfügung gestellt. Abbildung 58 zeigt den Herstellungsprozess von Riesling des Weinguts der Stadt Mainz. Es wurde jeweils eine Probe vor und nach Schönung mit Bentonit sowie während der Gärung und nach der Abfüllung entnommen.

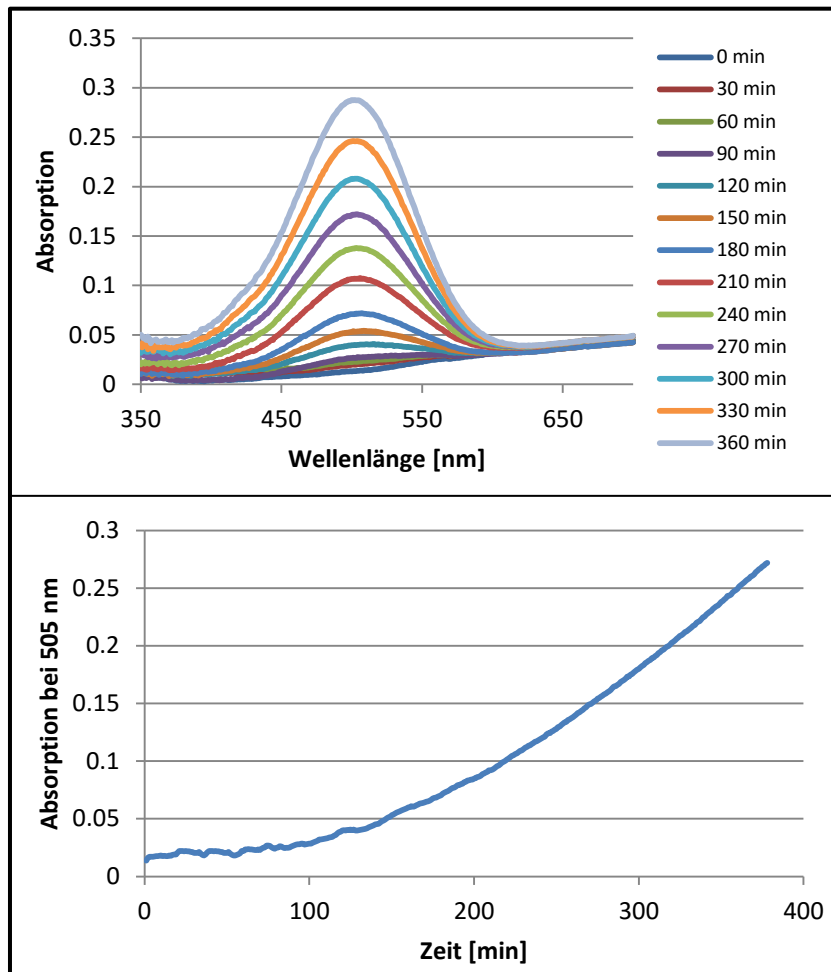


Abbildung 60: Tyrosinaseaktivität der ersten Riesling-Weinvorstufe
Gezeigt ist ein Produktspektrum von Tyrosol mit der ersten Weinvorstufe nach der Maischestandzeit, aber vor Zugabe von Bentonit. Das Lyophilisat der Weinvorstufe wurde mit einer Konzentration von 3,5 mg/ml in Citratpuffer (0,1M, pH 5) gelöst. Dem Messansatz wurden je 4,2 mM Tyrosol und MBTH zugegeben. Der untere Teil der Abbildung zeigt eine Kinetik der Tyrosolumsetzung bei 505 nm.

Da auch im Jahr 2014 der Riesling von der Edelfäule befallen war, wurde den Trauben bereits vor der Pressung Schwefel in Form von Kaliumdisulfit zugegeben. Da der Winzer nicht quantifizierte Mengen anhand seiner persönlichen Erfahrung zugab, kann keine genaue Aussage über den Schwefelgehalt der Weinvorstufe getroffen werden. Für die Bestimmung der Tyrosinaseaktivität wurde das Lyophilisat der Weinvorstufen in Citratpuffer (0,1 M, pH 5) mit einer Konzentration von 3,5 mg/ml resolubilisiert. Anschließend wurden Tyrosol und MBTH dem Versuchsansatz zugegeben und ein Produktspektrum gemessen. Abbildung 59 zeigt das Produktspektrum der ersten Probe. Nach einer Lag-Phase von etwa 90 min ist ein deutlicher Anstieg der Absorption bei 505 nm zu

beobachten. Die anfängliche Zugabe von Schwefel hat also nicht zu einer vollständigen Inhibierung der Tyrosinaseaktivität geführt.

Die zweite Weinvorstufe wurde nach der Schöpfung mit Bentonit entnommen. Da die Bentonitbehandlung dem Entzug von Proteinen aus dem Most dient, ist dies in der Theorie auch mit einem Rückgang der Tyrosinaseaktivität verbunden. Zur Bestätigung wurde die Tyrosinaseaktivität der zweiten Weinvorstufe ermittelt.

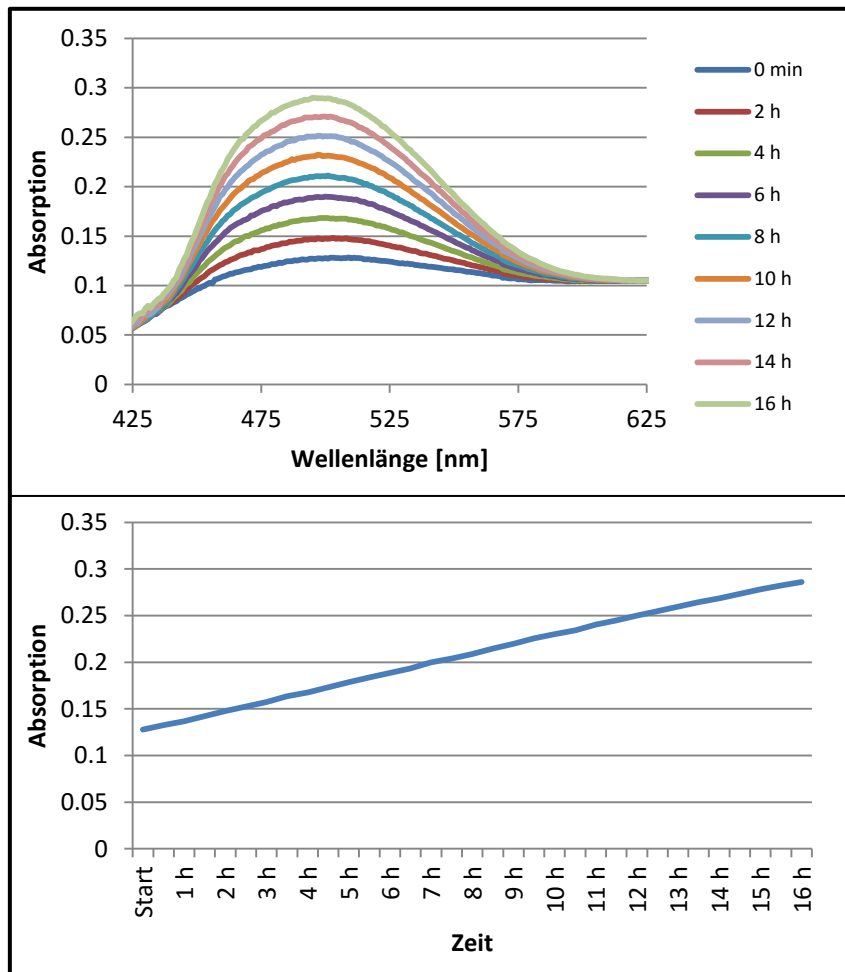


Abbildung 61: Tyrosinaseaktivität der zweiten Riesling-Weinvorstufe
Gezeigt ist ein Produktspektrum von Tyrosol mit der zweiten Weinvorstufe, nach Schöpfung mit Bentonit. Das Lyophilisat der Weinvorstufe wurde mit einer Konzentration von 3,5 mg/ml in Citratpuffer (0,1M, pH 5) gelöst. Dem Messansatz wurden je 4,2 mM Tyrosol und MBTH zugegeben. Der untere Teil der Abbildung zeigt eine Kinetik der Tyrosolumsetzung bei 505 nm.

In Abbildung 60 ist zu erkennen, dass nach der Schöpfung mit Bentonit die Tyrosinase in nur noch sehr geringem Maß aktiv ist. Im Bezug zur ersten Weinvorstufe beträgt die Aktivität nur noch 14 %.

Während des Gärprozesses wurde die dritte Probe entnommen und auf Tyrosinaseaktivität überprüft. Es konnte jedoch auch nach zweitägiger Messung

keine Tyrosinaseaktivität mehr festgestellt werden. Auch im fertigen, abgefüllten Wein konnte kein Umsatz von Tyrosol verzeichnet werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Tyrosinase bis zur Gärung im Riesling aktiv ist. Geringe Mengen Schwefel, die vor der Pressung den Trauben zugegeben worden sind, sowie die Schönung mit Bentonit konnten die Tyrosinaseaktivität nicht vollkommen inhibieren. Erst während der Gärung wird die vorher schon geringe Aktivität der Tyrosinase unterbunden. Begründet werden könnte dies eventuell durch den steigenden Alkoholgehalt des Weins oder durch die *suicide inactivation* der Tyrosinase.

3.14.1. Einfluss von Schwefel (Kaliumdisulfit) auf die Tyrosinaseaktivität

Um den Einfluss von Schwefel auf die Aktivität der Tyrosinase quantifizieren zu können, wurden MBTH-Assays mit Dopamin als Substrat durchgeführt. Hierfür wurde Kaliumdisulfit in verschiedenen Konzentrationen der Probelösung zugegeben und sofort vermessen. Die verwendeten Konzentrationen richten sich nach den durch die Europäische Kommission festgelegten maximalen Mengen von Sulfiten in Wein (Ruling n° 606/2009). Hierbei gilt eine maximal zulässige

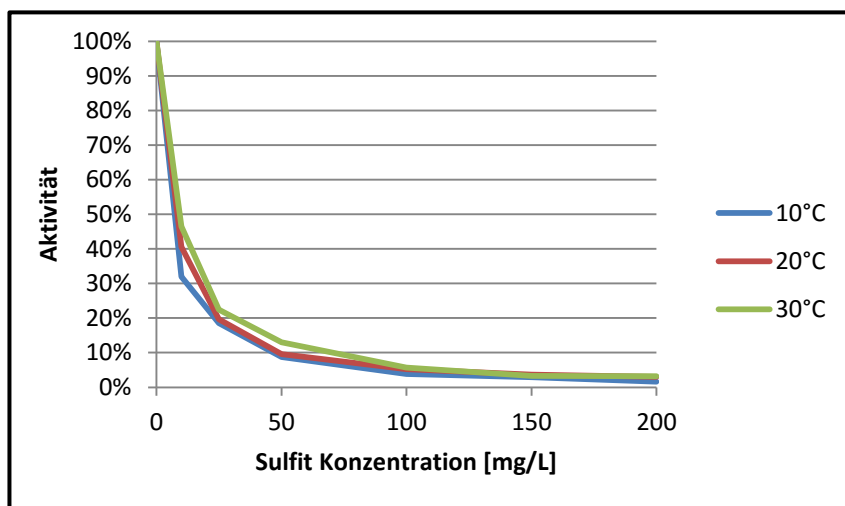


Abbildung 62: Einfluss von Schwefel auf Rieslingtyrosinaseaktivität

Dargestellt ist die Abnahme der Tyrosinaseaktivität nach Zugabe von Kaliumdisulfit zur Messlösung bei drei verschiedenen Temperaturen. Es wurde Tyrosinase aus Rieslingtrauben verwendet. Als Substrat diente Dopamin, die Aktivität wurde mittels MBTH-Assay bestimmt. Die Substratkonzentration war jeweils 2,1 mM, die Aktivität der Tyrosinase betrug 1,62 U/ml. Weiterhin befand sich, mit einer Konzentration von 4,2 mM, MBTH im Ansatz. Puffer: Citratpuffer 0,1M, pH 5

Konzentration von 150 mg/l Sulfit in konventionellen Rotweinen und 200 mg/l in konventionellen Weißweinen. Bei besonderen Weinen wie z.B. Eiswein können auch höhere Mengen Schwefel erlaubt sein.

Eine Inkubation der Tyrosinase mit Kaliumdisulfit führte schon bei den geringsten Mengen zur kompletten Inhibierung der Tyrosinaseaktivität. In Abbildung 61 ist erkennbar, dass auch ohne Inkubation schon geringe Mengen Schwefel die Aktivität der Tyrosinase um 50 -70 % erniedrigen. Weitere Erhöhungen der Schwefelkonzentration lassen eine logarithmische Abnahme der Tyrosinaseaktivität erkennen. Dies bedeutet, dass bereits geringere Mengen Schwefel ausreichen, um die Tyrosinaseaktivität zu inhibieren und auf das Verwenden großer Mengen Schwefel verzichtet werden kann. Die Temperatur hat hierbei wenig Einfluss auf den Rückgang der Tyrosinaseaktivität.

Andere Arbeiten zur Inhibierung von Tyrosinase konnten zeigen, dass eine Konzentration von 25 mg/L SO₂ deren Aktivität langsam reduziert, wobei erst nach 40-50 Tagen die Aktivität komplett inhibiert wurde. SO₂ Konzentrationen ab 50 mg/L unterdrückten die Tyrosinaseaktivität zur Gänze [175-177]. Die in dieser Arbeit festgestellte minimale Aktivität der Tyrosinase nach Zugabe von 50 – 100 mg/L Sulfit kann durch sofortige Messung ohne Inkubationszeit erklärt werden.

3.14.1. Einfluss von Bentonit auf die Tyrosinaseaktivität

Wie unter 3.12 beschrieben, zeigt die Schönung von Wein durch Bentonit Auswirkungen auf die Tyrosinaseaktivität. Um diesen Effekt zu quantifizieren, wurde zuerst eine Bentonit-Stammlösung von 220 g/hl in Citratpuffer hergestellt, wozu nach das Bentonit für 24 h unter Rühren zum Quellen gebracht worden ist. Anschließend wurden Lösungen mit Bentonitkonzentrationen von 0 – 200 g/hl hergestellt, mit jeweils 58,9 U/ml Rieslingtyrosinase versetzt und für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Zur Bestimmung der Tyrosinaseaktivität nach der Inkubation mit drei verschiedenen Sorten Bentonit wurden MBTH-Assays mit Dopamin als Substrat durchgeführt.

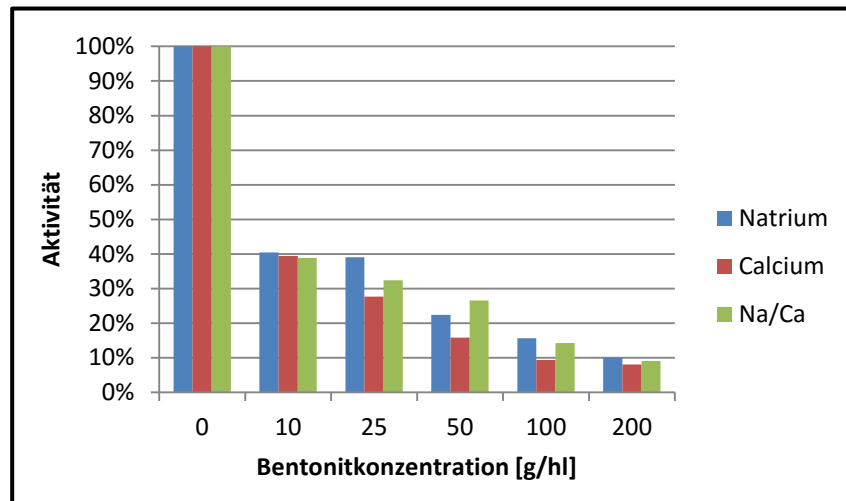


Abbildung 63: Einfluss von Bentonit auf Rieslingtyrosinaseaktivität
 Dargestellt ist die Abnahme der Tyrosinaseaktivität nach Zugabe von jeweils drei verschiedenen Bentonitsorten. Es wurde Tyrosinase aus Rieslingtrauben verwendet. Als Substrat diente Dopamin (2,1 mM), die Aktivität wurde mittels MBTH-Assay bestimmt. Puffer: Citratpuffer 0,1M, pH 5

In Abbildung 62 ist erkennbar, dass bereits kleine Konzentrationen von 10 g/hl Bentonit ausreichen, um die Aktivität der Tyrosinase um mehr als 60 % zu verringern. Wie im Fall der Inhibierung der Tyrosinase durch Sulfid resultiert eine Erhöhung der Bentonitkonzentration in einer logarithmischen Abnahme der Tyrosinaseaktivität. Die untersuchten Bentonitsorten unterscheiden sich nur unwesentlich in ihrer Auswirkung auf die Tyrosinaseaktivität. Calcium-Bentonit scheint bei Bentonitkonzentrationen von 25 – 100 g/hl Tyrosinase minimal stärker zu inhibieren als Natrium- bzw. Natrium/Calcium-Mischbentonit.

Andere Arbeiten zum Einfluss von Bentonit auf die Tyrosinaseaktivität zeigten, dass Konzentrationen von 20 – 100 g/hl die Tyrosinaseaktivität reduzieren, wobei hier nicht alle Produkte die gleiche Wirkung zeigten [59].

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Themenschwerpunkte behandelt. Der erste Teil beschäftigt sich mit der Proteinkomposition von Dornfelder- und Rieslingtrauben während deren Entwicklung. Der zweite Teil befasst sich mit der traubeneigenen Tyrosinase, die aus Trauben isoliert und aufgereinigt wurde. Weiterhin wurde der Umsatz verschiedener im Wein vorkommender phenolischer Inhaltsstoffe durch die Tyrosinase untersucht. Von besonderem Interesse hierbei war der Einfluss der Tyrosinase auf die antioxidative Kapazität dieser phenolischen Weininhaltsstoffe.

4.1 Proteinextraktion aus pflanzlichem Gewebe

Der kritische Schritt in der zellulären Proteinanalytik ist die Extraktion der Proteine aus ihrer Matrix. Ein ideales Extraktionsprotokoll müsste reproduzierbar alle Proteine einer Probe erfassen und in Lösung bringen, wobei diese von nicht-proteomischen Bestandteilen getrennt würden. Aufgrund der Diversität verschiedener Proteine in ihren biochemischen Eigenschaften, wie ihrer Größe, Ladung, Hydrophobizität, Anfälligkeit für Proteolyse, Ligandeninteraktionen, Komplexierung und subzelluläre Lokalisationen, lässt sich mit keinem bekannten Extraktionsprotokoll das gesamte Proteom eines Gewebes erfassen [178, 179]. Dies gilt im Besonderen für die meisten Pflanzengewebe, da diese einen relativ geringen Proteingehalt aufweisen und reich an Proteasen und oxidativen Enzymen sind [179, 180]. Außerdem produzieren Pflanzen eine Vielzahl von sekundären Metaboliten, wie z.B. phenolische Substanzen oder Zellwandpolysaccharide, die zusammen mit den Proteinen extrahiert werden und die nachfolgende Analyse, besonders die 2D-Gelelektrophorese, stören [178]. Durch irreversible Komplexbildung von Phenolen mit Proteinen und die Oxidation von Phenolen durch Oxidasen und Peroxidasen kommt es zu horizontaler und vertikaler Schmierbildung im Gel und somit zu einer verminderten Auflösung von Proteinspots [120, 180]. In der vorliegenden Arbeit wurde dies durch die Verwendung von PVP, welches phenolische Bestandteile bindet (siehe 2.3.3), minimiert.

Die Zellwand der Pflanzenzelle stellt ein weiteres Hindernis dar. Zum einen ist sie generell schwierig zu fragmentieren, was eine Lyse der Zelle erschwert. Allgemein gilt: Je feiner die Trauben unter flüssigem Stickstoff zerkleinert werden, desto höher ist die Proteinausbeute [120]. Zum anderen ist die Zellwand reich an Polysacchariden, einschließlich großer, anionischer Pektine [178]. Pektine und andere geladene Polysaccharide können über elektrostatische Wechselwirkungen mit Proteinen interagieren und Komplexe bilden, wodurch diese für die Analyse verloren gehen [181]. In einer Studie von Vincent, Wheatley und Cramer wurden vier verschiedene Protokolle zur Proteinextraktion aus reifen Trauben miteinander verglichen [124]. Die ersten drei Protokolle waren verschiedene Variationen der TCA-Fällung, die sich besonders für Gewebe von jungen Pflanzen etabliert hat [178]. Das vierte Protokoll beschreibt die Phenolfällung, auf welcher das in meiner Dissertation verwendete Protokoll beruht. Nach Vincent et al. erzeugt die Phenolfällung für eine 2D-SDS-PAGE die höchste Zahl an Proteinspots in der besten Auflösung [124]. Der Grund hierfür liegt unter anderem an der höheren Reinheit der isolierten Proteine, da störende Verbindungen wie Polysaccharide und andere wasserlösliche Substanzen sich bei der Aufreinigung in der wässrigen Phase lösen, während die Proteine in die phenolische Phase übergehen [178].

4.2 Proteom reifer Trauben

Die in dieser Arbeit gelungene Identifizierung von 712 Proteinen aus reifen Dornfeldertrauben ist bisher das größte direkt beschriebene Proteom aus einer Traube. Arbeiten von Martinez-Esteso et al. (2013) und Kambiranda et al. (2014) erreichten eine Zahl von 630 beziehungsweise 674 identifizierter Proteine aus dem Perikarp von *Muscat Hamburg* Trauben und liegen somit in derselben Größenordnung [182, 183]. Eine Arbeit von Negri et al. (2008) untersuchte die Proteinzusammensetzung der Schale von *Barbera* Trauben. Hier wurden 850 Spots nach einer 2D-SDS-PAGE detektiert, von denen jedoch lediglich 80 identifiziert wurden [184]. Aus anderen Geweben der Rebe konnten teilweise wesentlich mehr Proteine extrahiert werden. So wurden 858 Proteinspots aus dem Blatt und 694 Spots aus der Wurzel der Rebe nach 2D-SDS-PAGE detektiert [185]. Aus dem Sämling der Rebe wurden 2277 Proteine identifiziert [186].

Hierbei ist zu beachten, dass sich Proteine aus jungen Pflanzen wesentlich leichter extrahieren lassen [180]. Insgesamt gibt es nur wenige Publikationen, die das Gesamtproteom der Traube beschreiben. Die meisten Studien untersuchen die Variation des Proteoms während der Traubenreife [5, 147, 150, 182-184, 187-189] oder durch wechselnde Umweltbedingungen wie Trockenstress, Einfluss von Herbiziden, Salzen, Salicylsäurebehandlung oder Sonnenscheindauer [163, 164, 166, 167, 190, 191]. Bezüglich der Einordnung von Traubenproteinen zu ihrer Funktion bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit vorangegangene Untersuchungen. Fraige et al. analysierten den Proteingehalt reifer entkernter Trauben der Rebsorte *Syrah* [188]. Hierbei wurden 108 verschiedene Proteine identifiziert. Der mit 34 % größte Anteil wurde „*stress response*“ Proteinen zugeordnet, was in etwa der Verteilung von identifizierten Proteinen in dieser Arbeit entspricht. Die mit einem Anteil von 15 % zweitgrößte Fraktion in der Arbeit von Fraige et al. entstammt Proteinen aus dem Kohlenhydratstoffwechsel, einem Prozess, der in dieser Arbeit die drittgrößte Fraktion darstellt. Nach Analyse des Exocarps von *Barbera* Trauben wurde mit 38 % die größte Fraktion der Proteine „*stress response*“ Reaktionen zugeordnet, gefolgt von Kohlenhydratstoffwechsel mit 13 % [184]. Im Einzelnen wurden hier eine Klasse IV Chitinase, TLPs, β -Glukosidasen und Tyrosinasen gefunden, die alle unter den Top 20 Proteinen in dieser Arbeit zu finden sind (siehe Tabelle 4). Die hohe Anzahl von „*stress response*“ Proteinen in reifen Trauben, besonders in deren Exocarp, wurde durch mRNA Expressionanalysen [164] sowie Untersuchungen des Exocarps verschiedener Rebsorten, die eine Steigerung der Expression von „*stress response*“ Proteinen während der Reifung feststellten, bestätigt [5, 147, 183, 184, 187, 192]. Der Anteil von „*stress response*“ Proteinen war niedriger, wenn nur das Mesocarp der Trauben untersucht wurde. So wurden 34 % der Proteine aus dem Mesocarp von *Gamay* Trauben dem Energiemetabolismus zugeordnet und nur noch 19 % „*stress response*“ Proteinen [45]. Dies wird bestätigt durch Untersuchungen an *Muscat Hamburg* Trauben, in deren Mesocarp die meisten Proteine dem Kohlenhydratstoffwechsel und Energiemetabolismus zugeordnet wurden [5].

4.3 Entwicklung des Proteoms von Trauben während der Reifung

Untersuchungen neueren Datums zur Entwicklung des Proteoms von Trauben während der Reifung wurden mit den Rebsorten *Nebbido Lampia* [150], *Cabernet Sauvignon* [147, 188], *Barbera* [184], *Corvin* [187], *Muscat Hamburg* [5, 183], *Crimson* [189], *Muscadine* [182] und *Syrah* [188] durchgeführt. Diese Untersuchungen betrachteten lediglich Proteine, deren Expression während der Reifung Variationen unterlag. Weiterhin handelt es sich um relative Bestimmungen, da die für die Analysen eingesetzte Proteinmenge stets konstant war. Allgemeine Untersuchungen über den Proteingehalt der Traube zeigten, dass der Proteingehalt von *Muscat of Alexandria* Trauben während der Reifung steigt [28]. Der Proteingehalt von *Crimson* Trauben während der Reifung wurde für drei aufeinander folgende Jahrgänge betrachtet [189]. Hier zeigte sich, dass sich der Verlauf der Proteinkonzentration während der Reifung in verschiedenen Jahren stark voneinander unterscheiden kann, wobei die höchste Proteinkonzentration stets in reifen Trauben zu finden war.

4.3.1 Verlauf der Expression von PR-Proteinen während der Traubenreifung

Im Allgemeinen reichern sich PR-Proteine im Verlauf der Reifung in der Traubenbeere an [28, 182, 188]. Dies gilt im Besonderen für Chitinasen und TLPs [5, 183, 184, 187, 188]. Hierbei werden diese in der Traube auch ohne Induktion durch Pathogene exprimiert, was durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt werden kann. Der Grund hierfür liegt wahrscheinlich in der Anfälligkeit der Traube gegenüber Pathogenen und Stress, was eine entwicklungsgesteuerte Expression effizienter macht als eine durch Pathogene oder Stress induzierte [21, 193]. Allerdings wurden Chitinasen und TLPs in der Regel nicht vor der *Véraison* detektiert, wie es in der vorliegenden Arbeit der Fall war (siehe 3.4.3) [5, 183, 184, 187, 188]. Eine Ausnahme stellt eine Studie dar, die eine putative Chitinase vor der *Véraison* nachweisen konnte [5].

LTP wird in den unter 4.3 erwähnten Studien kaum aufgeführt. Der Grund hierfür liegt an der relativ stabilen Expression von LTP über den gesamten Wachstumsprozess. Nur bei der Untersuchung von *Muscat Hamburg* Trauben wurden

größere Variationen in der Expressionsrate von LTP festgestellt, wobei diese während der *Véraison* am höchsten war [183].

Mehrere Studien kamen zu dem Ergebnis, dass sich in den Grünstadien PPOs im Pericarp anreichern, deren Konzentration nach der *Véraison* wieder abnimmt [5, 150, 183, 184, 187]. Die Abnahme der Expression von PPOs nach der *Véraison* kann nicht durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt, jedoch durch die verschiedenen Methoden erklärt werden. Die Analysen der Expression von Proteinen während der Reifung von Rieslingtrauben in dieser Arbeit waren stets absolute Bestimmungen. Durch den generellen Anstieg der Proteinkonzentration kommen relative und absolute Bestimmungsmethoden in diesem Fall zu unterschiedlichen Ergebnissen. Der Verlauf der Proteinexpression von Dornfeldertrauben, der in dieser Arbeit untersucht wurde, war ebenfalls relativ. Hier zeigte sich, dass die Expression von PPOs in den Reifestadien zuerst zu-, dann wieder abnahm (siehe 3.6.3).

Verschiedene Untersuchungen kamen zu dem Ergebnis, dass Invertasen nach der *Véraison* weniger stark exprimiert werden als noch in den Grünstadien [150, 184, 187]. Andere Studien beschreiben jedoch eine verstärkte Expression von Invertasen nach der *Véraison* [5, 183]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten auf eine relativ konstante Expression der Invertase in Rieslingtrauben ab dem zweiten Grünstadium hin.

4.4 Isolierung und Aufreinigung von Tyrosinase aus Trauben

In der vorliegenden Arbeit wurde im Kapitel 3.8 die erfolgreiche Isolierung und Aufreinigung von Tyrosinase aus Rieslingtrauben beschrieben. Ein besonderer Faktor hierbei war die Wahl von unreifen Trauben, die einen geringen Phenol- und einen hohen Tyrosinasegehalt aufweisen sowie die Auftrennung der Proteine über eine Größenausschlusschromatographie.

Erste detaillierte Studien über Tyrosinase aus Trauben wurden von Harel und Mayer im Jahr 1971 durchgeführt. Hierbei isolierten sie die aktive Form der Tyrosinase aus *Hymonatica*- und *Tamar*-Trauben (beide weiß) [194]. Jedoch wurde die Tyrosinase durch eine Ammonium-Sulfatfällung mit zahlreichen anderen Proteinen ausgefällt und lag somit in keiner großen Reinheit vor. Die latente

Form der Tyrosinase wurde zuerst von Sanchez-Ferrer et al. im Jahr 1989 aus roten *Monastrell*-Trauben isoliert [195]. Hierauf beruhen bis heute alle Protokolle zur Extraktion der latenten Form der Tyrosinase aus Trauben [196-199]. So wurde 1992 die latente Form aus Chloroplasten in sehr hoher Reinheit von Valero und Garcia-Carmona isoliert [199]. Im Jahr 2001 gelang es Regev et al. die aktive Form der Tyrosinase aus roten *Carignan* Trauben in hoher Reinheit zu gewinnen [200]. Hierfür wurde ein dreistufiges Verfahren benötigt. Im ersten Schritt wurde die Tyrosinase mit Hilfe von Ammoniumsulfat ausgefällt, wobei sie 50 % ihrer Aktivität verlor. Die Aufreinigung der Tyrosinase wurde danach mittels einer Ionenaustauschchromatographie und einer Gelfiltration durchgeführt. Lago-Vanzela et al. beschrieben 2011 eine schnellere Methode, um die aktive Form der Tyrosinase aus Trauben zu isolieren [197]. Diese basierte auf dem ursprünglichen Protokoll von Harel und Meyer mit Modifikationen, welche von Gonzalez et al. [201] stammen, die erfolgreich Tyrosinase aus Brombeeren isoliert hatten. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Traubenextraktionspuffer basiert auf dieser Methode von Lago-Valenza et al. [197]. Nach Extraktion der Proteine aus der Pflanzenmatrix wurden diese von Lago-Valencia allerdings durch eine Fällung mit Ethanol aufgereinigt, was, wie im Fall der Ammoniumsulfatfällung, zu Aktivitätsverlusten der Tyrosinase führt. Eine hohe Reinheit wurde hierbei nur bei der Rebsorte *BRS Clara* erreicht.

Die in der vorliegenden Arbeit entwickelte Methode zur Aufreinigung der aktiven Form der Tyrosinase aus Trauben hat drei Vorteile gegenüber voran gegangener Versuche. Sie ist:

1. Schnell: Nach Extraktion der Proteine aus der Traube wird nur ein Aufreinigungsschritt benötigt.
2. Schonend: Dieser Aufreinigungsschritt besteht aus einer Größenausschlusschromatographie, was bedeutet, dass die Tyrosinase nicht ausgefällt werden muss und somit ihre Aktivität erhalten bleibt.
3. Sauber: Durch die Auswahl unreifer Trauben mit hohem Anteil an Tyrosinase und einem geringen Gehalt an Phenolen wird ein hoher Reinheitsgrad ermöglicht.

4.5 Temperaturabhängigkeit der Tyrosinase aus Trauben

Das in dieser Arbeit ermittelte breite Temperaturoptimum der Tyrosinase aus Rieslingtrauben beim Umsatz der o-diphenolischen Substrate Kaffeesäure und Dopamin (vgl. 3.10) wurde zum Teil auch für andere Substrate festgestellt. So zeigte die Bestimmung der Temperaturabhängigkeit der latenten Tyrosinase aus *Red Globe* Trauben, dass das Diphenol Hydroxytyrosol bei Temperaturen zwischen 20°C bis 65°C mit nahezu gleicher Aktivität umgesetzt wurde [196]. Auch von 5°C bis 10°C zeigte die Tyrosinase aus *Red Globe* Trauben noch hohe Aktivität. Dies ist auch bei den in dieser Arbeit verwendeten o-diphenolischen Substraten Kaffeesäure und Dopamin der Fall. Erst bei Temperaturen größer als 70°C verminderte sich die Aktivität der Tyrosinase aus *Red Globe* Trauben stark. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass die Tyrosinase bei dieser Temperatur zu denaturieren beginnt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Messungen nur bis 60°C durchgeführt. Versuche mit Hydroxytyrosolacetat ermittelten ein weniger breites, aber immer noch weitreichendes Temperaturoptimum von 25°C bis 40°C [196]. Auch hier zeigte die Tyrosinase aus *Red Globe* Trauben bei Temperaturen zwischen 5°C bis 10 °C noch hohe Aktivität, die ungefähr bei 70% im Bezug zum Optimum lag.

Versuche mit aktiver Tyrosinase aus weißen *Airen*-Trauben und dem diphenolischen Substrat 4-Methylcatechol ließen erneut ein breites Temperaturoptimum von 20°C bis 50°C erkennen [176], wobei auch hier bei Temperaturen bis 65°C noch eine hohe Aktivität von etwa 66% im Bezug zum Maximum nachgewiesen wurde. Für Temperaturen unter 20°C wurde keine Aktivität bestimmt.

Im Kontrast hierzu wurden für andere o-diphenolische Substrate klare Maxima bezüglich des Temperaturoptimums der Tyrosinase gefunden: Versuche mit Catechol als Substrat stellten ein deutlich ausgeprägtes Temperaturoptimum von 25°C für aktive Tyrosinase aus weißen *Victoria* [202] und ebenfalls weißen *Thompson seedless* [203] Trauben fest. Für aktive Tyrosinase aus roten *Cargan* Trauben wurde mit DOPA als Substrat ebenfalls ein deutliches Temperaturoptimum von 25°C ermittelt [200].

Die hohe Aktivität von Tyrosinasen aus Trauben bei Temperaturen von 5°C bis 10°C ist aus physiologischer Sicht durchaus sinnvoll. Die Belastung der Trauben durch Pathogene ist im Herbst besonders hoch [204]. Da im Oktober im Besonderen nachts die Temperaturen unter 10°C fallen können, muss die

Traube trotzdem in der Lage sein sich vor Pathogenen zu schützen. Somit muss auch die Aktivität der Tyrosinase, die zu den PR-Proteinen zählt, gewährleistet sein. Allerdings sollte die Pathogenabwehr auch im Sommer sichergestellt sein, wenn die Temperaturen, gerade bei direkter Sonneneinstrahlung, besonders hoch sind. Dies könnte eine Erklärung für das breite Temperaturoptimum der Tyrosinase beim Umsatz bestimmter Substrate wie Kaffeesäure oder Hydroxytyrosol sein. Es ist vorstellbar, dass die verschiedenen Isoformen der Tyrosinase aus Rieslingtrauben (vgl. Abbildung 19) auch verschiedene Temperaturoptima mit klaren Maxima aufweisen, die in ihrer Gesamtheit in einem breiten Temperaturoptimum resultieren. Wie in der vorliegenden Arbeit für das Monophenol p-Cumarsäure gezeigt wurde, konnte auch schon früher durch die Bestimmung des Temperaturoptimums der Tyrosinase beim Umsatz des Monophenols p-Cresol ein deutliches Maximum gezeigt werden [176]. Allerdings lag das Temperaturoptimum der p-Cumarsäure bei 35°C, wohingegen das des p-Cresols bei 50° C lag.

Zusammenfassend lässt sich somit die in der Literatur berichtete Substratabhängigkeit des Temperaturoptimums der Tyrosinase bestätigen [197, 200, 202, 203].

Die physiologische Funktion von Tyrosinase in der Traube bzw. generell in Pflanzen ist bis heute nicht geklärt. Neben ihrer Rolle als PR-Protein wird ihre Involvierung an der Photosynthese, der Verstärkung von Wundsignalen und dem Phenylpropanoid Biosyntheseweg diskutiert [42, 72, 160, 162]. Der Einfluss auf die Biosynthesewege der Phenylpropanoide sowie zum Teil der Hydroxycoumarine, im Besonderen des Escultin, konnte für Tyrosinase aus der Walnuss gezeigt werden [160]. Für Esculin wird eine Beteiligung an Abwehrmechanismen der Pflanze diskutiert [205], jedoch ist nur wenig über dessen genaue Funktion bekannt. Weiterhin konnte demonstriert werden, dass Tyrosinase für die Bildung von phenolbasierten Pigmenten und anderer sekundärer Metabolite benötigt wird [206, 207]. Die Vielzahl an möglichen Funktionen der Tyrosinase gestaltet die qualitative Beurteilung des Umsatzes einzelner Phenole aus physiologischer Sicht schwierig. Das Vorkommen mehrerer Isoformen der Tyrosinase verkompliziert das Bild noch weiter, so dass eine Begründung wa-

rum die Tyrosinase verschiedene Substrate bei unterschiedlichen Temperaturen am effektivsten umsetzt an dieser Stelle nicht getroffen werden kann.

4.6 Antioxidative Kapazität von Wein sowie dessen phenolische Inhaltsstoffe

In Kapitel 3.11 wurde gezeigt, dass Merlot-Wein die künstlich induzierte Superoxidproduktion von THP1 und EA.hy 926 Zellen inhibiert. Bisher wurden keine Versuche zur antioxidativen Kapazität von Wein mit diesen beiden Zellkulturen durchgeführt. Insgesamt gibt es nur wenige Analysen zum Einfluss von Wein auf den Oxidationszustand von Zellkulturen, die jedoch im Wesentlichen die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen. So wurden von Pazzini et al. (2015) Erythrozyten mit Glukose und Fruktose inkubiert, um die Lipidoxidation der Zellen zu erhöhen. Diese wurde durch die Zugabe von rotem Tannatwein inhibiert [88]. Tedesco et al. untersuchten ebenfalls den Einfluss von Wein auf den Oxidationszustand von Erythrozyten, die in diesem Fall mit Peroxid inkubiert wurden, um die ROS-Konzentration der Zellen zu erhöhen [208]. Hierbei wurden drei Weine getestet: zwei Rotweine, von denen einer in Eichenfässern ausgebaut wurde, sowie ein Weißwein. Es zeigte sich, dass alle Weine die Peroxidkonzentration der Zellen erniedrigen konnten, wobei der in Eichenfässern ausgebaute Rotwein den größten Effekt mit einer fünffach höheren antioxidativen Kapazität als der untersuchte Weißwein erzielte.

Im Gegensatz zur überschaubaren Anzahl von Versuchen über den Einfluss von Wein auf den Oxidationszustand von Zellkulturen, gibt es zahlreiche *in vitro* Untersuchungen, die den Scavenger-Effekt von Wein beschreiben. Hierbei wurde der Zusammenhang zwischen phenolischen Inhaltsstoffen des Weins und seiner Scavenger-Aktivität über chemische Radikalfängerreaktionen, wie z.B. dem DPPH-Assay, gezeigt [68, 209-212]. So beschrieben zum Beispiel Zhu et al. eine positive Korrelation zwischen Phenolgehalt und Scavenger-Aktivität von insgesamt sieben Weinen [213]. In diesem Kontext zeigte eine Untersuchung von mazedonischen Rotweinen der Rebsorten Vranec und Merlot im Jahr 2012, dass die Scavenger-Aktivität dieser Weine zusammen mit der Dauer der Maischestandzeit anstieg [214]. Dies konnte für weitere neun Weißweine und 27 Rotweine bestätigt werden [215, 216]. Eine neue Methode zur

Bestimmung der Scavenger-Aktivität von Wein wurde 2016 von Agatonovic-Kustrin et al. vorgestellt [217]. Sie kombinierten eine „*high performance thin layer chromatography*“ (HPTLC) zur Auftrennung der Phenole mit einem anschließenden DPPH-Assay. Eine weitere neue Methode zur *in vitro* Bestimmung der antioxidativen Kapazität von Wein mittels „*Fourier transform infrared spectroscopy*“ (FT-IR) stammt von Preserova et al. [218].

Da die antioxidative Kapazität von Wein auf dessen Gehalt verschiedener phenolischer Inhaltsstoffe beruht, ist die Wirkung einzelner Phenole von besonderem Interesse. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die untersuchten Phenolsäuren, Stilbene und Chalkone, mit Ausnahme der 4-Hydroxybenzoesäure, sowohl Scavenger-Aktivität im DPPH-Test als auch antioxidative Wirkung auf Zellkulturen aufweisen.

Obwohl unzählige *in vitro* Analysen zur Scavenger-Aktivität von pflanzlichen Phenolen durchgeführt wurden [102, 138, 219-221], die durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt werden, gibt es nur wenige Untersuchungen zu deren Wirkung auf Zelllinien und keine, die den Einfluss von Tyrosinase miteinbezieht. 2014 untersuchten Liang et al. den Einfluss von Phenolen aus 24 Traubensorten auf den oxidativen Zustand von HepG2 Zellen [222]. Allerdings wurden hierbei keine einzelnen Phenole getestet, sondern ein Extrakt aller Phenole aus der jeweiligen Traubensorte. Dabei konnte der proportionale Zusammenhang von Phenolgehalt und antioxidativer Wirkung von Trauben auf Zellkulturen bestätigt werden. Allerdings gilt es bei der Interpretation von Versuchen mit Trauben darauf zu achten, dass während der Weinherstellung nur ein Teil der Phenole im Endprodukt zu finden sind [210]. Den größten Einfluss hierbei haben Maischestandzeit und Rebsorte. Außerdem muss bedacht werden, dass die antioxidative Kapazität von Mischungen aus mehreren phenolischen Substanzen höher sein kann als die Summe der Einzelnen, was auf synergistische Effekte schließen lässt [223]. Antagonistische Effekte können aber nicht ausgeschlossen werden [224], was in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht überprüft wurde.

Wang et al. veröffentlichten im Jahr 2016 Untersuchungen zur antioxidativen Wirkung von phenolischem Extrakt aus der Traube sowie Gallussäure im Einzelnen auf Caco-2 Zellen [225]. Auch hier wurde deren antioxidative Wirkung

auf Zellkulturen bestätigt, so wie es für Gallussäure auch in der vorliegenden Arbeit in Bezug auf THP1 und EA.hy 926 Zellen gezeigt wurde.

Versuche mit „*human umbilical vein-derived endothelial cells*“ (HUVEC) wurden 2015 von Migliori et al. publiziert [99]. Es wurde gezeigt, dass Kaffeesäure und Tyrosol die ROS-Produktion inhibieren, die zuvor auf verschiedene Weise induziert wurde. Weiterhin stellte sich heraus, dass Kaffeesäure die NO-Produktion der HUVEC-Zellen erhöhte. Weitere Versuche mit Kaffeesäure und Tyrosol wurden von Bertelli et al. an „*peripheral blood mononuclear cells*“ (PBMC) durchgeführt [226]. Auch hier konnte die antioxidative Kapazität dieser beiden Phenole bestätigt werden.

Eine Studie von Khan et al. an *Swiss Albino* Mäusen im Jahr 2012 konnte zeigen, dass die Applikation von Kaffeesäure auf die Haut der Tiere kutane Peroxidbildung inhibierte [84]. Außerdem konnte auf diese Weise die Lipidperoxidation unterdrückt sowie die Aktivitäten von mehreren antioxidativ wirkenden Enzymen, wie Katalase oder Glutathionperoxidase, erhöht werden.

Versuche an Mikrosomen von Leberzellen aus Ratten von Reszk et al. im Jahr 2002 konnten zeigen, dass Phloretin die Lipidoxidation inhibiert [227].

Zusammenfassend lässt sich so eine allgemein hohe antioxidative Kapazität phenolischer Weinhaltstoffe auf Zellkulturen beschreiben.

4.6.1 Bioverfügbarkeit von Phenolen sowie deren Tyrosinaseoxidationsprodukte

Bei der allgemein hohen antioxidativen Kapazität phenolischer Weinhaltstoffe auf Zellkulturen, wie sie auch in meiner Dissertation gezeigt wurde, stellt sich die Frage nach der eigentlichen Bioverfügbarkeit der Phenole sowie der Wirkung im menschlichen Körper, besonders im Zusammenhang auf Herz-Kreislaufkrankungen. Diese Frage umfasst mehrere Abschnitte bezüglich der Verarbeitung der phenolischen Weinhaltstoffe durch den Organismus:

1. Absorption
2. Biotransformation (durch Konjugation)
3. Konzentration im Plasma und in Zellen

Phenolische Weininhaltsstoffe werden nicht alle auf dieselbe Weise vom menschlichen Körper absorbiert [82]. Bisher ist nur ein einziger aktiver Transportmechanismus für phenolische Weininhaltsstoffe bekannt. Hierbei handelt es sich um einen Na^+ -abhängigen Transport von Ferulasäure, der im Leerdarm von Ratten entdeckt wurde [228]. Allgemein können phenolische Aglycone bereits im Dünndarm absorbiert werden [229]. Allerdings müssen die in der Nahrung wesentlich häufiger auftretenden glykosylierten und veresterten Varianten erst von Enzymen oder Mikroorganismen hydrolysiert werden. Die Hydrolyse durch Mikroorganismen erfolgt im Dickdarm. Hierbei werden Flavonole, Flavone, Flavanone und Flavanole über mehrere Zwischenschritte weiter zu Benzoesäuren metabolisiert [81, 82]. Dies bedeutet, dass die in dieser Arbeit untersuchten Phenole Ethylgallat, Phlorizin und Polydatin zuerst hydrolysiert werden, bevor sie ins Blut gelangen und das einige Flavonoidklassen zu den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Hydroxybenzoesäuren metabolisiert werden können. Kaftarsäure kann jedoch scheinbar in ihrer natürlichen Form, genau wie Kaffeesäure, bereits im Magen absorbiert werden und finden sich in freier Form im Plasma vor [230].

Wurden die Phenole absorbiert, unterliegen sie im Wesentlichen drei Arten der Konjugation: Methylierung, Sulfatierung und Glukuronisation [82]. So katalysiert zum Beispiel die Catechol-O-Methyltransferase die Methylierung von o-Diphenolen wie der Kaffeesäure zur Ferulasäure. Unabhängig von der Art der Konjugation ist deren Rate sehr hoch und es finden sich in der Regel nur geringe Dosen von unkonjugierten Phenolen im Plasma. Resveratrol wird bevorzugt in der 3-O-Position konjugiert [231]. In Tieren ist die 4-O-Methylierung von Gallussäure eine bekannte metabolische Reaktion [232]. Diese Biotransformationen haben unterschiedlichen Einfluss auf die Scavenger-Aktivität der Phenole. Die Hydrolyse der Säuregruppe bei Hydroxybenzoe- und Hydroxyzimtsäuren sollten hierbei den geringsten Einfluss haben, wie Versuche der vorliegenden Arbeit gezeigt haben. In Kapitel 3.13 wurden keine Unterschiede in der Scavenger-Aktivität zwischen Kaffee- und Kaftarsäure sowie Gallussäure und Ethylgallat beobachtet (siehe Abbildung 54). Die Konjugationsreaktionen hingegen haben theoretisch, je nach genauer Position, eine größere Auswirkung. So würde eine Methylierung der Kaffeesäure zur Ferulasäure nur einen kleinen Einfluss auf deren Scavenger-Aktivität haben (vgl. Abbildung 54). Findet die

Methylierung jedoch in 4-O-Position statt, könnte ein beim Scavenging gebildetes Radikal nicht mehr über das gesamte Molekül delokalisiert werden und die Scavenger-Aktivität sollte massiv zurückgehen. Ähnliches gilt für die Gallussäure. Hier ließe eine Methylierung in 4-O-Position keine Möglichkeit mehr zu Radikale durch Wasserstoffbrückenbindungen zu stabilisieren. Eine Konjugation in 3- oder 5-O-Position sollte also theoretisch wesentlich stabilere Radikale ermöglichen.

Da Resveratrol bevorzugt in 3-O-Position konjugiert wird, ist auch hier der Rückgang der Scavenger-Aktivität minimal, da, wie unter 3.12.4 beschrieben, das stabilste Radikal bei Oxidation der Hydroxylgruppe in 4'-Position entsteht.

Außerdem wurde beobachtet, dass in Ratten glukuronisiertes Resveratrol scheinbar nach einiger Zeit wieder in seiner freien Form in den Organen nachzuweisen ist [233]. Weitere Reaktionen, die konjugierte Phenole wieder in ihre natürliche Form hydrolysieren, sind nicht auszuschließen [82].

Viele Untersuchungen haben gezeigt, dass die antioxidative Kapazität von menschlichem Plasma nach dem Konsum von Wein signifikant erhöht ist [89, 90, 234-237]. Dies zeigt, dass auch die Metabolite der phenolischen Weinhaltstoffe noch antioxidativ wirken können. Hierbei ist allerdings festzuhalten, dass Versuche von Simonetti et al. nach einmaligem Konsum von 300 ml Rotwein auch freie Kaffeesäure im Plasma (27 nM) nachweisen konnten [237]. Die erhöhte antioxidative Kapazität von menschlichem Plasma nach Weinkonsum ist besonders im Bezug zur LDL-Oxidation interessant. Oxidation von Lipiden in LDL führt zu dessen Konformationsänderung und damit zu einer höheren Affinität von LDL zum monozytischen Makrophagensystem von arteriellen Zellwänden, was zu einer Steigerung arteriosklerotischen Prozessen führt [93]. Nach moderatem Weinkonsum konnte metabolisiertes Resveratrol direkt in LDL nachgewiesen werden [238]. *In vitro* Versuche konnten die Inhibierung von LDL-Oxidationen durch Phenole aus Wein, Trauben oder anderen Früchten zeigen [224, 239-242]. Versuche *in vivo* mit menschlichem Plasma konnten diesbezüglich keine eindeutigen Ergebnisse liefern. Einige Studien konnten keinen Einfluss von Weinkonsum auf die LDL-Oxidation feststellen [234, 243-245], andere konnten eine reduzierte Anfälligkeit von LDL im Plasma für Oxidation zeigen [89, 90, 246-250]. Dieser Widerspruch wird durch die unterschiedlichen Methoden, wie z.B. die verwendete EDTA-Konzentration, erklärt [234]. Beson-

ders interessant ist eine Studie von Di Renzo et al., die neben dem Einfluss von Weinkonsum auch den einer zusätzlich zugeführten McDonalds-Mahlzeit untersuchten [89, 90]. Der Konsum von Rotwein alleine hatte keinen Einfluss auf LDL-Oxidation im Plasma im Vergleich zu Kontrollproben. Der Verzehr einer McDonalds-Mahlzeit erhöhte diese. Wurde der Konsum von Rotwein mit dem der McDonalds-Mahlzeit kombiniert, entsprach die LDL-Oxidation den Kontrollproben. Dies zeigt, dass die Nahrungsaufnahme einen starken Einfluss auf die Ergebnisse dieser Studien haben kann und so eventuell auch die Unterschiede der Studien zueinander erklärt. Außerdem sprechen diese Ergebnisse dafür, dass eine phenolreiche Kost die oxidative Kapazität des Plasmas nicht per se erniedrigt, sondern negative Einflüsse von fettreicher Nahrung inhibieren kann. Die Scavenger-Aktivität von phenolischen Weininhaltsstoffen innerhalb menschlicher Zellen wird von manchen Forschern aufgrund der geringen Konzentration der Phenole in den Zellen bezweifelt [251]. Sie halten den Einfluss der Phenole auf das Signaltransduktionsystem der Zelle für den entscheidenden Punkt, der für die gesundheitsfördernde Wirkung von Phenolen verantwortlich ist. In der vorliegenden Arbeit ließen lediglich die Tyrosinaseoxidationsprodukte der Vanillinsäure Rückschlüsse auf eine Involvierung in diese Prozesse zu (vgl. 3.13.2). Andererseits wird argumentiert, dass über dauerhaften Konsum von phenolischen Substanzen über die Nahrung und der daraus folgenden ständigen Einwirkung von diesen auf Zellen ein antioxidativer Effekt auch bei geringer Phenolkonzentration im Plasma erzielt werden kann [252].

Es stellt sich die Frage, ob die in meiner Doktorarbeit gezeigte positive Wirkung von Tyrosinase auf die antioxidative Kapazität mancher phenolischer Weininhaltsstoffe auch im menschlichen Körper zum Tragen kommt. Auch hier müssen Absorption, Metabolismus und Aufnahme in Zellen berücksichtigt werden. Dass die Oxidationsprodukte von Zellen aufgenommen werden können, zeigten die Zellkulturversuche mit Kaffeesäure (siehe Abbildungen 48, 49, 55 und 56), da hier kein Edukt mehr im Reaktionsansatz war (vgl. Abb. 46) und somit die antioxidative Kapazität dem des verwendeten Puffers und nicht derjenigen der Kaffeesäure entsprochen hätte. Gleiches gilt für alle Stoffe die durch Oxidation eine höhere antioxidative Kapazität zeigten, also Resveratrol, Polydatin, Vanillinsäure, Phloretin und Phlorizin. Eine passive Diffusion ist hier der wahrschein-

lichste Prozess, da eine große Anzahl verschiedener Oxidationsprodukte entstanden sind und die Existenz spezifischer Transporter für viele dieser Produkte nur schwer vorstellbar ist. Um die Fragen der Absorption und Biotransformation beantworten zu können, müssten in zukünftigen Versuchen zuerst die Oxidationsprodukte identifiziert werden. Diese könnten dann in kontrollierten Studien Versuchspersonen gezielt zugeführt werden und deren Absorption und Biotransformation sowie Konzentration im Plasma bestimmt werden, wie es bereits für einige der Edukte getan wurde. Interessant wäre zusätzlich, ob sich, wie im Fall von Resveratrol, auch Tyrosinaseoxidationsprodukte in LDL nachweisen lassen, da im Fall der LDL-Oxidation die Scavenger-Aktivität der Phenole im Gegensatz zu zellinternen Prozessen am ehesten zum Tragen kommt.

Generell werden die Metabolite der phenolischen Substanzen relativ schnell aus dem Plasma eliminiert, weshalb der tägliche Verzehr von pflanzlicher, phenolreicher Nahrung empfohlen wird [82].

4.6.1.1 Antioxidative Wirkung von Phenolen im Darm

Die Darmschleimhaut ist ständig der Wirkung von Oxidantien aus der Nahrung ausgesetzt. Dies kann, im Fall einer chronischen Exponierung, zur unkontrollierten Generierung von freien Radikalen, einem zellulären Redoxungleichgewicht und DNA-Schäden führen, was letztendlich in der Entstehung von chronisch entzündlichen Darmkrankheiten und der Bildung von Tumoren resultieren kann [253, 254]. Die Konzentration von phenolischen Substanzen im Dickdarm kann mehrere hundert $\mu\text{mol/l}$ erreichen [229]. Zusammen mit wenigen Carotinoiden sind Phenole die einzigen antioxidativ wirkenden Stoffe aus der Nahrung, die hier ihre Wirkung entfalten können, da andere Antioxidantien aus der Nahrung wie die Vitamine C und E bereits im Dünndarm absorbiert werden [82]. Dies bedeutet, dass auch die Phenole aus Wein und Traube, die nicht bereits im Dünndarm absorbiert werden, im Dickdarm noch ihre Scavenger-Aktivität voll entfalten können, da sie hier noch in ihrer natürlichen Form vorliegen und nicht biotransformiert und konjugiert wurden. Glykosylierten Phenole, die im Dickdarm hydrolysiert werden [82], erhöhen durch die Generierung einer freien aromatischen Hydroxylgruppe sogar ihre Scavenger-Aktivität. Auch die im Wein durch Tyrosinase entstandenen Oxidationsprodukte können im Darm nach Weingenuss, ohne die Einschränkung durch Biotransformation und Konjugati-

on, antioxidativ wirken. Dass phenolische Substanzen die Entwicklung von Darmkrebs in der Tat inhibieren können, wurde zumindest in Tiermodellversuchen (Dimethylhydrazinmodell (DMH-Model)) gezeigt [255, 256].

4.6.2 Einfluss von Laccase auf die antioxidative Kapazität von Wein, sowie phenolischer Weininhaltsstoffe

Die unter 3.12 und 3.13 beschriebenen Versuche zum Einfluss von Tyrosinase auf Scavenger-Aktivität sowie antioxidative Kapazität phenolischer Weininhaltsstoffe wurden im Rahmen einer Kooperation mit dem Institut für Mikrobiologie und Weinforschung der Universität Mainz auch für eine weitere Polyphenoloxi-dase, der Laccase, durchgeführt. Laccasen gelangen über eine Infektion mit *Botrytis cinerea* in die Traube und somit auch in den Wein [18]. Wie die Tyro-sinase ist auch die Laccase in der Lage Diphenole zu Chinonen zu oxidieren, allerdings fehlt ihr die Möglichkeit o-Chinone aus Monophenolen zu bilden [173, 174].

Versuche mit fünf verschiedenen Rotweinen (Weingut Gres, Appenheim) zeig-ten eine Erniedrigung ihrer antioxidativen Kapazität nach Zugabe von Laccase. Dies steht im starken Kontrast zu dem in meiner Doktorarbeit ermittelten positi-ven Einfluss der Tyrosinase aus *Agaricus bisporus* (vgl. 3.11). Besonders deut-lich war der Rückgang der antioxidativen Kapazität nach Zugabe von Laccase bei den Weinen Merlot, Lemberger und Spätburgunder. In THP1 Zellen war dieser Rückgang nicht so stark ausgeprägt wie in EA.hy 926 Zellen. Durch die Zugabe von Laccase wurde die antioxidative Wirkung von Spätburgunder in EA.hy 926 Zellen fast komplett unterbunden. Die eingesetzte Enzymkonzentra-tion entsprach hierbei nur einem Fünftel der Maximalkonzentration der entspre-chen den Versuche mit Tyrosinase aus *Agaricus bisporus* (siehe Kapitel 3.11, Abbildungen 44 und 45). Eine Betrachtung des Einflusses von Oxidation durch Laccase auf die Scavenger-Aktivität einzelner phenolischer Weininhaltsstoffe zeigte, dass Laccase entweder keinen oder, im Gegensatz zur Tyrosinase, ei-nen negativen Einfluss hatte. Besonders deutlich war ein Rückgang der Scavenger-Aktivität der Produkte aus Kaftarsäure, Sinapinsäure, Cyanidin-3-O-Glykosid, Ferulasäure, Resveratrol und Polydatin zu beobachten. In der Zellkul-tur war besonders der negative Einfluss von Laccase auf die antioxidative Wir-kung von Resveratrol ausgeprägt. Während die Verminderung in EA.hy 926

Zellen noch moderat ausfiel, war der Rückgang der antioxidativen Kapazität in THP1 Zellen massiv. Weitere Abnahmen der antioxidativen Wirkung wurden bei Kampferol und Cyanidin nach Oxidation durch Laccase in EA.hy 926 Zellen festgestellt. Die einzigen Substrate, deren antioxidative Kapazität sich durch Laccaseoxidation erhöhten, waren Syringaldehyd (THP1 und EA.hy 926 Zellen) und Phlorizin (EA.hy 926 Zellen). Der Hauptgrund für den unterschiedlichen Effekt auf die Scavenger-Aktivität von phenolischen Weininhaltsstoffen nach Laccase- und Tyrosinaseoxidation liegt vermutlich in der Möglichkeit der Tyrosinase o-Chinone aus Monophenolen zu bilden, die den Grundstein dafür legt, dass, nach autokatalytischen intramolekularen Konversionen, oder auch Kondensationen mit anderen Chinonen, benachbarte aromatische Hydroxylgruppen entstehen.

4.6.3 Abschließende Betrachtung des Einflusses von Tyrosinase auf die antioxidative Kapazität von Wein sowie phenolischer Weininhaltsstoffe

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die Wirkung von Tyrosinase auf die Scavenger-Aktivität, als auch auf die antioxidative Kapazität von phenolischen Weininhaltsstoffen in Zellkulturen beschrieben. Insgesamt war hierbei eine positive Wirkung zu beobachten. Weiterhin wurde gezeigt, dass Tyrosinase während der Herstellung von Riesling bei nur geringer Mostschwefelung bis zur Gärung aktiv ist. Somit hat die Oxidation von phenolischen Weininhaltsstoffen durch Tyrosinase, bezüglich der antioxidativen Wirkung, einen positiven Einfluss auf das Produkt Wein.

Bisherige Untersuchungen der Polyphenolaseaktivität während der Weinbereitung wurden bisher mit den weißen Rebsorten *Niagara*, *Dutchess*, *Raviat 51* [177], *Semillon* und *Clairrette* sowie der roten Rebsorte *Carignane* [175] durchgeführt. Allerdings wird hier nicht zwischen Laccase- und Tyrosinaseaktivität unterschieden. Es wurde keine Angabe zu einem eventuellen Befall der Trauben mit *Botrytis cinerea* gemacht. Zur Extraktion der Polyphenoloxidasen werden in beiden Studien ein klassisches Protokoll zur Isolierung der aktiven Form der Tyrosinase genutzt. Ob hierbei auch Laccase extrahiert wird, kann an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden. Zur Überprüfung der Enzymaktivität wurde in allen Fällen Catechol genutzt, welches auch von Laccase umgesetzt

werden kann [257, 258]. In allen untersuchten Fällen war die Polyphenolaseaktivität nach der Gärung nicht mehr nachweisbar, was durch die Ergebnisse dieser Arbeit für den Fall der Tyrosinase auch bestätigt werden kann. Dies bedeutet, dass die positive Wirkung von Tyrosinase auf die antioxidative Kapazität bis zur Gärung zum Tragen kommen kann.

Verschiedene Mostverarbeitungsvarianten können den positiven Effekt der Tyrosinase auf die antioxidative Wirkung von Phenolen minimieren oder sogar ausschließen. Durch reduktive Vinifikationen wird die Tyrosinaseaktivität im Most aufgrund der Anwendung von Schwefel und dem Ausschluss von Sauerstoff unterbunden, um eine exzessive Bräunung des Mostes zu verhindern [59, 60]. Da Tyrosinase spätestens bei der Gärung inaktiviert wird, kann der positive Effekt der Tyrosinase auf die antioxidative Kapazität nicht ausgenutzt werden. Andererseits führt eine Hyperoxidation des Mostes, bei der kein Schwefel zugesetzt und dem Most aktiv Sauerstoff zugeführt wird, zur vollständigen Umsetzung der im Most enthaltenen phenolischen Inhaltsstoffen. Aufgrund nicht-enzymatischer Oxidation zu unlöslichen Polymeren werden die Phenole auf diese Weise dem Wein entzogen [60] und können ihre gesundheitsfördernde Wirkung nicht mehr entfalten. Diesbezüglich wird somit eine „Normalverarbeitung“ oder auch eine oxidative Vinifikation empfohlen. Bei der Normalverarbeitung wird dem Most zwar Schwefel zugesetzt, aber es werden keine Maßnahmen zur Vermeidung von Sauerstoffaufnahme getroffen, wohingegen bei der oxidativen Vinifikation die Schwefelung erst nach der Gärung durchgeführt wird [60]. Im Idealfall sollte die Tyrosinase gerade so gut wirken, dass nicht zu viele Oxidationsprodukte gebildet werden, die ausfallen oder die Farbe des Weins negativ beeinflussen, aber auch nicht so wenige, dass die positive Wirkung der Tyrosinase auf die antioxidative Kapazität ausbleibt. Ein Problem hierbei stellen allerdings Moste dar, deren Trauben mit *Botrytis cinerea* infiziert gewesen sind und somit Laccase enthalten. Eine Normalverarbeitung bzw. oxidative Vinifikation würde auch die Umsetzung von Phenolen durch Laccasen begünstigen. Wie unter 4.6.2 gezeigt, kann sich die Laccaseaktivität allerdings negativ auf die antioxidative Kapazität des Weins auswirken. Hierbei könnte die Entwicklung und Anwendung eines spezifischen Laccasehemmers die gesundheitsfördernde Wirkung von Weinen noch weiter verbessern.

6 Literatur

1. Soleas, G. J., Diamandis, E. P., and Goldberg, D. M. (1997) Wine as a biological fluid: History, production, and role in disease prevention, *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 11, 287-313.
2. McGovern, P. E., Glusker, D. L., Exner, L. J., and Voigt, M. M. (1996) Neolithic resinated wine, *Nature* 381, 480-481.
3. Decker, H., König, H., and Zwickel, W. (2015) *Wo aber der Wein fehlt, stirbt der Reiz des Lebens. Aspekte des Kulturguts Wein*, Nünnerich-Asmus.
4. Vivier, M. A., and Pretorius, I. S. (2002) Genetically tailored grapevines for the wine industry, *Trends in Biotechnology* 20, 472-478.
5. Martinez-Esteso, M. J., Selles-Marchart, S., Lijavetzky, D., Pedreno, M. A., and Bru-Martinez, R. (2011) A DIGE-based quantitative proteomic analysis of grape berry flesh development and ripening reveals key events in sugar and organic acid metabolism, *Journal of Experimental Botany* 62, 2521-2569.
6. Zhang, J., Ma, H., Feng, J., Zeng, L., Wang, Z., and Chen, S. (2008) Grape berry plasma membrane proteome analysis and its differential expression during ripening, *Journal of Experimental Botany* 59, 2979-2990.
7. Deutsches Weininstitut - Mainz (2015) *Deutscher Wein Statistik 2014/2015*.
8. Gray, R., and Tanesini, A. (2010) Perception and Action: The Taste Test, *Philosophical Quarterly* 60, 718-734.
9. Hardie, W. J., P., O. b. T., and Jaudzems, V. G. (1996) Morphology, anatomy and development of the pericarp after anthesis in grape, *Vitis vinifera* L., *Australian Journal of Grape and Wine Research* 2, 97-142.
10. Pratt, C. (1971) Reproductive Anatomy in Cultivated Grapes - Review, *American Journal of Enology and Viticulture* 22, 92-&.
11. Coombe, B. G. (1992) Research on Development and Ripening of the Grape Berry, *American Journal of Enology and Viticulture* 43, 101-110.
12. Harris, J. M., Kriedemann, P. E., and Possingham, J. V. (1968) Anatomical aspects of grape berry development, *Vitis* 7, 106-119.
13. Coombe, B. G., and McCarthy, M. G. (2008) Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening, *Australian Journal of Grape and Wine Research* 6, 131-135.

14. Boss, P. K., Davies, C., and Robinson, S. P. (1996) Analysis of the Expression of Anthocyanin Pathway Genes in Developing *Vitis vinifera* L. cv *Shiraz* Grape Berries and the Implications for Pathway Regulation, *Plant Physiology* 111, 1059-1066.
15. Davies, C., and Robinson, S. P. (1996) Sugar accumulation in grape berries - Cloning of two putative vacuolar invertase cDNAs and their expression in grapevine tissues, *Plant Physiology* 111, 275-283.
16. Ruffner, H. P., and Hawker, J. S. (1977) Control of Glycolysis in Ripening Berries of *Vitis-Vinifera*, *Phytochemistry* 16, 1171-1175.
17. Monteiro, S., Picarra-Pereira, M. A., Teixeira, A. R., Loureiro, V. B., and Ferreira, R. B. (2003) Environmental conditions during vegetative growth determine the major proteins that accumulate in mature grapes, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 4046-4053.
18. Claus, H., Sabel, A., and König, H. (2014) Wine Phenols and Laccase: an ambivalent relationship, in *Wine: Phenolic Composition, Classification and Health Benefits* (Rayess, Y. E., Ed.), pp 155-185, Nova publishers.
19. Ferreira, R. B., Picarra-Pereira, M. A., Monteiro, S., Loureiro, V. B., and Teixeira, A. R. (2001) The wine proteins, *Trends in Food Science & Technology* 12, 230-239.
20. Linthorst, H. J. M. (1991) Pathogenesis-Related Proteins of Plants, *Critical Reviews in Plant Sciences* 10, 123-150.
21. Robinson, S. P., Jacobs, A. K., and Dry, I. B. (1997) A class IV chitinase is highly expressed in grape berries during ripening, *Plant Physiology* 114, 771-778.
22. Vincenzi, S., and Curioni, A. (2005) Anomalous electrophoretic behavior of a chitinase isoform from grape berries and wine in glycol chitin-containing sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis gels, *Electrophoresis* 26, 60-63.
23. Derckel, J. P., Audran, J. C., Haye, B., Lambert, B., and Legendre, L. (1998) Characterization, induction by wounding and salicylic acid, and activity against *Botrytis cinerea* of chitinases and beta-1,3-glucanases of ripening grape berries, *Physiologia Plantarum* 104, 56-64.
24. Ebrahim, S., Usha, K., and Singh, B. (2011) Pathogenesis-related (PR)-proteins: Chitinase and beta-1,3-glucanase in defense mechanism against malformation in mango (*Mangifera indica* L.), *Scientia Horticulturae* 130, 847-852.
25. Kasprzewska, A. (2003) Plant chitinases--regulation and function, *Cellular & Molecular Biology Letters* 8, 809-824.
26. Beintema, J. J. (1994) Structural features of plant chitinases and chitin-binding proteins, *FEBS Letters* 350, 159-163.

27. Kumar, H. G. A., Hegde, V. L., Shetty, S. M., and Venkatesh, Y. P. (2013) Characterization and Gene Cloning of an Acidic Thaumatin-Like Protein (TLP 1), an Allergen from *Sapodilla* Fruit (Manilkara zapota), *Allergology International* 62, 447-462.
28. Tattersall, D. B., van Heeswijck, R., and Hoj, P. B. (1997) Identification and characterization of a fruit-specific, thaumatin-like protein that accumulates at very high levels in conjunction with the onset of sugar accumulation and berry softening in grapes, *Plant Physiology* 114, 759-769.
29. Edens, L., Heslinga, L., Klok, R., Ledebøer, A. M., Maat, J., Toonen, M. Y., Visser, C., and Verrips, C. T. (1982) Cloning of cDNA encoding the sweet-tasting plant protein thaumatin and its expression in *Escherichia coli*, *Gene* 18, 1-12.
30. Hejgaard, J., Jacobsen, S., and Svendsen, I. (1991) Two antifungal thaumatin-like proteins from barley grain, *FEBS Letters* 291, 127-131.
31. Ho, V. S., Wong, J. H., and Ng, T. B. (2007) A thaumatin-like antifungal protein from the emperor banana, *Peptides* 28, 760-766.
32. Pastorello, E. A., Farioli, L., Pravettoni, V., Ispano, M., Scibola, E., Trambaioli, C., Giuffrida, M. G., Ansaloni, R., Godovac-Zimmermann, J., Conti, A., Fortunato, D., and Ortolani, C. (2000) The maize major allergen, which is responsible for food-induced allergic reactions, is a lipid transfer protein, *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 106, 744-751.
33. Cammue, B. P., Thevissen, K., Hendriks, M., Eggermont, K., Goderis, I. J., Proost, P., Van Damme, J., Osborn, R. W., Guerbet, F., Kader, J. C., and et al. (1995) A potent antimicrobial protein from onion seeds showing sequence homology to plant lipid transfer proteins, *Plant Physiology* 109, 445-455.
34. Cheng, C. S., Samuel, D., Liu, Y. J., Shyu, J. C., Lai, S. M., Lin, K. F., and Lyu, P. C. (2004) Binding mechanism of nonspecific lipid transfer proteins and their role in plant defense, *Biochemistry* 43, 13628-13636.
35. Kader, J. C. (1996) Lipid-Transfer Proteins in Plants, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47, 627-654.
36. Wigand, P., Tenzer, S., Schild, H., and Decker, H. (2009) Analysis of protein composition of red wine in comparison with rose and white wines by electrophoresis and high-pressure liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS), *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 4328-4333.
37. Porntaveewat, W., Takayanagi, T., and Yokotsuka, K. (1994) Purification and Properties of Invertase from Muscat-Bailey-a Grapes, *Journal of Fermentation and Bioengineering* 78, 288-292.

38. Dambrouck, T., Marchal, R., Marchal-Delahaut, L., Parmentier, M., Maujean, A., and Jeandet, P. (2003) Immunodetection of proteins from grapes and yeast in a white wine, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 2727-2732.
39. Roitsch, T., Balibrea, M. E., Hofmann, M., Proels, R., and Sinha, A. K. (2003) Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein, *Journal of Experimental Botany* 54, 513-524.
40. Coupe, S. A., Taylor, J. E., and Roberts, J. A. (1997) Temporal and spatial expression of mRNAs encoding pathogenesis-related proteins during ethylene-promoted leaflet abscission in *Sambucus nigra*, *Plant Cell and Environment* 20, 1517-1524.
41. Decker, H., Schweikardt, T., and Tucek, F. (2006) The first crystal structure of tyrosinase: all questions answered?, *Angewandte Chemie. International Ed. In English* 45, 4546-4550.
42. Mayer, A. M. (2006) Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A review, *Phytochemistry* 67, 2318-2331.
43. Rolff, M., Schottenheim, J., Decker, H., and Tucek, F. (2011) Copper-O₂ reactivity of tyrosinase models towards external monophenolic substrates: molecular mechanism and comparison with the enzyme, *Chem Soc Rev* 40, 4077-4098.
44. Solem, E., Tucek, F., and Decker, H. (2016) Tyrosinase versus Catechol Oxidase: One Asparagine Makes the Difference, *Angewandte Chemie. International Ed. In English* 55, 2884-2888.
45. Sarry, J. E., Sommerer, N., Sauvage, F. X., Bergoin, A., Rossignol, M., Albagnac, G., and Romieu, C. (2004) Grape berry biochemistry revisited upon proteomic analysis of the mesocarp, *Proteomics* 4, 201-215.
46. Peng, Z. K., Pocock, K. F., Waters, E. J., Francis, I. L., and Williams, P. J. (1997) Taste properties of grape (*Vitis vinifera*) pathogenesis-related proteins isolated from wine, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 4639-4643.
47. Giribaldi, M., and Giuffrida, M. G. (2010) Heard it through the grapevine: proteomic perspective on grape and wine, *J Proteomics* 73, 1647-1655.
48. Falconer, R. J., Marangon, M., Van Sluyter, S. C., Neilson, K. A., Chan, C., and Waters, E. J. (2010) Thermal stability of thaumatin-like protein, chitinase, and invertase isolated from *Sauvignon blanc* and *Semillon* juice and their role in haze formation in wine, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 975-980.
49. Marangon, M., Van Sluyter, S. C., Neilson, K. A., Chan, C., Haynes, P. A., Waters, E. J., and Falconer, R. J. (2011) Roles of Grape Thaumatin-like Protein and Chitinase in White Wine Haze Formation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 733-740.

50. Waters, E. J., Shirley, N. J., and Williams, P. J. (1996) Nuisance proteins of wine are grape pathogenesis-related proteins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 3-5.
51. Schneider, V. (2005) Wieviel Bentonit benötigt der Wein?, *Die Winzer-Zeitung* 2, 32-34.
52. Blade, W. H., and Boulton, R. (1988) Adsorption of Protein by Bentonite in a Model Wine Solution, *American Journal of Enology and Viticulture* 39, 193-199.
53. Majewski, P., Barbalet, A., and Waters, E. J. (2011) \$1 billion hidden cost of bentonite fining, *Australian & New Zealand Grapegrower & Winemaker* 569, 58-62.
54. Wigand, P., Blettner, M., Saloga, J., and Decker, H. (2012) Prevalence of wine intolerance: results of a survey from Mainz, Germany, *Dtsch Arztebl Int* 109, 437-444.
55. Pastorello, E. A., Farioli, L., Pravettoni, V., Ortolani, C., Fortunato, D., Giuffrida, M. G., Perono Garoffo, L., Calamari, A. M., Brenna, O., and Conti, A. (2003) Identification of grape and wine allergens as an endochitinase 4, a lipid-transfer protein, and a thaumatin, *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 111, 350-359.
56. Vassilopoulou, E., Zuidmeer, L., Akkerdaas, J., Tassios, I., Rigby, N. R., Mills, E. N., van Ree, R., Saxoni-Papageorgiou, P., and Papadopoulos, N. G. (2007) Severe immediate allergic reactions to grapes: part of a lipid transfer protein-associated clinical syndrome, *International Archives of Allergy and Immunology* 143, 92-102.
57. Vassilopoulou, E. V., Zuidmeer, L., Akkerdaas, J., Rigby, N., Moreno, F. J., Papadopoulos, N. G., Saxoni-Papageorgiou, P., Mills, C., and van Ree, R. (2007) Optimized techniques for the extraction of grape allergens appropriate for *in vivo* and *in vitro* testing and diagnosis, *Molecular Nutrition & Food Research* 51, 360-366.
58. Jaeckels, N., Bellinghausen, I., Fronk, P., Heydenreich, B., Saloga, J., and Decker, H. (2015) Assessment of sensitization to grape and wine allergens as possible causes of adverse reactions to wine: a pilot study, *Clin Transl Allergy* 5, 21.
59. Macheix, J. J., Sapis, J. C., and Fleuriet, A. (1991) Phenolic compounds and polyphenoloxidase in relation to browning in grapes and wines, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 30, 441-486.
60. Schneider, V. (2008) Haltbarkeit von Weinen beeinflussen, *Der Winzer* 09, 10-14.
61. Waters, E. J., Pellerin, P., and Brillouet, J. M. (1994) A *Saccharomyces* Mannoprotein That Protects Wine from Protein Haze, *Carbohydrate Polymers* 23, 185-191.

62. Blasco, L., Vinas, M., and Villa, T. G. (2011) Proteins influencing foam formation in wine and beer: the role of yeast, *International Microbiology* 14, 61-71.
63. Renaud, S., and de Lorgeril, M. (1992) Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease, *Lancet* 339, 1523-1526.
64. Rimm, E. B., Giovannucci, E. L., Willett, W. C., Colditz, G. A., Ascherio, A., Rosner, B., and Stampfer, M. J. (1991) Prospective study of alcohol consumption and risk of coronary disease in men, *Lancet* 338, 464-468.
65. Frankel, E. N., Kanner, J., German, J. B., Parks, E., and Kinsella, J. E. (1993) Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine, *Lancet* 341, 454-457.
66. Hertog, M. G., Feskens, E. J., Hollman, P. C., Katan, M. B., and Kromhout, D. (1993) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study, *Lancet* 342, 1007-1011.
67. Stampfer, M. J., Hennekens, C. H., Manson, J. E., Colditz, G. A., Rosner, B., and Willett, W. C. (1993) Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women, *New England Journal of Medicine* 328, 1444-1449.
68. Frankel, E. N., Waterhouse, A. L., and Teissedre, P. L. (1995) Principal Phenolic Phytochemicals in Selected California Wines and Their Antioxidant Activity in Inhibiting Oxidation of Human Low-Density Lipoproteins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 890-894.
69. Waterhouse, A. L. (2002) Wine phenolics, *Annals of the New York Academy of Sciences* 957, 21-36.
70. Lesschaeve, I., and Noble, A. C. (2005) Polyphenols: factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences, *American Journal of Clinical Nutrition* 81, 330S-335S.
71. Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., and Pouysegou, L. (2011) Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis, *Angewandte Chemie. International Ed. In English* 50, 586-621.
72. Boeckx, T., Webster, R., Winters, A. L., Webb, K. J., Gay, A., and Kingston-Smith, A. H. (2015) Polyphenol oxidase-mediated protection against oxidative stress is not associated with enhanced photosynthetic efficiency, *Annals of Botany*.
73. Shahidi, F., and Ambigaipalan, P. (2015) Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review, *Journal of Functional Foods* 18, 820-897.
74. Neveu, V., Perez-Jimenez, J., Vos, F., Crespy, V., du Chaffaut, L., Mennen, L., Knox, C., Eisner, R., Cruz, J., Wishart, D., and Scalbert, A. (2010) Phenol-Explorer: an online comprehensive database on

- polyphenol contents in foods, *Database-the Journal of Biological Databases and Curation*.
75. Rothwell, J. A., Perez-Jimenez, J., Neveu, V., Medina-Rejon, A., M'Hiri, N., Garcia-Lobato, P., Manach, C., Knox, C., Eisner, R., Wishart, D. S., and Scalbert, A. (2013) Phenol-Explorer 3.0: a major update of the Phenol-Explorer database to incorporate data on the effects of food processing on polyphenol content, *Database-the Journal of Biological Databases and Curation*.
 76. Rothwell, J. A., Urpi-Sarda, M., Boto-Ordonez, M., Knox, C., Llorach, R., Eisner, R., Cruz, J., Neveu, V., Wishart, D., Manach, C., Andres-Lacueva, C., and Scalbert, A. (2012) Phenol-Explorer 2.0: a major update of the Phenol-Explorer database integrating data on polyphenol metabolism and pharmacokinetics in humans and experimental animals, *Database-the Journal of Biological Databases and Curation*.
 77. Robichaud, J. L., and Noble, A. C. (1990) Astringency and Bitterness of Selected Phenolics in Wine, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 53, 343-353.
 78. Guest, S., Essick, G., Young, M., Phillips, N., and McGlone, F. (2008) The effect of oral drying and astringent liquids on the perception of mouth wetness, *Physiology and Behavior* 93, 889-896.
 79. Hufnagel, J. C., and Hofmann, T. (2008) Orosensory-directed identification of astringent mouthfeel and bitter-tasting compounds in red wine, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 1376-1386.
 80. Vrhovsek, U., Masuero, D., Gasperotti, M., Franceschi, P., Caputi, L., Viola, R., and Mattivi, F. (2012) A versatile targeted metabolomics method for the rapid quantification of multiple classes of phenolics in fruits and beverages, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 8831-8840.
 81. Kuhnau, J. (1976) The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition, *World Review of Nutrition and Dietetics* 24, 117-191.
 82. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., and Jimenez, L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability, *American Journal of Clinical Nutrition* 79, 727-747.
 83. Kim, H. J., Seo, S. H., Lee, B. G., and Lee, Y. S. (2005) Identification of tyrosinase inhibitors from *Glycyrrhiza uralensis*, *Planta Medica* 71, 785-787.
 84. Khan, A. Q., Khan, R., Qamar, W., Lateef, A., Ali, F., Tahir, M., Muneeb, U. R., and Sultana, S. (2012) Caffeic acid attenuates 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA)-induced NF-kappaB and COX-2 expression in mouse skin: abrogation of oxidative stress, inflammatory responses and proinflammatory cytokine production, *Food and Chemical Toxicology* 50, 175-183.

85. Apel, K., and Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction, *Annual Review of Plant Biology* 55, 373-399.
86. Behrend, L., Henderson, G., and Zwacka, R. M. (2003) Reactive oxygen species in oncogenic transformation, *Biochemical Society Transactions* 31, 1441-1444.
87. Witz, G. (1991) Active Oxygen Species as Factors in Multistage Carcinogenesis, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 198, 675-682.
88. Pazzini, C. E., Colpo, A. C., Poetini, M. R., Pires, C. F., de Camargo, V. B., Mendez, A. S., Azevedo, M. L., Soares, J. C., and Folmer, V. (2015) Effects of Red Wine Tannat on Oxidative Stress Induced by Glucose and Fructose in Erythrocytes in Vitro, *Int J Med Sci* 12, 478-486.
89. Di Renzo, L., Carraro, A., Valente, R., Iacopino, L., Colica, C., and De Lorenzo, A. (2014) Intake of red wine in different meals modulates oxidized LDL level, oxidative and inflammatory gene expression in healthy people: a randomized crossover trial, *Oxid Med Cell Longev* 2014, 681318.
90. Di Renzo, L., Marsella, L. T., Carraro, A., Valente, R., Gualtieri, P., Gratteri, S., Tomasi, D., Gaiotti, F., and De Lorenzo, A. (2015) Changes in LDL Oxidative Status and Oxidative and Inflammatory Gene Expression after Red Wine Intake in Healthy People: A Randomized Trial, *Mediators of Inflammation* 2015, 317348.
91. Steinberg, D. (1997) Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance, *Journal of Biological Chemistry* 272, 20963-20966.
92. Parthasarathy, S., Raghavamenon, A., Garelnabi, M. O., and Santanam, N. (2010) Oxidized low-density lipoprotein, *Methods in Molecular Biology* 610, 403-417.
93. Alves, M. I. B., Plaza, F. A., Martinez-Tomas, R., Sanchez-Campillo, M., Larque, E., Perez-Llamas, F., Hernandez, P. M., and Pallares, S. P. (2010) Oxidized LDL and its correlation with lipid profile and oxidative stress biomarkers in young healthy Spanish subjects, *Journal of Physiology and Biochemistry* 66, 221-227.
94. Itabe, H., Obama, T., and Kato, R. (2011) The Dynamics of Oxidized LDL during Atherogenesis, *J Lipids* 2011, 418313.
95. Frostegard, J. (2013) Immunity, atherosclerosis and cardiovascular disease, *BMC Med* 11, 117.
96. Aruoma, O. I. (1998) Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease, *Journal of the American Oil Chemists Society* 75, 199-212.

97. Dubuisson, C., Lioret, S., Calamassi-Tran, G., Volatier, J. L., and Lafay, L. (2009) School meals in French secondary state schools with regard to the national recommendations, *British Journal of Nutrition* 102, 293-301.
98. Kim, K., Vance, T. M., and Chun, O. K. (2016) Greater Total Antioxidant Capacity from Diet and Supplements Is Associated with a Less Atherogenic Blood Profile in U.S. Adults, *Nutrients* 8.
99. Migliori, M., Cantaluppi, V., Mannari, C., Bertelli, A. A., Medica, D., Quercia, A. D., Navarro, V., Scatena, A., Giovannini, L., Biancone, L., and Panichi, V. (2015) Caffeic acid, a phenol found in white wine, modulates endothelial nitric oxide production and protects from oxidative stress-associated endothelial cell injury, *PLoS One* 10, e0117530.
100. Palmisciano Bede, T., Pascoal, A. C., Hauaji Faco, L., de Salvo Castro, E., Mattoso, V., Furtado Dias, J., and Blondet de Azeredo, V. (2015) Effect of the intake of liquids rich in polyphenols on blood pressure and fat liver deposition in rats submitted to high-fat diet, *Nutricion Hospitalaria* 31, 2539-2545.
101. Wright, J. S., Johnson, E. R., and DiLabio, G. A. (2001) Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants, *Journal of the American Chemical Society* 123, 1173-1183.
102. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., and Paganga, G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology and Medicine* 20, 933-956.
103. Leopoldini, M., Marino, T., Russo, N., and Toscano, M. (2004) Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism, *Journal of Physical Chemistry A* 108, 4916-4922.
104. Claus, H., and Decker, H. (2006) Bacterial tyrosinases, *Systematic and Applied Microbiology* 29, 3-14.
105. Decker, H. (2005) Copper Proteins with Dinuclear Active Sites, in *Encyclopedia of Inorganic Chemistry* (King, R. B., Ed.), pp 1159-1173, Wiley.
106. Jaenicke, E., and Decker, H. (2004) Functional changes in the family of type 3 copper proteins during evolution, *ChemBioChem* 5, 163-169.
107. Kanteev, M., Goldfeder, M., and Fishman, A. (2015) Structure-function correlations in tyrosinases, *Protein Science*.
108. Sanchez-Ferrer, A., Rodriguez-Lopez, J. N., Garcia-Canovas, F., and Garcia-Carmona, F. (1995) Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism, *Biochimica et Biophysica Acta* 22, 1-11.
109. van Holde, K. E., Miller, K. I., and Decker, H. (2001) Hemocyanins and invertebrate evolution, *Journal of Biological Chemistry* 276, 15563-15566.

110. Ramsden, C. A., and Riley, P. A. (2010) Mechanistic studies of tyrosinase suicide inactivation, *Arkivoc*, 260-274.
111. Dirks-Hofmeister, M. E., Inlow, J. K., and Moerschbacher, B. M. (2012) Site-directed mutagenesis of a tetrameric dandelion polyphenol oxidase (PPO-6) reveals the site of subunit interaction, *Plant Molecular Biology* 80, 203-217.
112. Fronk, P., Hartmann, H., Bauer, M., Solem, E., Jaenicke, E., Tenzer, S., and Decker, H. (2015) Polyphenoloxidase from *Riesling* and *Dornfelder* wine grapes (*Vitis vinifera*) is a tyrosinase, *Food Chemistry* 183, 49-57.
113. Marusek, C. M., Trobaugh, N. M., Flurkey, W. H., and Inlow, J. K. (2006) Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species, *Journal of Inorganic Biochemistry* 100, 108-123.
114. VanGelder, C. W. G., Flurkey, W. H., and Wichers, H. J. (1997) Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases, *Phytochemistry* 45, 1309-1323.
115. Virador, V. M., Reyes Grajeda, J. P., Blanco-Labra, A., Mendiola-Olaya, E., Smith, G. M., Moreno, A., and Whitaker, J. R. (2010) Cloning, sequencing, purification, and crystal structure of *Grenache* (*Vitis vinifera*) polyphenol oxidase, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 1189-1201.
116. Leufken, C. M., Moerschbacher, B. M., and Dirks-Hofmeister, M. E. (2015) Dandelion PPO-1/PPO-2 domain-swaps: the C-terminal domain modulates the pH optimum and the linker affects SDS-mediated activation and stability, *Biochimica et Biophysica Acta* 1854, 178-186.
117. Naresh, K. N., Sreekumar, A., and Rajan, S. S. (2015) 43 Studies using molecular dynamics reveal mechanism of interaction of hemocyanin with phenolic substrates, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 33 Suppl 1, 29-30.
118. Schneider, V. (1998) Must hyperoxidation: A review, *American Journal of Enology and Viticulture* 49, 65-73.
119. Kuijpers, T. F., Gruppen, H., Sforza, S., van Berkel, W. J., and Vincken, J. P. (2013) The antibrowning agent sulfite inactivates *Agaricus bisporus* tyrosinase through covalent modification of the copper-B site, *FEBS Journal* 280, 6184-6195.
120. Wang, W., Tai, F., and Chen, S. (2008) Optimizing protein extraction from plant tissues for enhanced proteomics analysis, *J Sep Sci* 31, 2032-2039.
121. Loomis, W. D., and Battaile, J. (1966) Plant Phenolic Compounds and Isolation of Plant Enzymes, *Phytochemistry* 5, 423-&.
122. Fischer, F., and Bauer, S. (2009) An All Rounder in the Chemistry Polyvinylpyrrolidone, *Chemie in Unserer Zeit* 43, 376-383.

123. Eckert, W. A., Kartenbeck, J. (1997) Proteine: Standardmethoden der Molekular- und Zellbiologie: Präparation, Gelelektrophorese, Membrantransfer und Immundetektion, *Springer Verlag*, 50f.
124. Vincent, D., Wheatley, M. D., and Cramer, G. R. (2006) Optimization of protein extraction and solubilization for mature grape berry clusters, *Electrophoresis* 27, 1853-1865.
125. Damerval, C., Devienne, D., Zivy, M., and Thiellement, H. (1986) Technical Improvements in Two-Dimensional Electrophoresis Increase the Level of Genetic-Variation Detected in Wheat-Seedling Proteins, *Electrophoresis* 7, 52-54.
126. See, Y., and Jackowski, G. (1989) Estimating Molecular Weights of Polypeptides by SDS Gel Electrophoresis, *Protein Structure - A Practical Approach* (Creighton T, ed.), IRL Press, Oxford, 1-22.
127. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-685.
128. Kang, D. H., Gho, Y. S., Suh, M. K., and Kang, C. H. (2002) Highly sensitive and fast protein detection with coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, *Bulletin of the Korean Chemical Society* 23, 1511-1512.
129. Blum, H., Beier, H., and Gross, H. J. (1987) Improved Silver Staining of Plant-Proteins, RNA and DNA in Polyacrylamide Gels, *Electrophoresis* 8, 93-99.
130. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
131. Read, S. M., and Northcote, D. H. (1981) Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein, *Analytical Biochemistry* 116, 53-64.
132. Compton, S. J., and Jones, C. G. (1985) Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay, *Analytical Biochemistry* 151, 369-374.
133. Kyhse-Andersen, J. (1984) Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 10, 203-209.
134. Jäckels, N. (2014) Weinproteine - Allergenität & Trubbildung, Dissertation im *Institut für Molekulare Biophysik*, Johannes Gutenberg Universität in Mainz.
135. O'Brien, V., and Colby, C. (2009) Managing oxygen ingress at bottling, *Wine Industry Journal* 24, 24-29.

136. Blois, M. S. (1958) Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical, *Nature* 181, 1199-1200.
137. Brandwilliams, W., Cuvelier, M. E., and Berset, C. (1995) Use of a Free-Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity, *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 28, 25-30.
138. Fukumoto, L. R., and Mazza, G. (2000) Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 3597-3604.
139. Daiber, A., August, M., Baldus, S., Wendt, M., Oelze, M., Sydow, K., Kleschyov, A. L., and Munzel, T. (2004) Measurement of NAD(P)H oxidase-derived superoxide with the luminol analogue L-012, *Free Radical Biology and Medicine* 36, 101-111.
140. Spanier, G., Xu, H., Xia, N., Tobias, S., Deng, S., Wojnowski, L., Forstermann, U., and Li, H. (2009) Resveratrol reduces endothelial oxidative stress by modulating the gene expression of superoxide dismutase 1 (SOD1), glutathione peroxidase 1 (GPx1) and NADPH oxidase subunit (Nox4), *Journal of Physiology and Pharmacology* 60 Suppl 4, 111-116.
141. Qin, Z. Y. (2012) The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature, *Atherosclerosis* 221, 2-11.
142. Shewry, P. R., Napier, J. A., and Tatham, A. S. (1995) Seed storage proteins: structures and biosynthesis, *Plant Cell* 7, 945-956.
143. Utsumi, S. (1992) Plant food protein engineering, *Advances in Food and Nutrition Research* 36, 89-208.
144. Goyal, R. K., and Mattoo, A. K. (2014) Multitasking antimicrobial peptides in plant development and host defense against biotic/abiotic stress, *Plant Science* 228, 135-149.
145. Marcus, J. P., Green, J. L., Goulter, K. C., and Manners, J. M. (1999) A family of antimicrobial peptides is produced by processing of a 7S globulin protein in *Macadamia integrifolia* kernels, *Plant Journal* 19, 699-710.
146. Van Loon, L. C., and Van Strien, E. A. (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins, *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55, 85-97.
147. Deytieux, C., Geny, L., Lapaillerie, D., Claverol, S., Bonneau, M., and Doneche, B. (2007) Proteome analysis of grape skins during ripening, *Journal of Experimental Botany* 58, 1851-1862.

148. Fernandes, H., Michalska, K., Sikorski, M., and Jaskolski, M. (2013) Structural and functional aspects of PR-10 proteins, *FEBS Journal* 280, 1169-1199.
149. Famiani, F., Walker, R. P., Tecsi, L., Chen, Z. H., Proietti, P., and Leegood, R. C. (2000) An immunohistochemical study of the compartmentation of metabolism during the development of grape (*Vitis vinifera* L.) berries, *Journal of Experimental Botany* 51, 675-683.
150. Giribaldi, M., Perugini, I., Sauvage, F. X., and Schubert, A. (2007) Analysis of protein changes during grape berry ripening by 2-DE and MALDI-TOF, *Proteomics* 7, 3154-3170.
151. Beriashvili, T. V., and Beriashvili, L. T. (1996) Metabolism of malic and tartaric acids in grape berries, *Biochemistry-Moscow* 61, 1316-1321.
152. Sweetman, C., Deluc, L. G., Cramer, G. R., Ford, C. M., and Soole, K. L. (2009) Regulation of malate metabolism in grape berry and other developing fruits, *Phytochemistry* 70, 1329-1344.
153. O., C. A., and Gomes, V. M. (2007) Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology-a concise review. , *Peptides* 28, 1144-1153.
154. Blein, J. P., Coutos-Thevenot, P., Marion, D., and Ponchet, M. (2002) From elicitors to lipid-transfer proteins: a new insight in cell signalling involved in plant defence mechanisms, *Trends in Plant Science* 7, 293-296.
155. Buhot, N., Douliez, J. P., Jacquemard, A., Marion, D., Tran, V., Maume, B. F., Milat, M. L., Ponchet, M., Mikes, V., Kader, J. C., and Blein, J. P. (2001) A lipid transfer protein binds to a receptor involved in the control of plant defence responses, *FEBS Letters* 509, 27-30.
156. Han, G. W., Lee, J. Y., Song, H. K., Chang, C. S., Min, K., Moon, J., Shin, D. H., Kopka, M. L., Sawaya, M. R., Yuan, H. S., Kim, T. D., Choe, J., Lim, D., Moon, H. J., and Suh, S. W. (2001) Structural basis of non-specific lipid binding in maize lipid-transfer protein complexes revealed by high-resolution X-ray crystallography, *Journal of Molecular Biology* 308, 263-278.
157. Maldonado, A. M., Doerner, P., Dixon, R. A., Lamb, C. J., and Cameron, R. K. (2002) A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in Arabidopsis, *Nature* 419, 399-403.
158. Sterk, P., Booij, H., Schellekens, G. A., Vankammen, A., and Devries, S. C. (1991) Cell-Specific Expression of the Carrot Ep2 Lipid Transfer Protein Gene, *Plant Cell* 3, 907-921.
159. Tsuboi, S., Osafune, T., Tsugeki, R., Nishimura, M., and Yamada, M. (1992) Nonspecific lipid transfer protein in castor bean cotyledon cells: subcellular localization and a possible role in lipid metabolism, *J Biochem* 111, 500-508.

160. Arajji, S., Grammer, T. A., Gertzen, R., Anderson, S. D., Mikulic-Petkovsek, M., Veberic, R., Phu, M. L., Solar, A., Leslie, C. A., Dandekar, A. M., and Escobar, M. A. (2014) Novel roles for the polyphenol oxidase enzyme in secondary metabolism and the regulation of cell death in walnut, *Plant Physiology* 164, 1191-1203.
161. Boeckx, T., Winters, A. L., Webb, K. J., and Kingston-Smith, A. H. (2015) Polyphenol oxidase in leaves: is there any significance to the chloroplastic localization?, *Journal of Experimental Botany* 66, 3571-3579.
162. Thipyapong, P., Hunt, M. D., and Steffens, J. C. (2004) Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility, *Planta* 220, 105-117.
163. Cramer, G. R., Ergul, A., Grimplet, J., Tillett, R. L., Tattersall, E. A., Bohlman, M. C., Vincent, D., Sonderegger, J., Evans, J., Osborne, C., Quilici, D., Schlauch, K. A., Schooley, D. A., and Cushman, J. C. (2007) Water and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profiles, *Funct Integr Genomics* 7, 111-134.
164. Grimplet, J., Wheatley, M. D., Jouira, H. B., Deluc, L. G., Cramer, G. R., and Cushman, J. C. (2009) Proteomic and selected metabolite analysis of grape berry tissues under well-watered and water-deficit stress conditions, *Proteomics* 9, 2503-2528.
165. Liu, J. J., Sturrock, R., and Ekramoddoullah, A. K. (2010) The superfamily of thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression towards biological function, *Plant Cell Reports* 29, 419-436.
166. Vincent, D., Ergul, A., Bohlman, M. C., Tattersall, E. A., Tillett, R. L., Wheatley, M. D., Woolsey, R., Quilici, D. R., Joets, J., Schlauch, K., Schooley, D. A., Cushman, J. C., and Cramer, G. R. (2007) Proteomic analysis reveals differences between *Vitis vinifera* L. cv. *Chardonnay* and cv. *Cabernet Sauvignon* and their responses to water deficit and salinity, *Journal of Experimental Botany* 58, 1873-1892.
167. Niu, N., Cao, Y., Duan, W., Wu, B., and Li, S. (2013) Proteomic analysis of grape berry skin responding to sunlight exclusion, *Journal of Plant Physiology* 170, 748-757.
168. Odoguardi, M. (2014) Reifeabhängige Proteinzusammensetzung am Beispiel einer einheimischen Rebsorte (*Dornfelder*), Masterarbeit im *Institut für Molekulare Biophysik*, Johannes Gutenberg Universität in Mainz.
169. Bauer, M. (2014) Einfluss der Tyrosinaseaktivität auf phenolische Weininhaltsstoffe, Diplomarbeit im *Institut für Molekulare Biophysik*, Johannes Gutenberg Universität in Mainz.
170. Serjeant, E. P., and Dempsey, B. (1979) in *PubChem*, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/72#section=pKa> Stand 21.01.2016.

171. Serjeant, E. P., and Dempsey, B. (1979), PubChem, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/caffeic_acid#section=pKa Stand 21.01.2016.
172. Seo, S. Y., Sharma, V. K., and Sharma, N. (2003) Mushroom tyrosinase: recent prospects, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 2837-2853.
173. Claus, H., and Strong, P. J. (2010) Laccase, in *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation and Cell Technology* (Flickinger, M. C., Ed.), pp 1-22, Wiley.
174. Mayer, A. M., and Staples, R. C. (2002) Laccase: new functions for an old enzyme, *Phytochemistry* 60, 551-565.
175. Kidron, M., Harel, E., and Mayer, A. M. (1978) Catechol Oxidase Activity in Grapes and Wine, *American Journal of Enology and Viticulture* 29, 30-35.
176. Valero, E., Varon, R., and Garcíacarmona, F. (1988) Characterization of Polyphenol Oxidase from *Airen* Grapes, *Journal of Food Science* 53, 1482-1485.
177. Wissemann, K. W., and Lee, C. Y. (1980) Polyphenoloxidase Activity during Grape Maturation and Wine Production, *American Journal of Enology and Viticulture* 31, 206-211.
178. Isaacson, T., Damasceno, C. M., Saravanan, R. S., He, Y., Catala, C., Saladie, M., and Rose, J. K. (2006) Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues, *Nature Protocols* 1, 769-774.
179. Rose, J. K., Bashir, S., Giovannoni, J. J., Jahn, M. M., and Saravanan, R. S. (2004) Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools, *Plant Journal* 39, 715-733.
180. Saravanan, R. S., and Rose, J. K. (2004) A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues, *Proteomics* 4, 2522-2532.
181. Gancz, K., Alexander, M., and Corredig, M. (2005) Interactions of high methoxyl pectin with whey proteins at oil/water interfaces at acid pH, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 2236-2241.
182. Kambiranda, D., Katam, R., Basha, S. M., and Siebert, S. (2014) iTRAQ-based quantitative proteomics of developing and ripening *muscadine* grape berry, *Journal of Proteome Research* 13, 555-569.
183. Martinez-Esteso, M. J., Vilella-Anton, M. T., Pedreno, M. A., Valero, M. L., and Bru-Martinez, R. (2013) iTRAQ-based protein profiling provides insights into the central metabolism changes driving grape berry development and ripening, *BMC Plant Biology* 13, 167.

184. Negri, A. S., Prinsi, B., Rossoni, M., Failla, O., Scienza, A., Cocucci, M., and Espen, L. (2008) Proteome changes in the skin of the grape cultivar *Barbera* among different stages of ripening, *BMC Genomics* 9, 378.
185. Jellouli, N., Salem, A. B., Ghorbel, A., and Jouira, H. B. (2010) Evaluation of protein extraction methods for *Vitis vinifera* leaf and root proteome analysis by two-dimensional electrophoresis, *Journal of Integrative Plant Biology* 52, 933-940.
186. Cramer, G. R., Van Sluyter, S. C., Hopper, D. W., Pascovici, D., Keighley, T., and Haynes, P. A. (2013) Proteomic analysis indicates massive changes in metabolism prior to the inhibition of growth and photosynthesis of grapevine (*Vitis vinifera* L.) in response to water deficit, *BMC Plant Biology* 13, 49.
187. Di Carli, M., Zamboni, A., Pe, M. E., Pezzotti, M., Lilley, K. S., Benvenuto, E., and Desiderio, A. (2011) Two-dimensional differential in gel electrophoresis (2D-DIGE) analysis of grape berry proteome during postharvest withering, *Journal of Proteome Research* 10, 429-446.
188. Fraige, K., Gonzalez-Fernandez, R., Carrilho, E., and Jorriñ-Novó, J. V. (2015) Metabolite and proteome changes during the ripening of *Syrah* and *Cabernet Sauvignon* grape varieties cultured in a nontraditional wine region in Brazil, *Journal of Proteomics* 113, 206-225.
189. Lopez-Miranda, S., Hernandez-Sanchez, P., Serrano-Martinez, A., Hellin, P., Fenoll, J., and Nunez-Delicado, E. (2011) Effect of ripening on protein content and enzymatic activity of *Crimson Seedless* table grape, *Food Chemistry* 127, 481-486.
190. Cai, H., Yuan, X., Pan, J., Li, H., Wu, Z., and Wang, Y. (2014) Biochemical and proteomic analysis of grape berries (*Vitis labruscana*) during cold storage upon postharvest salicylic acid treatment, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62, 10118-10125.
191. Castro, A. J., Carapito, C., Zorn, N., Magne, C., Leize, E., Van Dorsselaer, A., and Clement, C. (2005) Proteomic analysis of grapevine (*Vitis vinifera* L.) tissues subjected to herbicide stress, *Journal of Experimental Botany* 56, 2783-2795.
192. Pasquier, G., Lapaillerie, D., Vilain, S., Dupuy, J. W., Lomenech, A. M., Claverol, S., Geny, L., Bonneau, M., Teissedre, P. L., and Doneche, B. (2013) Impact of foliar symptoms of "Esca proper" on proteins related to defense and oxidative stress of grape skins during ripening, *Proteomics* 13, 108-118.
193. Pocock, K. F., Hayasaka, Y., McCarthy, M. G., and Waters, E. J. (2000) Thaumatin-like proteins and chitinases, the haze-forming proteins of wine, accumulate during ripening of grape (*Vitis vinifera*) berries and drought stress does not affect the final levels per berry at maturity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 1637-1643.

194. Harel, E., and Mayer, A. M. (1971) Partial Purification and Properties of Catechol Oxidases in Grapes, *Phytochemistry* 10, 17-&.
195. Sanchez-Ferrer, A., Bru, R., and Garcia-Carmona, F. (1989) Novel procedure for extraction of a latent grape polyphenoloxidase using temperature-induced phase separation in triton x-114, *Plant Physiology* 91, 1481-1487.
196. Garcia-Garcia, M. I., Hernandez-Garcia, S., Sanchez-Ferrer, A., and Garcia-Carmona, F. (2013) Kinetic study of hydroxytyrosol oxidation and its related compounds by Red Globe grape polyphenol oxidase, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61, 6050-6055.
197. Lago-Vanzela, E. S., Pavezzi, F. C., Martin, N., Gomes, E., and Da Silva, R. (2011) Isolation and characterization of latent and active polyphenoloxidase in *BRS Clara* (CNPUV 154-147 x *Centennial seedless*) and *BRS Morena* (*Marroo seedless* x *Centennial seedless*) seedless table grapes, *Plant Physiology and Biochemistry* 49, 1251-1258.
198. Nunez-Delicado, E., Serrano-Megias, M., Perez-Lopez, A. J., and Lopez-Nicolas, J. M. (2005) Polyphenol oxidase from *Dominga* table grape, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 6087-6093.
199. Valero, E., and Garciacarmona, F. (1992) Ph-Induced Kinetic Cooperativity of a Thylakoid-Bound Polyphenol Oxidase, *Biochemical Journal* 286, 623-626.
200. Regev, G., Mara, D., Oded, S., and Zohar, K. (2001) Resveratrol and a novel tyrosinase in *Carignan* grape juice, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 1479-1485.
201. Gonzalez, E. M., de Ancos, B., and Cano, M. P. (2000) Partial characterization of peroxidase and polyphenol oxidase activities in blackberry fruits, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 5459-5464.
202. Rapeanu, G., Van Loey, A., Smout, C., and Hendrickx, M. (2006) Biochemical characterization and process stability of polyphenoloxidase extracted from Victoria grape (*Vitis vinifera* ssp *Sativa*), *Food Chemistry* 94, 253-261.
203. Zheng, Y. J., Shi, J. L., and Pan, Z. L. (2012) Biochemical characteristics and thermal inhibition kinetics of polyphenol oxidase extracted from *Thompson seedless* grape, *European Food Research and Technology* 234, 607-616.
204. Walter, R. (2012) Fäulnispilze an Weintrauben – Erregerkomplex, Mykotoxine und Bekämpfungsstrategien, *Journal für Kulturpflanzen* 64, 378-383.

205. Blagbrough, I. S., Bayoumi, S. A., Rowan, M. G., and Beeching, J. R. (2010) Cassava: an appraisal of its phytochemistry and its biotechnological prospects, *Phytochemistry* 71, 1940-1951.
206. Gandia-Herrero, F., Escribano, J., and Garcia-Carmona, F. (2005) Betaxanthins as substrates for tyrosinase. an approach to the role of tyrosinase in the biosynthetic pathway of betalains, *Plant Physiology* 138, 421-432.
207. Joy, R. W. t., Sugiyama, M., Fukuda, H., and Komamine, A. (1995) Cloning and characterization of polyphenol oxidase cDNAs of *Phytolacca americana*, *Plant Physiology* 107, 1083-1089.
208. Tedesco, I., Russo, M., Russo, P., Iacomino, G., Russo, G. L., Carraturo, A., Faruolo, C., Moio, L., and Palumbo, R. (2000) Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells, *Journal of Nutritional Biochemistry* 11, 114-119.
209. Ghiselli, A., Nardini, M., Baldi, A., and Scaccini, C. (1998) Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 361-367.
210. Giovinazzo, G., and Grieco, F. (2015) Functional Properties of Grape and Wine Polyphenols, *Plant Foods for Human Nutrition* 70, 454-462.
211. Fernandez-Pachon, M. S., Villano, D., Garcia-Parrilla, M. C., and Troncoso, A. M. (2004) Antioxidant activities of wines and relation with their polyphenolic composition, *Analytica Chimica Acta* 513, 113-118.
212. Minussi, R. C., Rossi, M., Bologna, L., Cordi, L., Rotilio, D., Pastore, G. M., and Duran, N. (2003) Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines, *Food Chemistry* 82, 409-416.
213. Zhu, L., Zhang, Y. L., Deng, J. J., Li, H. R., and Lu, J. (2012) Phenolic Concentrations and Antioxidant Properties of Wines Made from North American Grapes Grown in China, *Molecules* 17, 3304-3323.
214. Kostadinovic, S., Wilkens, A., Stefova, M., Ivanova, V., Vojnoski, B., Mirhosseini, H., and Winterhalter, P. (2012) Stilbene levels and antioxidant activity of Vranec and Merlot wines from *Macedonia*: Effect of variety and enological practices, *Food Chemistry* 135, 3003-3009.
215. Fuhrman, B., Volkova, N., Suraski, A., and Aviram, M. (2001) White wine with red wine-like properties: Increased extraction of grape skin polyphenols improves the antioxidant capacity of the derived white wine, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 3164-3168.
216. Villano, D., Fernandez-Pachon, M. S., Troncoso, A. M., and Garcia-Parrilla, M. C. (2006) Influence of enological practices on the antioxidant activity of wines, *Food Chemistry* 95, 394-404.
217. Agatonovic-Kustrin, S., Morton, D. W., and Yusof, A. P. (2016) Development and validation of a simple high performance thin layer

- chromatography method combined with direct 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl assay to quantify free radical scavenging activity in wine, *Food Chemistry* 197, 285-290.
218. Preserova, J., Ranc, V., Milde, D., Kubistova, V., and Stavek, J. (2015) Study of phenolic profile and antioxidant activity in selected *Moravian* wines during winemaking process by FT-IR spectroscopy, *Journal of Food Science and Technology-Mysore* 52, 6405-6414.
219. Fauconneau, B., Waffo-Teguo, P., Huguet, F., Barrier, L., Decendit, A., and Merillon, J. M. (1997) Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using *in vitro* tests, *Life Sciences* 61, 2103-2110.
220. Liang, Z. C., Cheng, L. L., Zhong, G. Y., and Liu, R. H. (2014) Antioxidant and Antiproliferative Activities of Twenty-Four *Vitis vinifera* Grapes, *PLoS One* 9.
221. Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., and Brighenti, F. (2003) Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different *in vitro* assays, *Journal of Nutrition* 133, 2812-2819.
222. Liang, Z., Cheng, L., Zhong, G. Y., and Liu, R. H. (2014) Antioxidant and antiproliferative activities of twenty-four *Vitis vinifera* grapes, *PLoS One* 9, e105146.
223. Miller, N. J., and RiceEvans, C. A. (1997) The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink, *Food Chemistry* 60, 331-337.
224. Meyer, A. S., Heinonen, M., and Frankel, E. N. (1998) Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation, *Food Chemistry* 61, 71-75.
225. Wang, S., Mateos, R., Goya, L., Amigo-Benavent, M., Sarria, B., and Bravo, L. (2016) A phenolic extract from grape by-products and its main hydroxybenzoic acids protect Caco-2 cells against pro-oxidant induced toxicity, *Food and Chemical Toxicology* 88, 65-74.
226. Bertelli, A. A., Migliori, M., Panichi, V., Longoni, B., Origlia, N., Ferretti, A., Cuttano, M. G., and Giovannini, L. (2002) Oxidative stress and inflammatory reaction modulation by white wine, *Annals of the New York Academy of Sciences* 957, 295-301.
227. Rezk, B. M., Haenen, G. R., van der Vijgh, W. J., and Bast, A. (2002) The antioxidant activity of phloretin: the disclosure of a new antioxidant pharmacophore in flavonoids, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 295, 9-13.

228. Ader, P., Grenacher, B., Langguth, P., Scharrer, E., and Wolffram, S. (1996) Cinnamate uptake by rat small intestine: transport kinetics and transepithelial transfer, *Experimental Physiology* 81, 943-955.
229. Scalbert, A., and Williamson, G. (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols, *Journal of Nutrition* 130, 2073S-2085S.
230. Vanzo, A., Cecotti, R., Vrhovsek, U., Torres, A. M., Mattivi, F., and Passamonti, S. (2007) The fate of trans-caftaric acid administered into the rat stomach, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 1604-1611.
231. Forester, S. C., and Waterhouse, A. L. (2009) Metabolites are key to understanding health effects of wine polyphenolics, *Journal of Nutrition* 139, 1824S-1831S.
232. Shahrzad, S., and Bitsch, I. (1998) Determination of gallic acid and its metabolites in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B* 705, 87-95.
233. Abd El-Mohsen, M., Bayele, H., Kuhnle, G., Gibson, G., Debnam, E., Kaila Srari, S., Rice-Evans, C., and Spencer, J. P. (2006) Distribution of [³H]trans-resveratrol in rat tissues following oral administration, *British Journal of Nutrition* 96, 62-70.
234. Caccetta, R. A. A., Croft, K. D., Beilin, L. J., and Puddey, I. B. (2000) Ingestion of red wine significantly increases plasma phenolic acid concentrations but does not acutely affect *ex vivo* lipoprotein oxidizability, *American Journal of Clinical Nutrition* 71, 67-74.
235. Micallef, M., Lexis, L., and Lewandowski, P. (2007) Red wine consumption increases antioxidant status and decreases oxidative stress in the circulation of both young and old humans, *Nutrition Journal* 6.
236. Serafini, M., Maiani, G., and Ferro-Luzzi, A. (1998) Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans, *Journal of Nutrition* 128, 1003-1007.
237. Simonetti, P., Gardana, C., and Pietta, P. (2001) Plasma levels of caffeic acid and antioxidant status after red wine intake, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 5964-5968.
238. Urpi-Sarda, M., Zamora-Ros, R., Lamuela-Raventos, R., Cherubini, A., Jauregui, O., De la Torre, R., Covas, M. I., Estruch, R., Jaeger, W., and Andres-Lacueva, C. (2007) HPLC-tandem mass spectrometric method to characterize resveratrol metabolism in humans, *Clinical Chemistry* 53, 292-299.
239. Heinonen, I. M., Meyer, A. S., and Frankel, E. N. (1998) Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 4107-4112.

240. Meyer, A. S., and Frankel, E. N. (1997) Inhibition of human LDL oxidation by phenolic antioxidants in grapes (*Vitis vinifera*), *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 213, 4-Agfd.
241. Meyer, A. S., Yi, O. S., Pearson, D. A., Waterhouse, A. L., and Frankel, E. N. (1997) Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation in relation to composition of phenolic antioxidants in grapes (*Vitis vinifera*), *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 1638-1643.
242. Teissedre, P. L., Frankel, E. N., Waterhouse, A. L., Peleg, H., and German, J. B. (1996) Inhibition of in vitro human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 70, 55-61.
243. Carbonneau, M. A., Leger, C. L., Monnier, L., Bonnet, C., Michel, F., Fouret, G., Dedieu, F., and Descomps, B. (1997) Supplementation with wine phenolic compounds increases the antioxidant capacity of plasma and vitamin E of low-density lipoprotein without changing the lipoprotein Cu(2+)-oxidizability: possible explanation by phenolic location, *European Journal of Clinical Nutrition* 51, 682-690.
244. Cartron, E., Fouret, G., Carbonneau, M. A., Lauret, C., Michel, F., Monnier, L., Descomps, B., and Leger, C. L. (2003) Red-wine beneficial long-term effect on lipids but not on antioxidant characteristics in plasma in a study comparing three types of wine - Description of two O-methylated derivatives of gallic acid in humans, *Free Radical Research* 37, 1021-1035.
245. de Rijke, Y. B., Demacker, P. N., Assen, N. A., Sloots, L. M., Katan, M. B., and Stalenhoef, A. F. (1996) Red wine consumption does not affect oxidizability of low-density lipoproteins in volunteers, *American Journal of Clinical Nutrition* 63, 329-334.
246. Day, A. P., Kemp, H. J., Bolton, C., Hartog, M., and Stansbie, D. (1997) Effect of concentrated red grape juice consumption on serum antioxidant capacity and low-density lipoprotein oxidation, *Annals of Nutrition and Metabolism* 41, 353-357.
247. Estruch, R., Sacanella, E., Mota, F., Chiva-Blanch, G., Antunez, E., Casals, E., Deulofeu, R., Rotilio, D., Andres-Lacueva, C., Lamuela-Raventos, R. M., de Gaetano, G., and Urbano-Marquez, A. (2011) Moderate consumption of red wine, but not gin, decreases erythrocyte superoxide dismutase activity: a randomised cross-over trial, *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* 21, 46-53.
248. Fuhrman, B., Lavy, A., and Aviram, M. (1995) Consumption of Red Wine with Meals Reduces the Susceptibility of Human Plasma and Low-Density-Lipoprotein to Lipid-Peroxidation, *American Journal of Clinical Nutrition* 61, 549-554.

249. Miyagi, Y., Miwa, K., and Inoue, H. (1997) Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by flavonoids in red wine and grape juice, *American Journal of Cardiology* 80, 1627-1631.
250. Nigdikar, S. V., Williams, N. R., Griffin, B. A., and Howard, A. N. (1998) Consumption of red wine polyphenols reduces the susceptibility of low-density lipoproteins to oxidation *in vivo*, *American Journal of Clinical Nutrition* 68, 258-265.
251. Forman, H. J., Davies, K. J., and Ursini, F. (2014) How do nutritional antioxidants really work: nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging *in vivo*, *Free Radical Biology and Medicine* 66, 24-35.
252. D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scazzocchio, B., and Masella, R. (2010) Bioavailability of the polyphenols: status and controversies, *International Journal of Molecular Sciences* 11, 1321-1342.
253. Guz, J., Foksinski, M., Siomek, A., Gackowski, D., Rozalski, R., Dziaman, T., Szpila, A., and Olinski, R. (2008) The relationship between 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine level and extent of cytosine methylation in leukocytes DNA of healthy subjects and in patients with colon adenomas and carcinomas, *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 640, 170-173.
254. Perse, M. (2013) Oxidative stress in the pathogenesis of colorectal cancer: cause or consequence?, *Biomedical Research International* 2013, 725710.
255. Femia, A. P., Caderni, G., Vignali, F., Salvadori, M., Giannini, A., Biggeri, A., Gee, J., Przybylska, K., Cheynier, V., and Dolara, P. (2005) Effect of polyphenolic extracts from red wine and 4-OH-coumaric acid on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in rats, *European Journal of Nutrition* 44, 79-84.
256. Perse, M., and Cerar, A. (2011) Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats, *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011, 473964.
257. Edens, W. A., Goins, T. Q., Dooley, D., and Henson, J. M. (1999) Purification and characterization of a secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis* var. tritici, *Applied and Environmental Microbiology* 65, 3071-3074.
258. Nazari, M., Kashanian, S., and Rafipour, R. (2015) Laccase immobilization on the electrode surface to design a biosensor for the detection of phenolic compound such as catechol, *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 145, 130-138.

7 Verzeichnisse

7.1 Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	volume per volume
(w/v)	weight per volume
ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
APS	Ammoniumpersulfat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BDE	Bindungsdissoziationsenergie
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonat
DC	Dünnschichtchromatographie
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMNQ	2,3-dimethoxy-1,4-naphtaquinon
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
HAT	H-Atom Transfer
HKE	Herz-Kreislauf Erkrankungen
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IP	Ionisierungspotential
kD	Kilodalton
LDL	Low density lipoprotein
LTP	Lipid Transfer Protein
MBTH	3-Methyl-2-benzothiazolinone hydrazon
M-Effekt	Mesomerer Effekt
MS	Massenspektrometrie
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
ns-LTP	Non-specific Lipid Transfer Protein
ox-LDL	oxidiertes low density lipoprotein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPO	Polyphenoloxidase
PR	Pathogenesis related
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
ROS	Reaktive Sauerstoff Spezies
SDS	sodium dodecyl sulfate
SEC	Größenausschlusschromatographie
SET	Single electron transfer
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TLP	Thaumatähnliche Proteine
WB	Westernblot

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Traubenwachstums	2
Abbildung 2: Grundstruktur der Flavonoide	8
Abbildung 3: Struktur der untersuchten Chalkone	9
Abbildung 4: Struktur der untersuchten Benzoessäuren	9
Abbildung 5: Struktur der Untersuchten Hydroxyzimtsäuren	10
Abbildung 6: Struktur der untersuchten Stilbene	11
Abbildung 7: Mechanismus der Lipidoxidation	13
Abbildung 8: Postulierte Mechanismen der Radikalfänger-Reaktionen von phenolischen Substanzen	14
Abbildung 9: Von Tyrosinase katalysierte Reaktionen	16
Abbildung 10: Schematischer Aufbau der Tyrosinase aus Trauben.....	17
Abbildung 11: Reduktive bzw. oxidative Mostverarbeitung bei der Bereitung von Weißwein.....	18
Abbildung 12: Vergleich verschiedener Proteinfällungsreaktionen.....	52
Abbildung 13: Zuordnung der identifizierten Traubenproteine nach Calbiochem- Fällung	54
Abbildung 14: Vergleich von MS-identifizierten Dornfelderproteinen in 2D- Darstellung mit einem 2D-Gel von Dornfelderproteinen.....	55
Abbildung 15: Einteilung von Proteinen aus Dornfeldertrauben nach biologischen Prozessen	56
Abbildung 16: Einteilung von Proteinen aus Dornfeldertrauben nach Lokalisation	57
Abbildung 17: Vergleich verschiedener Proteinfällungsmethoden für 2D-SDS- PAGE	60
Abbildung 18: 2D-Gelelektrophorese von Rieslingtrauben des Jahrgangs 2012 während der Reifung.....	63
Abbildung 19: 2D-Western Blot des ersten Rieslingreifestadiums 2012 gegen Traubentyrosinase	67
Abbildung 20: 2D-Gelelektrophorese von Rieslingtrauben des Jahrgangs 2013 während der Reifung.....	68
Abbildung 21: Meteogramm für Mainz-Marienborn 2012	70
Abbildung 22: Meteogramm für Mainz-Marienborn 2013	71
Abbildung 23: SDS-Gelelektrophorese extrahierter Dornfelderproteine während der Reifung.....	73
Abbildung 24: Vergleich von Phenol- und Martinez-Fällung von Proteinen aus Dornfeldertrauben im 3. Grünstadium	74
Abbildung 25: 2D-Gelelektrophorese der Grünstadien von Dornfeldertrauben des Jahrgangs 2012.....	76
Abbildung 26: 2D-Gelelektrophorese der Reifestadien von Dornfeldertrauben des Jahrgangs 2012.....	78

Abbildung 27: 2D-Western Blots des ersten und vierten Reifestadiums von Dornfeldertrauben gegen Tyrosinase.....	79
Abbildung 28: Elutionsprofil der SEC von Rieslingproteinen	82
Abbildung 29: Dot Blot der tyrosinasehaltigen Fraktionen nach SEC.....	83
Abbildung 30: SDS-Gel der vereinigten tyrosinasehaltiger Fraktionen nach SEC.....	84
Abbildung 31: Westernblot der aufgereinigten Tyrosinasen aus Rieslingtrauben	84
Abbildung 32: Produktspektren von Kaffee- und Kaftarsäure bei Katalyse mit Tyrosinase aus Rieslingtrauben	86
Abbildung 33: Produktspektrum von p-Cumarsäure bei Katalyse mit Tyrosinase aus Rieslingtrauben	87
Abbildung 34: Produktspektren von Ferula- und Sinapinsäure bei Katalyse mit Tyrosinase aus <i>Agaricus bisporus</i>	88
Abbildung 35: Produktspektren von Resveratrol und Polydatin bei Katalyse mit Tyrosinase aus Rieslingtrauben	89
Abbildung 36: Produktspektren von Phloretin und Phlorizin bei Katalyse mit Tyrosinase aus Rieslingtrauben	90
Abbildung 37: Produktspektrum von Gallussäure und Ethylgallat bei Katalyse mit Tyrosinase aus Rieslingtrauben	91
Abbildung 38: Produktspektrum von 4-Hydroxybenzoesäure und 3,4-Dihydroxybenzoesäure bei Katalyse mit Tyrosinase aus Rieslingtrauben	92
Abbildung 39: Produktspektrum von Vanillinsäure bei Katalyse mit Tyrosinase aus Rieslingtrauben	93
Abbildung 40: Sauerstoffverbrauch beim Umsatz von Cumarsäure durch Tyrosinase.....	94
Abbildung 41: Bestimmung des Temperaturoptimums von Rieslingtyrosinase mit Kaffeesäure	96
Abbildung 42: Bestimmung des Temperaturoptimums von Rieslingtyrosinase mit Dopamin	97
Abbildung 43: Bestimmung des Temperaturoptimums von Rieslingtyrosinase mit Cumarsäure.....	98
Abbildung 44: Einfluss von Rotwein und Tyrosinase auf die antioxidative Kapazität von THP1 Zellen.....	100
Abbildung 45: Einfluss von Rotwein und Tyrosinase auf die antioxidative Kapazität von EA.hy 926 Zellen	101
Abbildung 46: DC von phenolischen Weininhaltsstoffen sowie deren Tyrosinaseoxidationsprodukten.....	102
Abbildung 47: Einfluss von Tyrosinase aus <i>Agaricus bisporus</i> auf Scavenger-Aktivität phenolischer Weininhaltsstoffe	103
Abbildung 48: Antioxidative Kapazität von phenolischen Weininhaltsstoffen sowie deren Tyrosinaseoxidationsprodukte in THP1 Zellen....	104

Abbildung 49: Antioxidative Kapazität von phenolischen Weininhaltsstoffen sowie deren Tyrosinaseoxidationsprodukte in EA.hy 926 Zellen	105
Abbildung 50: Vergleich der Reduktion von DPPH von Kaffee- und Ferulasäure über die Zeit	107
Abbildung 51: Vergleich der Reduktion von DPPH von Kaffee- und p-Cumarsäure über die Zeit	110
Abbildung 52: Strukturen von Zwischenprodukten der Melaninsynthese	111
Abbildung 53: Phenolische Weininhaltsstoffe vor und nach Oxidation durch Tyrosinase aus Rieslingtrauben	112
Abbildung 54: Einfluss von Tyrosinase aus Rieslingtrauben auf Scavenger-Aktivität phenolischer Weininhaltsstoffe	113
Abbildung 55: Antioxidative Kapazität von phenolischen Weininhaltsstoffen sowie deren Tyrosinaseoxidationsprodukten in THP1 Zellen..	114
Abbildung 56: Antioxidative Kapazität von phenolischen Weininhaltsstoffen sowie deren Tyrosinaseoxidationsprodukten in EA.hy 926 Zellen	114
Abbildung 57: Überprüfung der Substratspezifität von Laccase aus <i>Botrytis cinerea</i> bezüglich Tyrosol	120
Abbildung 58: Rieslingweinherstellung im Weingut der Stadt Mainz	121
Abbildung 59: Tyrosinaseaktivität der ersten Riesling-Weinvorstufe	122
Abbildung 60: Tyrosinaseaktivität der zweiten Riesling-Weinvorstufe	123
Abbildung 61: Einfluss von Schwefel auf Rieslingtyrosinaseaktivität	124
Abbildung 62: Einfluss von Bentonit auf Rieslingtyrosinaseaktivität	126

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Durchschnittliche Konzentration phenolischer Weininhaltsstoffe in Weinen	11
Tabelle 2: Probenakquise Rieslingtrauben	34
Tabelle 3: Probenakquise Dornfeldertrauben	34
Tabelle 4: Top 20 Proteine aus reifen Dornfeldertrauben.....	58
Tabelle 5: Mittels Massenspektrometrie identifizierte Proteinspots von Rieslingtrauben in der Entwicklung.....	64
Tabelle 6: Sauerstoffverbrauchsmessung beim katalytischen Umsatz von phenolischen Weininhaltsstoffen durch Tyrosinase aus <i>Agaricus bisporus</i>	95
Tabelle 7: Proteine aus reifen Dornfeldertrauben.....	172

8 Anhang

Tabelle 7: Proteine aus reifen Dornfeldertrauben

Aufgelistet sind alle Proteine, welche mit Massenspektrometrie nach vorangegangener Calbiochem-Fällung identifiziert wurden. Verwendet wurden Dornfeldertrauben vom 23.09.2011. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf die Gesamtmasse aller Proteine

Protein	Konzentration [nmol/g]	Molekulare Masse (theoretisch) [Dalton]	Sequence Name	Prozentualer Anteil (molar)
legumin a-like	1355,58	55948	gi 225438131 ref XP_002278346.1	6,840
Predicted: cruciferin CRU1-like	1081,25	57346	gi 225438123 ref XP_002278201.1	5,456
class iv chitinase	689,90	28384	gi 33329392 gb AAQ10093.1	3,481
PREDICTED: uncharacterized protein LOC100252479	535,02	40676	gi 225430200 ref XP_002284962.1	2,699
enolase	468,59	48338	gi 731423140 ref XP_002267091.2	2,364
fructose-bisphosphate aldolase cytoplasmic isozyme	406,33	39030	gi 225440976 ref XP_002283381.1	2,050
vicilin-like antimicrobial peptides 2-3	404,80	64531	gi 731394960 ref XP_003632318.2	2,042
glyceraldehyde-3-phosphate cytosolic	321,90	36906	gi 359491599 ref XP_002263145.2	1,624
basic 7s globulin-like	227,96	48136	gi 731416226 ref XP_010659830.1	1,150
isocitrate lyase	218,69	65047	gi 225447308 ref XP_002280024.1	1,103
glucan endo-beta-glucosidase basic isoform-like	201,84	36734	gi 225441373 ref XP_002277446.1	1,018
udp-glucose pyrophosphorylase	198,27	50368	gi 731387895 ref XP_010649415.1	1,000
beta- soluble isoenzyme i-like	189,70	60784	gi 225466093 ref XP_002265534.1	0,957
hypothetical protein VITISV_015174	186,10	43477	gi 147797317 emb CAN62776.1	0,939
enolase 1	152,56	48159	gi 225441000 ref XP_002283632.1	0,770
pathogenesis-related protein 10	141,73	17357	gi 225431844 ref XP_002274242.1	0,715
malate dehydrogenase	135,25	35904	gi 225438145 ref XP_002278712.1	0,682
polyphenol oxidase	129,13	67789	gi 1785613 gb AAB41022.1	0,652
actin	118,97	41954	gi 225431585 ref XP_002282516.1	0,600
nadp-dependent malic enzyme	116,49	65737	gi 526117900 ref NP_001268142.1	0,588
peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	114,50	18167	gi 225457957 ref XP_002274869.1	0,578
ascorbate peroxidase	108,88	27729	gi 225435177 ref XP_002284767.1	0,549
thaumatin-like protein	106,39	24881	gi 2213852 gb AAB61590.1	0,537
malate mitochondrial-like	104,48	37088	gi 526117711 ref NP_001268095.1	0,527
nucleoside diphosphate kinase 1	103,76	16310	gi 225453350 ref XP_002271352.1	0,524
PREDICTED: uncharacterized protein LOC100258445	102,44	40090	gi 225450055 ref XP_002276894.1	0,517
legumin a	100,84	52466	gi 297744151 emb CBI37121.3	0,509
low-temperature-induced cysteine proteinase-like	96,30	42455	gi 359483753 ref XP_002266308.2	0,486
heat shock cognate protein 80-like	93,22	81134	gi 225462013 ref XP_002273244.1	0,470
glyceraldehyde-3-phosphate cytosolic	92,49	36873	gi 225425884 ref XP_002270414.1	0,467
cyclase family protein	91,01	30097	gi 147838052 emb CAN60921.1	0,459
probable fructose-bisphosphate aldolase chloro-plastic	88,99	43122	gi 731369971 ref XP_010662289.1	0,449
hypothetical protein VITISV_018965	88,80	208791	gi 147787725 emb CAN71912.1	0,448
5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	87,24	74545	gi 225439223 ref XP_002276438.1	0,440

phosphoglycerate cytosolic	86,92	42536	gi 225464999 ref XP_002263950.1	0,439
pdi-like 1-1 isoform 2	86,86	55956	gi 225459587 ref XP_002285864.1	0,438
dehydrin 2	86,04	23768	gi 225459822 ref XP_002285919.1	0,434
vacuolar invertase	82,08	71832	gi 1839578 gb AAB47171.1	0,414
2s albumin precursor	81,02	19499	gi 30421130 gb AAP31046.1	0,409
triosephosphate cytosolic	74,71	27372	gi 147784332 emb CAN70587.1	0,377
chloroplastic	74,66	67521	gi 359490179 ref XP_002266494.2	0,377
serine protease chloroplastic-like	74,17	76419	gi 225455748 ref XP_002268894.1	0,374
peroxiredoxin family protein	74,11	17320	gi 526118089 ref NP_001268191.1	0,374
s-adenosyl-l-homocysteine hydrolase a	72,63	53809	gi 225433506 ref XP_002266154.1	0,366
Putative 2-3 biphosphoglycerate independant phosphoglycerate mutase [vitis vinifera]	69,72	60426	gi 239056191 emb CAQ58628.1	0,352
triosephosphate cytosolic	68,41	27413	gi 225449541 ref XP_002283693.1	0,345
heat shock cognate 70 kda protein 2	65,64	71570	gi 359486799 ref XP_002283532.2	0,331
monodehydroascorbate reductase	65,45	47551	gi 526118253 ref NP_001267971.1	0,330
villin-4-like isoform x1	64,28	108626	gi 731408438 ref XP_010656852.1	0,324
4-hydroxy-4-methyl-2-oxoglutarate aldolase 2	63,02	17996	gi 225430941 ref XP_002277981.1	0,318
oxygen-evolving enhancer protein chloroplastic-like	62,87	24387	gi 302143507 emb CBI22068.3	0,317
5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	60,40	81646	gi 147821107 emb CAN73135.1	0,305
alcohol dehydrogenase 1	60,31	41803	gi 7264740 gb AAF44335.1 AF195866_1	0,304
glycine-rich rna-binding protein	58,14	13094	gi 297741463 emb CBI32594.3	0,293
sucrose synthase 1	57,45	92939	gi 225437428 ref XP_002271896.1	0,290
thaumatin-like protein	57,36	24963	gi 7406716 emb CAB85637.1	0,289
polyphenol oxidase	57,20	67746	gi 1247362 emb CAA01887.1	0,289
glutelin type-a 3	56,93	26590	gi 225447979 ref XP_002269792.1	0,287
protein p21	56,18	22812	gi 147801462 emb CAN68052.1	0,283
aspartic proteinase	54,90	46916	gi 359483345 ref XP_003632941.1	0,277
polyphenol oxidase	54,59	47938	gi 633259651 dbj BAO79386.1	0,275
glutamate decarboxylase 1	54,41	55629	gi 225466257 ref XP_002270937.1	0,275
protein trichome birefringence-like 38	52,53	41922	gi 225461784 ref XP_002285609.1	0,265
atp synthase subunit mitochondrial-like	52,32	59294	gi 225456079 ref XP_002280824.1	0,264
lysosomal alpha-mannosidase-like	51,27	115866	gi 359488553 ref XP_002276092.2	0,259
sec14 cytosolic factor family protein phosphoglyceride transfer family protein isoform 1	50,85	68097	gi 225460394 ref XP_002267428.1	0,257
PREDICTED: phosphoglucomutase, cytoplasmic [Vitis vinifera]	50,29	63926	gi 225424316 ref XP_002284729.1	0,254
alpha-expansin 11 precursor family protein	49,95	28153	gi 225459728 ref XP_002285891.1	0,252
peroxidase 4-like	49,92	34517	gi 223635590 sp A7NY33.1 PER4_VITVI	0,252
atp-citrate synthase beta chain protein 2	49,91	66389	gi 225431960 ref XP_002278181.1	0,252
low-temperature-induced cysteine proteinase	49,73	43801	gi 302142276 emb CBI19479.3	0,251
protein p21	48,60	24828	gi 526117856 ref NP_001268131.1	0,245
luminal-binding protein 5	48,43	73810	gi 225426230 ref XP_002263323.1	0,244
elongation factor 2-like	48,34	94949	gi 225462164 ref XP_002266780.1	0,244
xylose isomerase-like	48,02	53731	gi 359485034 ref XP_002277520.2	0,242
glutelin type-a 3	46,55	38647	gi 225447990 ref XP_002270155.1	0,235
protein p21	44,60	24904	gi 89242714 gb ABD64682.1	0,225

oxygen-evolving enhancer protein 3-1	44,05	23931	gi 225469185 ref XP_002275624.1	0,222
macrophage migration inhibitory factor homolog	43,78	12079	gi 225439550 ref XP_002263560.1	0,221
probable xyloglucan endotransglucosylase hydro- lase protein 31	43,11	33039	gi 225436484 ref XP_002275862.1	0,218
expansin	42,76	27293	gi 225448683 ref XP_002280300.1	0,216
nad -binding rosmann-fold superfamily protein isoform 1	42,42	27699	gi 731401385 ref XP_010654260.1	0,214
mlp-like protein 43	41,97	17275	gi 526117936 ref NP_001268151.1	0,212
glucan endo- -beta- basic isoform-like	41,97	37559	gi 526117942 ref NP_001268153.1	0,212
adenosine kinase 2	41,81	37376	gi 225449016 ref XP_002272337.1	0,211
minor allergen alt a 7-like	41,46	20392	gi 225461209 ref XP_002283286.1	0,209
lipid transfer protein	41,41	12256	gi 28194086 gb AAO33394.1 AF467946_1	0,209
annexin d1-like	41,16	35359	gi 225459318 ref XP_002285795.1	0,208
l-ascorbate oxidase homolog	40,84	60454	gi 225428247 ref XP_002282214.1	0,206
isopentenyl-diphosphate delta-isomerase i	40,51	26434	gi 347664497 gb AEP17009.1	0,204
l-ascorbate oxidase homolog	39,81	60184	gi 225468506 ref XP_002270831.1	0,201
plastid-lipid-associated chloroplastic-like	39,30	30408	gi 147787229 emb CAN69132.1	0,198
isoflavone reductase-like protein	39,19	33929	gi 76559896 tpe CAI56335.1	0,198
soluble inorganic pyrophosphatase isoform 1	38,89	24520	gi 359476682 ref XP_002264695.2	0,196
linoleate 13s-lipoxygenase 2- chloroplastic-like	38,33	101968	gi 526117441 ref NP_001268023.1	0,193
putative ripening-related protein [Vitis vinifera]	38,13	15389	gi 7406667 emb CAB85627.1	0,192
probable phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase	37,59	18842	gi 731379285 ref XP_010660805.1	0,190
aconitate cytoplasmic	37,29	110741	gi 225460961 ref XP_002278138.1	0,188
ribulose- -bisphosphate carboxylase oxygenase large subunit	37,22	52001	gi 46275228 emb CAG25748.1	0,188
probable phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase	37,04	42967	gi 297742530 emb CBI34679.3	0,187
kiwellin	36,59	23654	gi 526117545 ref NP_001268052.1	0,185
fatty acid hydroperoxide lyase	36,05	55034	gi 268636280 gb ACZ17394.1	0,182
probable chalcone--flavonone isomerase 3	35,55	21552	gi 225448675 ref XP_002280158.1	0,179
2-cys peroxiredoxin chloroplastic-like	35,32	30346	gi 731399769 ref XP_010653738.1	0,178
vicilin-like antimicrobial peptides 2-2	34,74	50236	gi 147780727 emb CAN60323.1	0,175
elongation factor 1-alpha	34,73	49679	gi 225435241 ref XP_002284924.1	0,175
xylose isomerase	34,58	51819	gi 147787652 emb CAN65150.1	0,174
thioredoxin h-type	34,42	12989	gi 307949517 gb ADN96594.1	0,174
peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	34,35	18541	gi 359475042 ref XP_003631573.1	0,173
acetyl- cytosolic 1	34,27	41531	gi 225447510 ref XP_002265690.1	0,173
PREDICTED: uncharacterized protein LOC100255480	33,84	51312	gi 147818959 emb CAN67131.1	0,171
translationally-controlled tumor protein homolog	33,66	19023	gi 731388721 ref XP_010649714.1	0,170
probable 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase-like mitochondrial	32,97	39543	gi 359485993 ref XP_002270228.2	0,166
probable protein disulfide-isomerase a6	32,89	37089	gi 225450626 ref XP_002282603.1	0,166
protein p21	32,88	24850	gi 225426795 ref XP_002282988.1	0,166
puromycin-sensitive aminopeptidase isoform x2	32,63	101577	gi 731379116 ref XP_010660557.1	0,165
calreticulin	32,56	49591	gi 225450611 ref XP_002282401.1	0,164
elongation factor 1-gamma-like	32,55	48539	gi 359493457 ref XP_002278756.2	0,164
annexin d2-like	32,35	35791	gi 147856520 emb CAN82835.1	0,163

unnamed protein product <i>Vitis vinifera</i>	32,23	34847	gi 297734087 emb CBI15334.3	0,163
unnamed protein product <i>Vitis vinifera</i>	31,33	54332		0,158
alanine aminotransferase 2	31,16	53597	gi 359482440 ref XP_002265294.2	0,157
isoaspartyl peptidase l-asparaginase 1-like	31,09	34343	gi 225455706 ref XP_002266571.1	0,157
probable galactinol--sucrose galactosyltransferase 2	31,03	86027	gi 526117964 ref NP_001267904.1	0,157
probable nucleoredoxin 1	30,93	65732	gi 147799889 emb CAN77321.1	0,156
glutamate dehydrogenase 2	30,86	45278	gi 225454886 ref XP_002278888.1	0,156
14-3-3-like protein	30,84	28895	gi 225468983 ref XP_002262802.1	0,156
polyubiquitin-a-like isoform x4	30,81	86581	gi 302143601 emb CBI22354.3	0,155
aspartate cytoplasmic	30,73	45287	gi 225445206 ref XP_002284313.1	0,155
udp-glucuronic acid decarboxylase 5	30,67	38961	gi 731413083 ref XP_010658590.1	0,155
pyruvate cytosolic isozyme-like	30,53	56421	gi 225441044 ref XP_002283911.1	0,154
hypothetical protein VITISV_012575	30,12	227023	gi 147789572 emb CAN67422.1	0,152
katanin p60 atpase-containing subunit a1	29,88	43917	gi 731402564 ref XP_002284955.2	0,151
profilin 3 family protein	29,77	14234	gi 731384839 ref XP_002274966.2	0,150
14-3-3 protein	29,66	29458	gi 526117762 ref NP_001267852.1	0,150
superoxide dismutase	29,62	17105	gi 526117872 ref NP_001268135.1	0,149
leucine aminopeptidase 1-like	29,31	55450	gi 225445867 ref XP_002276114.1	0,148
linoleate 13s-lipoxygenase 2- chloroplastic-like	28,92	101955	gi 268636245 gb ACZ17391.1	0,146
phosphoglycerate cytosolic	28,46	36712	gi 297736145 emb CBI24183.3	0,144
hypothetical protein VITISV_012939 <i>Vitis vinifera</i>	28,18	153083	gi 147841689 emb CAN70895.1	0,142
heat shock cognate protein 80-like	28,17	80075	gi 359495606 ref XP_003635036.1	0,142
protein p21	28,16	25053	gi 731379559 ref XP_010661214.1	0,142
isoflavone reductase-like protein	28,04	33884	gi 526118006 ref NP_001268171.1	0,141
aspartate chloroplastic	27,99	51166	gi 225430398 ref XP_002285385.1	0,141
beta-glucosidase 42	27,84	55394	gi 359495874 ref XP_002265653.2	0,140
pyruvate decarboxylase 1	27,78	63223	gi 225443847 ref XP_002275486.1	0,140
superoxide dismutase	27,38	15453	gi 225451122 ref XP_002268436.1	0,138
pyruvate cytosolic isozyme	27,10	55780	gi 239056192 emb CAQ58629.1	0,137
proteasome subunit alpha type-2-b	27,02	25584	gi 225423722 ref XP_002278126.1	0,136
protein p21	26,90	20977	gi 7406714 emb CAB85636.1	0,136
atp synthase f1 subunit 1	26,72	55429	gi 209954192 emb CAQ77653.1	0,135
elongation factor beta-1	26,58	25075	gi 225456295 ref XP_002283673.1	0,134
heat shock 70 kda protein 15-like	25,46	94117	gi 359482944 ref XP_002279789.2	0,128
cell division cycle protein 48 homolog	25,40	90387	gi 225440045 ref XP_002282146.1	0,128
glutamate decarboxylase-like	25,36	57469	gi 225462892 ref XP_002263081.1	0,128
glutelin type-a 1	25,04	38502	gi 225435090 ref XP_002284459.1	0,126
hsp70-hsp90 organizing protein 3-like	24,94	32167	gi 731440696 ref XP_003635686.2	0,126
dna-damage-repair toleration protein drt100-like	24,92	38411	gi 375112316 gb AFA35119.1	0,126
hypothetical protein VITISV_012129	24,92	18429	gi 147774309 emb CAN72401.1	0,126
6-phosphogluconate decarboxylating 3	24,91	48514	gi 147795381 emb CAN67602.1	0,126
ubiquitin-activating enzyme e1 1	24,68	123217	gi 731391766 ref XP_002275617.3	0,125
probable voltage-gated potassium channel subunit beta	24,67	36879	gi 225433414 ref XP_002285645.1	0,124
carboxymethylenebutenolidase homolog	24,63	26455	gi 147809484 emb CAN60148.1	0,124
probable glutathione s-transferase	24,59	17452	gi 296086753 emb CBI32902.3	0,124

probable galactinol--sucrose galactosyltransferase 2	24,56	86126	gi 187941007 gb ACD39775.1	0,124
heat shock protein 70	24,37	71634	gi 225434984 ref XP_002284008.1	0,123
alpha-xylosidase 1-like	24,32	98716	gi 225423961 ref XP_002282429.1	0,123
cysteine proteinase inhibitor	24,30	11222	gi 225435931 ref XP_002268378.1	0,123
monocopper oxidase-like protein sku5	24,29	66009	gi 225426946 ref XP_002266352.1	0,123
luminal-binding protein 5	24,16	71470	gi 302143929 emb CBI23034.3	0,122
elongation factor 2-like	24,16	31100	gi 296082759 emb CBI21764.3	0,122
heat shock cognate 70 kda protein 2	23,83	71465	gi 225440324 ref XP_002263599.1	0,120
unnamed protein product Vitis vinifera	23,73	44867		0,120
plant basic secretory protein family protein	23,72	25441	gi 147784683 emb CAN65930.1	0,120
anthocyanidin synthase	23,64	40478	gi 122893274 gb ABM67590.1	0,119
unnamed protein product Vitis vinifera	23,48	58100		0,118
gdsI esterase lipase at5g14450-like	23,40	40203	gi 731418898 ref XP_002271320.2	0,118
actin-1	23,32	42043	gi 225449523 ref XP_002283590.1	0,118
glutathione s-transferase	23,26	24393	gi 526117830 ref NP_001267869.1	0,117
ketol-acid chloroplastic	23,17	57558	gi 225446579 ref XP_002280094.1	0,117
probable aldo-keto reductase 2	23,01	35292	gi 731390561 ref XP_002266027.2	0,116
aconitate hydratase 1	23,00	98815	gi 225468576 ref XP_002263337.1	0,116
pyrophosphate--fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase subunit alpha	22,74	68200	gi 225457674 ref XP_002276269.1	0,115
fumarylacetoacetase family protein	22,61	46050	gi 731439308 ref XP_010646198.1	0,114
temperature-induced lipocalin	22,51	21594	gi 77744883 gb ABB02395.1	0,114
dihydrolipoyl mitochondrial	22,22	53319	gi 225432110 ref XP_002263180.1	0,112
uncharacterized oxidoreductase at4g09670-like	22,10	39589	gi 147858660 emb CAN80430.1	0,112
adp-ribosylation factor 2	22,04	18238	gi 297744026 emb CBI36996.3	0,111
basic blue	21,77	13115	gi 225448071 ref XP_002275987.1	0,110
ubiquitin-conjugating enzyme e2 2	21,69	13784	gi 359488893 ref XP_003633840.1	0,109
chalcone isomerase	21,58	25253	gi 526117481 ref NP_001268033.1	0,109
pyruvate decarboxylase 1	21,51	63527	gi 10732644 gb AAG22488.1 AF195868_1	0,109
3-hydroxyisobutyryl- hydrolase-like protein mitochondrial isoform x1	21,47	45078	gi 359484612 ref XP_003633131.1	0,108
proline--trna ligase	21,34	59295	gi 225437777 ref XP_002281375.1	0,108
malate mitochondrial	21,30	36712	gi 225461618 ref XP_002285356.1	0,107
dirigent protein 22	21,17	20940	gi 225435668 ref XP_002285682.1	0,107
unnamed protein product	21,15	11977	gi 296081194 emb CBI18220.3	0,107
tubulin alpha-3 chain	21,06	50297	gi 225435758 ref XP_002285721.1	0,106
sucrose phosphate synthase	21,04	116584	gi 296084519 emb CBI25540.3	0,106
phosphoglycerate chloroplastic	21,04	41008	gi 225464995 ref XP_002263796.1	0,106
21 kda	20,91	21356	gi 526117896 ref NP_001268141.1	0,105
late embryogenesis abundant group 2 isoform 1	20,86	34737	gi 225434253 ref XP_002280489.1	0,105
kda class i heat shock protein	20,77	17445	gi 296512261 emb CBM39272.1	0,105
kda class i heat shock	20,76	16311	gi 225434742 ref XP_002281506.1	0,105
5 -methylthioadenosine s-adenosylhomocysteine nucleosidase 1-like	20,64	28448	gi 526117669 ref NP_001268084.1	0,104
aminopeptidase m1-like	20,61	99825	gi 225429582 ref XP_002280239.1	0,104
pathogenesis-related protein 10	20,60	17246	gi 225431846 ref XP_002274309.1	0,104
proteasome subunit alpha type-6	20,59	27439	gi 225442079 ref XP_002271929.1	0,104

14-3-3-like protein a	20,51	29654	gi 225451995 ref XP_002283492.1	0,104
alcohol dehydrogenase 1	20,50	41807	gi 526117665 ref NP_001268083.1	0,103
probable aldehyde dehydrogenase	20,48	60909	gi 225456697 ref XP_002273569.1	0,103
probable glycerophosphoryl diester phosphodiesterase 2	20,42	70805	gi 147811111 emb CAN61355.1	0,103
ribonuclease uk114-like	20,39	13803	gi 147819973 emb CAN78303.1	0,103
galactokinase	20,33	54927	gi 225432012 ref XP_002279647.1	0,103
isopentenyl-diphosphate delta-isomerase i	20,25	33451	gi 347664495 gb AEP17008.1	0,102
probable xaa-pro aminopeptidase p	20,24	72159	gi 225430834 ref XP_002273246.1	0,102
probable quinone oxidoreductase	20,15	35610	gi 731402959 ref XP_002271007.3	0,102
allene oxide cyclase chloroplastic-like	20,15	27822	gi 526117952 ref NP_001267900.1	0,102
stem-specific protein tsjt1-like	20,14	28225	gi 225461387 ref XP_002284777.1	0,102
triosephosphate chloroplastic	20,10	27708	gi 297744661 emb CBI37923.3	0,101
unnamed protein product Vitis vinifera	19,43	32916		0,098
proteasome subunit alpha type-7	19,40	24425	gi 147862790 emb CAN78932.1	0,098
thiol protease aleurain-like	19,25	40434	gi 225444726 ref XP_002278624.1	0,097
peroxidase a2-like	19,13	37066	gi 359478431 ref XP_002285652.2	0,097
udp-glucose 6-dehydrogenase 1	19,02	53532	gi 225452968 ref XP_002284346.1	0,096
importin subunit beta-1-like	18,76	97466	gi 225455336 ref XP_002276600.1	0,095
ribulose- -bisphosphate carboxylase oxygenase large subunit	18,61	53017	gi 224365614 ref YP_002608342.1	0,094
succinyl- ligase	18,53	45858	gi 225438067 ref XP_002275953.1	0,094
serine hydroxymethyltransferase 4	18,53	52420	gi 225433510 ref XP_002266276.1	0,093
14-3-3-like protein gf14 kappa	18,51	28764	gi 359492927 ref XP_003634483.1	0,093
phosphoenolpyruvate carboxykinase	18,48	45064	gi 731440022 ref XP_003635615.2	0,093
amp-dependent synthetase and ligase family protein	18,48	56393	gi 225470747 ref XP_002267459.1	0,093
oxygen-evolving enhancer protein chloroplastic	18,41	33462	gi 147791852 emb CAN61828.1	0,093
dihydropyrimidine dehydrogenase	18,40	40433	gi 225456230 ref XP_002283095.1	0,093
malate cytoplasmic-like isoform x2	18,38	36262	gi 225453490 ref XP_002277543.1	0,093
glutathione cytosolic	18,38	54382	gi 225433440 ref XP_002285672.1	0,093
pathogenesis-related protein 10	18,38	17474	gi 225431852 ref XP_002274617.1	0,093
nadh-cytochrome b5 reductase-like protein	18,27	36026	gi 225445442 ref XP_002285073.1	0,092
legumin a-like	18,17	52558	gi 297744149 emb CBI37119.3	0,092
heparanase-like protein 3	18,12	59199	gi 296084540 emb CBI25561.3	0,091
unnamed protein product Vitis vinifera	18,06	30510		0,091
chalcone isomerase	18,04	25311	gi 499036 emb CAA53577.1	0,091
isocitrate dehydrogenase	17,97	46683	gi 225466253 ref XP_002270617.1	0,091
prolyl oligopeptidase family protein	17,73	83498	gi 731427760 ref XP_002285910.2	0,089
2-hydroxyacyl- lyase	17,71	61564	gi 225462809 ref XP_002266004.1	0,089
expansin-like a2	17,67	29070	gi 225428199 ref XP_002281851.1	0,089
chaperonin cpn60- mitochondrial	17,66	61240	gi 225433375 ref XP_002285608.1	0,089
phospholipase d alpha 1	17,61	92319	gi 84620126 gb ABC59316.1	0,089
3-dehydroquinate synthase-like	17,59	49734	gi 526117699 ref NP_001268092.1	0,089
l-ascorbate oxidase homolog	17,57	60251	gi 225459808 ref XP_002285913.1	0,089
glutaredoxin	17,57	12036	gi 225452402 ref XP_002276266.1	0,089
aldehyde dehydrogenase family 7 member b4	17,56	55388	gi 225444704 ref XP_002278093.1	0,089

retrotransposon ty3-gypsy subclass	17,45	144132	gi 297735014 emb CBI17376.3	0,088
pathogenesis-related protein 10	17,44	17444	gi 225431850 ref XP_002274535.1	0,088
calcium-binding ef hand family protein	17,43	39912	gi 731383236 ref XP_002276532.2	0,088
l-galactose-1-phosphate phosphatase	17,17	27470	gi 731404409 ref XP_010655423.1	0,087
flavanone 3-hydroxylase	17,06	41084	gi 147807405 emb CAN61951.1	0,086
aminoacylase-1 isoform x2	17,03	46020	gi 297744461 emb CBI37723.3	0,086
gtp-binding nuclear protein ran-3	16,99	25404	gi 225430204 ref XP_002284971.1	0,086
arm-repeat tetratricopeptide repeat-like protein	16,99	115885	gi 147838438 emb CAN63254.1	0,086
fatty acid hydroperoxide lyase	16,90	54950	gi 311294091 gb ADP88810.1	0,085
elongation factor 1-beta-like	16,70	25661	gi 731393652 ref XP_010651550.1	0,084
udp-glucose 4-epimerase gepi48-like	16,69	38428	gi 731378460 ref XP_010659344.1	0,084
hypothetical protein VITISV_002875 Vitis vinifera	16,60	156173	gi 147783484 emb CAN72956.1	0,084
subtilisin-like protease	16,50	81763	gi 225438930 ref XP_002284101.1	0,083
fasciclin-like arabinogalactan protein 2	16,47	43607	gi 147798736 emb CAN61077.1	0,083
unnamed protein product	16,44	23994	gi 297743870 emb CBI36840.3	0,083
sister-chromatid cohesion protein 3 isoform x1	16,37	184809	gi 147777089 emb CAN67841.1	0,083
actin-depolymerizing factor 2	16,27	15595	gi 225435040 ref XP_002284292.1	0,082
proteasome subunit beta type-1	16,16	24970	gi 225453909 ref XP_002279266.1	0,082
s-formylglutathione hydrolase	16,01	32996	gi 225441910 ref XP_002284489.1	0,081
protein aspartic protease in guard cell 2-like	15,96	40199	gi 225465837 ref XP_002264626.1	0,081
cysteine proteinase rd21a-like	15,96	43780	gi 296090463 emb CBI40282.3	0,081
nascent polypeptide-associated complex subunit alpha-like protein 1	15,88	19177	gi 297741710 emb CBI32842.3	0,080
vicilin-like antimicrobial peptides 2-2	15,83	42522	gi 297746216 emb CBI16272.3	0,080
obg-like atpase 1	15,80	44822	gi 225444063 ref XP_002263885.1	0,080
20 kda chloroplastic	15,80	25729	gi 147815877 emb CAN72581.1	0,080
udp-glucose 6-	15,77	53371	gi 225423507 ref XP_002269692.1	0,080
atp synthase cf1 beta subunit	15,69	52458	gi 147843974 emb CAN81591.1	0,079
probable 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase-like mitochondrial	15,65	36496	gi 359484336 ref XP_002283629.2	0,079
haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein sgpp	15,64	27094	gi 147828171 emb CAN70692.1	0,079
phosphomannomutase	15,62	28285	gi 225454105 ref XP_002267677.1	0,079
formate dehydrogenase	15,59	42338	gi 225452472 ref XP_002278444.1	0,079
l-ascorbate peroxidase cytosolic	15,54	28171	gi 161778778 gb ABX79340.1	0,078
transaldolase family protein	15,42	48388	gi 225425280 ref XP_002271514.1	0,078
alpha tubulin 1	15,39	32009	gi 297739393 emb CBI29424.3	0,078
aldehyde dehydrogenase family 2 member mitochondrial	15,35	58677	gi 731374652 ref XP_010653335.1	0,077
proteasome subunit beta type-2-a	15,35	18878	gi 359479647 ref XP_003632316.1	0,077
probably inactive leucine-rich repeat receptor-like protein kinase at2g25790	15,33	51443	gi 147790125 emb CAN59940.1	0,077
6-phosphogluconate decarboxylating chloroplastic	15,27	54239	gi 225426063 ref XP_002275970.1	0,077
glutathione s-transferase l3-like	15,20	27283	gi 225439775 ref XP_002275882.1	0,077
flavonoid 3-methyltransferase-like	15,18	20868	gi 146148669 gb ABQ02272.1	0,077
glutathione s-transferase f13-like	15,00	24873	gi 225436699 ref XP_002263386.1	0,076
cation calcium exchanger 4	14,96	194663	gi 297742988 emb CBI35855.3	0,075
proteasome subunit alpha type-1-b	14,94	30932	gi 225458231 ref XP_002281948.1	0,075

protein dj-1 homolog b-like	14,89	42159	gi 302142910 emb CBI20205.3	0,075
glucose-6-phosphate cytosolic	14,82	62990	gi 225458305 ref XP_002282774.1	0,075
protein dj-1 homolog d	14,81	42125	gi 297738171 emb CBI27372.3	0,075
endoplasmic homolog	14,66	123652	gi 147865450 emb CAN79404.1	0,074
thioredoxin reductase	14,61	39942	gi 731387671 ref XP_002263864.2	0,074
udp-glucose:flavonoid 3-o-glucosyltransferase	14,50	50373	gi 225454815 ref XP_002277035.1	0,073
stem-specific protein tsjt1-like	14,47	27402	gi 147805616 emb CAN71784.1	0,073
probable l-ascorbate peroxidase chloroplastic isoform x2	14,44	40248	gi 359492510 ref XP_003634424.1	0,073
lysosomal alpha-mannosidase-like	14,43	112949	gi 225456481 ref XP_002280858.1	0,073
14-3-3-like protein d isoform x2	14,31	29665	gi 359483716 ref XP_002273375.2	0,072
peptide methionine sulfoxide reductase a1-like	14,23	23410	gi 225454994 ref XP_002281325.1	0,072
probable aldo-keto reductase 2	14,15	22297	gi 225433664 ref XP_002265775.1	0,071
guanosine nucleotide diphosphate dissociation inhibitor 2	14,10	50323	gi 225434259 ref XP_002280606.1	0,071
udp-sugar pyrophosphorylase	14,09	68282	gi 225459679 ref XP_002285885.1	0,071
unnamed protein product Vitis vinifera	14,03	19889		0,071
phosphoglycerate chloroplastic	14,01	42758	gi 297736144 emb CBI24182.3	0,071
spermidine synthase	13,98	33032	gi 225424695 ref XP_002263762.1	0,071
probable pectinesterase pectinesterase inhibitor 40-like	13,96	62219	gi 359479995 ref XP_002271665.2	0,070
proline iminopeptidase isoform x1	13,92	44147	gi 359475506 ref XP_002271289.2	0,070
glucose-6-phosphate isomerase chloroplastic-like	13,89	67916	gi 225459126 ref XP_002285696.1	0,070
succinate-semialdehyde mitochondrial-like	13,84	56645	gi 225462297 ref XP_002265514.1	0,070
glucose-6-phosphate 1-epimerase	13,82	35660	gi 225446010 ref XP_002268176.1	0,070
heat shock 70 kda protein	13,78	71858	gi 225445820 ref XP_002277050.1	0,070
dirigent protein 22	13,77	16254	gi 297746427 emb CBI16483.3	0,069
triosephosphate cytosolic	13,76	23487	gi 225434935 ref XP_002283671.1	0,069
citrate mitochondrial	13,73	52788	gi 225450299 ref XP_002271451.1	0,069
aspartate cytoplasmic	13,71	46295	gi 225430011 ref XP_002284136.1	0,069
14-3-3-like protein d isoform x2	13,70	28978	gi 225461654 ref XP_002285427.1	0,069
gdp-mannose -epimerase 2	13,66	42943	gi 526118243 ref NP_001267968.1	0,069
probable pectinesterase pectinesterase inhibitor 51	13,51	77338	gi 731387827 ref XP_010649388.1	0,068
cysteine synthase	13,50	34541	gi 225451235 ref XP_002275990.1	0,068
heat shock protein 83	13,45	81153	gi 225464589 ref XP_002274022.1	0,068
atpase plasma membrane-type-like	13,45	104003	gi 147853720 emb CAN80223.1	0,068
e3 ubiquitin-protein ligase rnf25	13,43	48390	gi 225463772 ref XP_002268460.1	0,068
probable 6-phosphogluconolactonase chloroplastic	13,43	28034	gi 225455268 ref XP_002273657.1	0,068
adp-ribosylation factor	13,38	18255	gi 359488689 ref XP_002277054.2	0,068
endo- -beta-d-glucanase-like	13,29	25731	gi 225436942 ref XP_002275697.1	0,067
fam10 family protein at4g22670-like	13,27	41100	gi 147834848 emb CAN68309.1	0,067
pathogenesis-related protein pr-4-like	13,17	15684	gi 3511147 gb AAC33732.1	0,066
aspartic proteinase-like protein 1	13,12	31613	gi 731438460 ref XP_002269916.3	0,066
udp-glucose:flavonoid 3-o-glucosyltransferase	13,10	50030	gi 2564112 gb AAB81682.1	0,066
gamma aminobutyrate transaminase chloroplastic	13,09	57337	gi 225464809 ref XP_002268803.1	0,066
protein memo1	13,03	33004	gi 359475871 ref XP_002285449.2	0,066
ubiquitin-60s ribosomal protein l40	12,97	14958	gi 225455266 ref XP_002273568.1	0,065

alpha- -glucan-protein synthase	12,89	100605	gi 297734087 emb CBI15334.3	0,065
a g-specific adenine glycosylase	12,88	33437	gi 225428747 ref XP_002285040.1	0,065
phosphoenolpyruvate housekeeping isozyme	12,87	106843	gi 302142900 emb CBI20195.3	0,065
phosphoenolpyruvate carboxykinase	12,84	25674	gi 731437791 ref XP_003635667.2	0,065
leucine-rich repeat extensin-like protein 4	12,82	81666	gi 359484368 ref XP_002281292.2	0,065
adenosylhomocysteinase-like	12,76	53764	gi 225456806 ref XP_002278000.1	0,064
probable disease resistance protein at4g27220	12,69	222335	gi 297737422 emb CBI26623.3	0,064
endo- -beta-d-glucanase-like	12,69	25651	gi 147818169 emb CAN78076.1	0,064
nad-dependent malic enzyme 59 kda mitochondrial	12,57	66981	gi 225454087 ref XP_002266697.1	0,063
glycosyl hydrolase superfamily protein isoform 1	12,55	49023	gi 225458217 ref XP_002281804.1	0,063
tropinone reductase homolog at1g07440-like	12,55	28913	gi 225449408 ref XP_002282755.1	0,063
elongation factor 1-gamma-like	12,52	48375	gi 225465198 ref XP_002264400.1	0,063
probable glutathione s-transferase	12,50	25426	gi 359494423 ref XP_003634776.1	0,063
phosphoserine aminotransferase chloroplastic-like	12,50	42035	gi 731441229 ref XP_003635671.2	0,063
dna damage-inducible protein 1-like	12,45	45304	gi 225462066 ref XP_002276099.1	0,063
hypothetical protein VITISV_021989 Vitis vinifera	12,44	48221	gi 147802302 emb CAN70407.1	0,063
eukaryotic initiation factor 4a-8	12,43	47235	gi 225442221 ref XP_002277703.1	0,063
catalase isozyme 1	12,38	57266	gi 257675607 emb CBD25348.1	0,062
tubulin beta chain	12,36	50670	gi 225444111 ref XP_002267304.1	0,062
dihydropyrimidinase	12,32	58407	gi 359479124 ref XP_002273526.2	0,062
3-ketoacyl- thiolase peroxisomal	12,29	47823	gi 225433424 ref XP_002285653.1	0,062
isoform 1	12,21	106344	gi 296081719 emb CBI20724.3	0,062
protein disulfide isomerase-like 1-4	12,17	51395	gi 225435313 ref XP_002285136.1	0,061
PREDICTED alpha xylosidase isoform 1 Vitis vinifera	12,16	103833	gi 225423961 ref XP_002282429.1	0,061
unnamed protein product Vitis vinifera	12,16	76958		0,061
atp synthase cf1 alpha subunit	12,15	55501	gi 91701635 gb ABE47519.1	0,061
serine--trna ligase	11,93	51581	gi 225450981 ref XP_002284787.1	0,060
alpha- -glucan-protein synthase	11,88	30806	gi 225423424 ref XP_002263926.1	0,060
phosphoenolpyruvate housekeeping isozyme	11,85	108651	gi 302143423 emb CBI21984.3	0,060
aquaporin pip1-2	11,84	30941	gi 526118028 ref NP_001267921.1	0,060
protein notum homolog isoform x1	11,74	44696	gi 296085487 emb CBI29219.3	0,059
hypothetical protein VITISV_003033	11,65	103309	gi 147777258 emb CAN72153.1	0,059
Irr receptor-like serine threonine-protein kinase fei 2	11,64	84407	gi 147826449 emb CAN66563.1	0,059
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase c2 isoform 2	11,60	12829	gi 122893270 gb ABM67588.1	0,059
class iv chitinase	11,53	28955	gi 225434072 ref XP_002275534.1	0,058
stem-specific protein tsjt1	11,45	25425	gi 225432548 ref XP_002280658.1	0,058
ru large subunit-binding protein subunit chloro- plastic	11,39	64893	gi 225435794 ref XP_002285746.1	0,057
calmodulin-7	11,28	16905	gi 526117998 ref NP_001268169.1	0,057
uridine diphosphate glucose dehydrogenase	11,24	53450	gi 225457281 ref XP_002284402.1	0,057
formate--tetrahydrofolate ligase	11,23	68550	gi 225435632 ref XP_002285654.1	0,057
actin	11,19	41812	gi 225434968 ref XP_002283939.1	0,056
proteasome subunit alpha type-5	11,14	26149	gi 225441985 ref XP_002265563.1	0,056
peroxiredoxin- mitochondrial	11,08	21939	gi 342160854 gb AEL16463.1	0,056
chalcone synthase	11,01	42996	gi 225462777 ref XP_002264019.1	0,056
glutathione s-transferase-like	10,98	23789	gi 118406886 gb ABK81651.1	0,055

actin-depolymerizing factor 2	10,93	16188	gi 225449597 ref XP_002284040.1	0,055
subtilisin-like protease	10,87	78153	gi 731394643 ref XP_010651909.1	0,055
calreticulin	10,85	48339	gi 225437549 ref XP_002270354.1	0,055
heat shock 70 kda protein 15-like	10,71	87091	gi 297743290 emb CBI36157.3	0,054
atp-citrate synthase alpha chain protein 2	10,71	46999	gi 225450474 ref XP_002280514.1	0,054
methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	10,71	58574	gi 225429271 ref XP_002266390.1	0,054
probable pectate lyase 8	10,68	46173	gi 147845570 emb CAN78491.1	0,054
unnamed protein product Vitis vinifera	10,67	78320		0,054
xyloglucan endotransglycosylase hydrolase	10,67	24964	gi 731408354 ref XP_002274154.2	0,054
heat shock cognate 70 kda protein 2	10,65	71376	gi 225449553 ref XP_002279097.1	0,054
thaumatin-like protein	10,61	27153	gi 731379582 ref XP_002282917.2	0,054
obg-like atpase 1	10,60	13594	gi 147766666 emb CAN63158.1	0,053
ureidoglycolate hydrolase	10,59	47907	gi 225432949 ref XP_002284376.1	0,053
malate chloroplastic-like	10,57	44092	gi 225452831 ref XP_002283619.1	0,053
probable nucleoredoxin 1	10,55	56030	gi 297739052 emb CBI28541.3	0,053
pathogenesis-related protein 10	10,45	17490	gi 526118187 ref NP_001267956.1	0,053
probable nad h dehydrogenase fqr1-like 1	10,42	21717	gi 359496232 ref XP_003635185.1	0,053
fasciclin-like arabinogalactan protein 2	10,35	43923	gi 225447531 ref XP_002267946.1	0,052
lysosomal beta glucosidase-like	10,32	68693	gi 225436114 ref XP_002278363.1	0,052
superoxide dismutase	10,28	21710	gi 147789545 emb CAN59834.1	0,052
cell division cycle protein 48 homolog	10,26	90049	gi 147782460 emb CAN61919.1	0,052
ubiquitin-conjugating enzyme e2 variant 1d	10,26	15877	gi 359481634 ref XP_003632650.1	0,052
alpha- glucan-protein synthase	10,26	41018	gi 225451806 ref XP_002281356.1	0,052
heat shock protein 70	10,25	71741	gi 225434994 ref XP_002284063.1	0,052
hexokinase- chloroplastic	10,21	45059	gi 526117689 ref NP_001267834.1	0,052
serine carboxypeptidase-like	10,17	57399	gi 225448920 ref XP_002266451.1	0,051
villin-3-like isoform x1	10,15	76046	gi 147822656 emb CAN70540.1	0,051
atp-dependent 6-phosphofructokinase 3-like	10,15	53934	gi 225429400 ref XP_002275308.1	0,051
ubiquitin-conjugating enzyme e2-17 kda	10,14	16652	gi 225462033 ref XP_002274335.1	0,051
kda class ii heat shock protein	10,13	16025	gi 147792986 emb CAN68694.1	0,051
flavanone 3-hydroxylase	10,06	41767	gi 147776872 emb CAN70236.1	0,051
PREDICTED triosephosphate isomerase chloroplastic Vitis vinifera	10,05	35018	gi 395760140 gb AFN70721.1	0,051
cinnamoyl- reductase 1-like	9,93	35548	gi 225435395 ref XP_002285368.1	0,050
glycine-rich rna-binding protein mitochondrial-like	9,81	16895	gi 297733872 emb CBI15119.3	0,049
desiccation-related protein pcc13-62-like	9,77	92990	gi 147797908 emb CAN69464.1	0,049
PREDICTED ATP citrate synthase alpha chain protein 2 isoform 1 Vitis vinifera	9,75	46889	gi 225450474 ref XP_002280514.1	0,049
gdp-mannose dehydratase 1	9,74	41857	gi 147803491 emb CAN64284.1	0,049
xyloglucan endotransglycosylase	9,73	33523	gi 147771556 emb CAN78176.1	0,049
polyphenol oxidase	9,66	67447	gi 147811887 emb CAN61652.1	0,049
5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	9,63	85128	gi 147799950 emb CAN70498.1	0,049
probable plastid-lipid-associated protein chloroplastic	9,62	31582	gi 225433191 ref XP_002285326.1	0,049
peptidyl-prolyl cis-trans isomerase fkbp15-1	9,58	15827	gi 225469328 ref XP_002271056.1	0,048
isoflavone reductase-like protein	9,58	33977	gi 526118138 ref NP_001267947.1	0,048

proteasome subunit alpha type-3	9,55	27476	gi 225440238 ref XP_002283849.1	0,048
aldehyde dehydrogenase family 2 member mitochondrial-like	9,46	58457	gi 225452510 ref XP_002274863.1	0,048
probably inactive leucine-rich repeat receptor-like protein kinase at2g25790	9,45	88076	gi 297734821 emb CBI17055.3	0,048
pathogenesis-related protein 10	9,42	17266	gi 225431854 ref XP_002274706.1	0,048
adp-ribosylation factor 2	9,41	18252	gi 225425567 ref XP_002265983.1	0,047
glycine-rich rna-binding protein mitochondrial-like	9,38	15725	gi 225433489 ref XP_002264895.1	0,047
long chain acyl- synthetase 4	9,37	73928	gi 147810382 emb CAN67631.1	0,047
14-3-3-like partial	9,37	28853	gi 225459292 ref XP_002285787.1	0,047
heat shock protein 83	9,34	81137	gi 225426164 ref XP_002278894.1	0,047
mitochondrial	9,31	44762	gi 225444472 ref XP_002272701.1	0,047
ras-related protein rabb1c	9,25	23396	gi 225447452 ref XP_002263290.1	0,047
alpha-galactosidase-like	9,23	47364	gi 225448651 ref XP_002279730.1	0,047
beta-galactosidase 10	9,19	96020	gi 359480881 ref XP_003632537.1	0,046
alpha tubulin 1	9,19	43497	gi 296082889 emb CBI22190.3	0,046
peroxidase 12-like	9,08	39697	gi 359493149 ref XP_003634522.1	0,046
PREDICTED: uncharacterized protein LOC100265752	9,05	16863	gi 225444549 ref XP_002275796.1	0,046
elicitor-responsive protein 3-like	9,05	16310	gi 225426785 ref XP_002282926.1	0,046
enolase chloroplastic	9,05	50900	gi 225455784 ref XP_002274334.1	0,046
non-functional nadph-dependent codeinone reductase 2-like	9,04	34608	gi 297737567 emb CBI26768.3	0,046
enoyl-	8,95	41636	gi 225441423 ref XP_002279058.1	0,045
serine threonine-protein phosphatase 2a 65 kda regulatory subunit a beta isoform-like	8,92	66075	gi 225455902 ref XP_002276180.1	0,045
3-oxoacyl-	8,89	43559	gi 359483854 ref XP_002272874.2	0,045
nuclear transport factor 2-like	8,83	13709	gi 225425388 ref XP_002276841.1	0,045
pr-10 type pathogenesis-related protein	8,80	17472	gi 359477157 ref XP_002273790.2	0,044
serine carboxypeptidase-like 45	8,80	50918	gi 297741662 emb CBI32794.3	0,044
transcription factor btf3 homolog 4-like isoform x2	8,77	17174	gi 225457458 ref XP_002265041.1	0,044
udp-d-apiose udp-d-xylose synthase 2	8,77	44029	gi 225436371 ref XP_002270884.1	0,044
eukaryotic translation initiation factor 5a-2	8,66	17642	gi 359491680 ref XP_003634303.1	0,044
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase chloroplastic	8,63	43410	gi 147858738 emb CAN78872.1	0,044
---NA---	8,60	18416	gi 7406665 emb CAB85626.1	0,043
stromal 70 kda heat shock-related chloroplastic	8,58	54140	gi 297734242 emb CBI15489.3	0,043
gdp-mannose -epimerase 2	8,55	29205	gi 225432858 ref XP_002283898.1	0,043
heat shock cognate 70 kda protein 2	8,53	18216	gi 297740392 emb CBI30574.3	0,043
unnamed protein product Vitis vinifera	8,53	32761		0,043
monodehydroascorbate chloroplastic isoform x2	8,50	98718	gi 147834040 emb CAN64338.1	0,043
pyruvate cytosolic isozyme-like	8,47	40430	gi 147839415 emb CAN74454.1	0,043
pectinesterase pectinesterase inhibitor ppe8b	8,43	57704	gi 297739446 emb CBI29628.3	0,043
nucleic acid- ob-fold-like protein	8,41	15349	gi 225425511 ref XP_002266305.1	0,042
peptide methionine sulfoxide reductase	8,40	20985	gi 225456818 ref XP_002278258.1	0,042
26s proteasome non-atpase regulatory subunit 11 homolog	8,40	47271	gi 225451257 ref XP_002276988.1	0,042
flavanone 3-hydroxylase	8,28	25710	gi 297735015 emb CBI17377.3	0,042
hypothetical protein VITISV_020042	8,26	197497	gi 147816082 emb CAN70642.1	0,042

fatty acid hydroperoxide lyase	8,24	60893	gi 297739186 emb CBI28837.3	0,042
ras-related protein rabe1c	8,21	24069	gi 225449603 ref XP_002284071.1	0,041
proteasome subunit alpha type-2-b	8,18	5293	gi 297736713 emb CBI25749.3	0,041
nadp-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	8,16	53859	gi 225445885 ref XP_002279374.1	0,041
laccase-14-like	8,14	64540	gi 225460502 ref XP_002275352.1	0,041
gtp-binding protein yptm2	7,91	22883	gi 225454983 ref XP_002281150.1	0,040
eukaryotic initiation factor 4a-8	7,85	46902	gi 147834872 emb CAN70196.1	0,040
udp-d-apiose udp-d-xylose synthase 2	7,84	43859	gi 225465764 ref XP_002266630.1	0,040
atp-dependent 6-phosphofructokinase 2	7,83	51741	gi 359497303 ref XP_003635479.1	0,040
probable aquaporin pip2-5	7,82	30489	gi 111379078 gb ABH09326.1	0,039
phosphoenolpyruvate housekeeping isozyme	7,80	110893	gi 225446609 ref XP_002280569.1	0,039
endoplasmic homolog	7,79	93391	gi 225457939 ref XP_002273785.1	0,039
thylakoid lumenal 29 kda chloroplastic	7,77	37773	gi 302141995 emb CBI19198.3	0,039
serine--trna ligase	7,76	53640	gi 147801318 emb CAN77028.1	0,039
aconitate cytoplasmic	7,73	108115	gi 225447278 ref XP_002279260.1	0,039
lysm domain-containing gpi-anchored protein 1-like	7,72	43873	gi 302141828 emb CBI19031.3	0,039
probable bifunctional methylthioribulose-1-phosphate dehydratase enolase-phosphatase e1 1	7,72	56608	gi 225461486 ref XP_002285049.1	0,039
phosphoenolpyruvate carboxylase family protein isoform 2	7,70	48928	gi 225433752 ref XP_002267641.1	0,039
arginine biosynthesis bifunctional protein chloroplastic-like	7,69	49330	gi 359481336 ref XP_002274213.2	0,039
nadp-dependent d-sorbitol-6-phosphate dehydrogenase-like	7,68	35132	gi 225427786 ref XP_002269232.1	0,039
non-specific lipid-transfer protein a-like	7,67	12401	gi 225446753 ref XP_002282792.1	0,039
probable nad h dehydrogenase fqr1-like 1	7,66	21603	gi 297735891 emb CBI18660.3	0,039
ribulose biphosphate carboxylase small chloroplastic-like	7,64	21553	gi 225455934 ref XP_002276967.1	0,039
haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein 3	7,64	28648	gi 225423597 ref XP_002273939.1	0,039
lactoylglutathione lyase	7,61	33243	gi 359483362 ref XP_002273346.2	0,038
tumor-related protein	7,53	22798	gi 225462630 ref XP_002266430.1	0,038
stromal 70 kda heat shock-related chloroplastic-like	7,51	69240	gi 147805297 emb CAN78265.1	0,038
probable glutamyl chloroplastic isoform x2	7,48	102342	gi 297743980 emb CBI36950.3	0,038
polygalacturonase-inhibiting protein	7,46	37602	gi 21667647 gb AAM74142.1 AF499451_1	0,038
phenylalanine ammonia-lyase	7,43	78593	gi 147801854 emb CAN74850.1	0,037
nad-dependent malic enzyme 62 kda mitochondrial-like	7,40	69684	gi 225453250 ref XP_002265765.1	0,037
phenylalanine ammonia-lyase	7,39	37828	gi 225435357 ref XP_002285277.1	0,037
probable sarcosine oxidase	7,38	28987	gi 296083791 emb CBI24008.3	0,037
aldehyde dehydrogenase 12a1 isoform 1	7,37	47687	gi 147842465 emb CAN63138.1	0,037
ras-related protein rabe1c	7,37	24101	gi 225435058 ref XP_002284365.1	0,037
ru large subunit-binding protein subunit alpha	7,35	61313	gi 147819511 emb CAN69818.1	0,037
heat shock 70 kda mitochondrial-like	7,35	72941	gi 225429228 ref XP_002263457.1	0,037
glutamate dehydrogenase 1	7,35	44866	gi 526117970 ref NP_001267906.1	0,037
isocitrate dehydrogenase	7,32	45142	gi 147857569 emb CAN83081.1	0,037
nadp-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	7,30	53660	gi 147766064 emb CAN63539.1	0,037
chlorophyll a-b binding chloroplastic	7,25	28061	gi 359483839 ref XP_003633024.1	0,037

tubulin beta-1 chain	7,24	50881	gi 225457963 ref XP_002275306.1	0,037
ll-diaminopimelate chloroplastic	7,23	43585	gi 359475515 ref XP_002269153.2	0,036
vacuolar-processing enzyme	7,18	54484	gi 731384907 ref XP_002276759.2	0,036
21 kda	7,10	22174	gi 225426925 ref XP_002264891.1	0,036
pyruvate cytosolic isozyme-like	7,06	56586	gi 225449659 ref XP_002263319.1	0,036
betaine aldehyde dehydrogenase	6,99	55533	gi 225457152 ref XP_002283690.1	0,035
glutathione s-transferase f9-like	6,98	25026	gi 225446791 ref XP_002283209.1	0,035
probable plastid-lipid-associated protein chloroplastic	6,98	25877	gi 225441447 ref XP_002279430.1	0,035
monosaccharide-sensing protein 2-like	6,97	80026	gi 526117846 ref NP_001267873.1	0,035
PREDICTED acyl acyl carrier protein desaturase chloroplastic Vitis vinifera	6,95	45483	gi 359478198 ref XP_002274708.2	0,035
unnamed protein product Vitis vinifera	6,93	35959		0,035
uncharacterized oxidoreductase at4g09670-like	6,93	39474	gi 225468829 ref XP_002265072.1	0,035
uridine nucleosidase 1	6,91	37130	gi 359482324 ref XP_002283153.2	0,035
tom1-like protein 2	6,88	44006	gi 225454781 ref XP_002275091.1	0,035
nadp-dependent malic enzyme	6,83	70357	gi 526117469 ref NP_001268030.1	0,034
catalase	6,81	18234	gi 296085746 emb CBI29557.3	0,034
membrane partial	6,78	31436	gi 147820317 emb CAN78088.1	0,034
neutral ceramidase-like	6,78	89910	gi 731391993 ref XP_010650954.1	0,034
subtilisin-like protease	6,78	62515	gi 296087351 emb CBI33725.3	0,034
malate chloroplastic-like	6,77	43889	gi 225457407 ref XP_002284909.1	0,034
atpase plasma membrane-type-like	6,72	105374	gi 731401620 ref XP_010654358.1	0,034
coatomer subunit delta-like	6,71	56038	gi 731371455 ref XP_010648953.1	0,034
basic 7s globulin 2-like	6,66	47562	gi 147857949 emb CAN80378.1	0,034
villin-3-like isoform x1	6,64	104968	gi 297739645 emb CBI29827.3	0,033
l-ascorbate oxidase homolog	6,59	60236	gi 225447041 ref XP_002269614.1	0,033
glutathione s-transferase l3-like	6,50	27013	gi 225439785 ref XP_002276301.1	0,033
eukaryotic initiation factor 4a-8	6,42	47101	gi 225429488 ref XP_002278119.1	0,032
l-galactose dehydrogenase	6,40	35045	gi 526118116 ref NP_001267942.1	0,032
serpin-zx-like	6,39	42128	gi 147810055 emb CAN78278.1	0,032
elongation factor 1-gamma-like	6,38	17954	gi 297739507 emb CBI29689.3	0,032
protein p21	6,36	27902	gi 147797244 emb CAN71616.1	0,032
flavanone 3-hydroxylase	6,33	40757	gi 225457971 ref XP_002275563.1	0,032
peptidyl-prolyl cis-trans isomerase chloroplastic	6,24	49525	gi 225452484 ref XP_002278807.1	0,031
unnamed protein product Vitis vinifera	6,24	65890		0,031
unnamed protein product Vitis vinifera	6,17	26032		0,031
cysteine synthase-like	6,14	32474	gi 225434133 ref XP_002277485.1	0,031
aldehyde dehydrogenase family 2 member mitochondrial-like	6,12	52568	gi 359720700 gb AEV54527.1	0,031
udp-glycosyltransferase 73c2	6,09	75356	gi 147769846 emb CAN63388.1	0,031
lactoylglutathione lyase isoform x1	6,08	21105	gi 359479353 ref XP_003632261.1	0,031
unnamed protein product Vitis vinifera	6,06	62956	gi 296083156 emb CBI22792.3	0,031
probable cinnamyl alcohol dehydrogenase 1	6,02	33410	gi 296088832 emb CBI38290.3	0,030
heat shock cognate protein 80	6,02	66059	gi 297736695 emb CBI25731.3	0,030
triosephosphate cytosolic	6,02	27146	gi 147772560 emb CAN67342.1	0,030
chalcone synthase	6,00	41030	gi 296082254 emb CBI21259.3	0,030

ubiquitin-nedd8-like protein rub2	5,99	17196	gi 225465030 ref XP_002265864.1	0,030
probable beta-d-xylosidase 7	5,99	85891	gi 225459350 ref XP_002285805.1	0,030
hypothetical protein VITISV_021853	5,99	243852	gi 147853472 emb CAN82293.1	0,030
ferredoxin--nadp root chloroplastic	5,97	42685	gi 359483949 ref XP_002263658.2	0,030
nudix hydrolase 3	5,87	87125	gi 298204759 emb CBI25257.3	0,030
succinyl- ligase	5,86	35169	gi 225457502 ref XP_002268479.1	0,030
glyoxysomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein mfp-a	5,83	79207	gi 225431755 ref XP_002270067.1	0,029
xyloglucan endotransglucosylase hydrolase protein 27	5,83	23715	gi 225453754 ref XP_002273975.1	0,029
ru large subunit-binding protein subunit alpha	5,79	58403	gi 297734943 emb CBI17177.3	0,029
glycine--trna ligase mitochondrial-like	5,77	67753	gi 296085531 emb CBI29263.3	0,029
malate glyoxysomal	5,76	38042	gi 731438766 ref XP_002263670.3	0,029
atp-dependent 6-phosphofructokinase 3-like	5,74	54455	gi 225445037 ref XP_002283274.1	0,029
fk506 binding-like protein	5,73	15288	gi 147828014 emb CAN70794.1	0,029
peptidyl-prolyl cis-trans isomerase fkbp62-like	5,72	64326	gi 359497288 ref XP_002263566.2	0,029
ras-related protein rabd2c	5,67	22273	gi 731437701 ref XP_010647493.1	0,029
chloroplastic	5,64	57596	gi 296089197 emb CBI38900.3	0,028
udp-glucosyl transferase 85a2	5,60	54339	gi 731440446 ref XP_010646820.1	0,028
glutathione s-transferase gst	5,54	24503	gi 731393362 ref XP_002281694.2	0,028
glutamate decarboxylase	5,53	52464	gi 297737555 emb CBI26756.3	0,028
endo- -beta-d-glucanase-like	5,52	26324	gi 225436938 ref XP_002275501.1	0,028
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	5,50	36672	gi 225452188 ref XP_002265988.1	0,028
expansin-a1-like	5,48	26729	gi 147843387 emb CAN79985.1	0,028
eukaryotic translation initiation factor 5a	5,47	17696	gi 225468027 ref XP_002273265.1	0,028
enoyl-	5,42	41807	gi 225435604 ref XP_002285625.1	0,027
fasciclin-like arabinogalactan protein 1	5,41	43097	gi 225461924 ref XP_002267825.1	0,027
lipid transfer protein	5,40	12576	gi 225439677 ref XP_002270970.1	0,027
anthocyanidin synthase	5,40	27004	gi 1730109 sp P51093.1 LDOX_VITVI	0,027
probable lactoylglutathione chloroplast	5,38	39575	gi 359484559 ref XP_003633121.1	0,027
thaumatin-like protein	5,33	11946	gi 297742586 emb CBI34735.3	0,027
nad -linked oxidoreductase superfamily protein	5,32	38245	gi 225451312 ref XP_002278643.1	0,027
glucan endo- -beta-glucosidase 8-like	5,29	52741	gi 225441645 ref XP_002277003.1	0,027
purple acid phosphatase 2 isoform x1	5,26	53350	gi 225458131 ref XP_002280873.1	0,027
flavonol synthase	5,23	35932	gi 147784457 emb CAN72728.1	0,026
hypothetical protein VITISV_032371 Vitis vinifera	5,21	209153	gi 147768068 emb CAN78324.1	0,026
alpha- -glucan-protein synthase	5,18	39192	gi 225456339 ref XP_002283867.1	0,026
heat shock 70 kda mitochondrial-like	5,14	66219	gi 296088081 emb CBI35440.3	0,026
phosphatidylinositol 3- root isoform	5,12	182831	gi 147826521 emb CAN72914.1	0,026
hypothetical protein VITISV_004488	5,10	40673	gi 147791264 emb CAN76839.1	0,026
lysosomal beta glucosidase-like	5,10	69206	gi 731398320 ref XP_002266470.2	0,026
chlorophyll a-b binding chloroplastic	5,08	28011	gi 147857734 emb CAN78667.1	0,026
glutelin type-a 3-like	5,08	38668	gi 225447981 ref XP_002269304.1	0,026
heat shock 70 kda mitochondrial-like	5,06	73499	gi 359496771 ref XP_002272173.2	0,026
chalcone synthase	5,04	43318	gi 18376655 dbj BAB84112.1	0,025
probable acetyltransferase nata1-like	5,03	25100	gi 225449010 ref XP_002272073.1	0,025

sedoheptulose- - chloroplastic	5,02	42925	gi 225466690 ref XP_002263049.1	0,025
probable carboxylesterase 15	4,98	35359	gi 147799210 emb CAN74724.1	0,025
kda class ii heat shock protein	4,97	15049	gi 296081689 emb CBI20694.3	0,025
small ubiquitin-related modifier 1-like	4,94	11402	gi 225447135 ref XP_002274949.1	0,025
hypothetical protein VITISV 015982 Vitis vinifera	4,89	54943	gi 147820675 emb CAN74293.1	0,025
polygalacturonase-inhibiting protein	4,89	37499	gi 526117756 ref NP_001268106.1	0,025
mitochondrial phosphate carrier protein mitochondrial	4,85	30504	gi 225456463 ref XP_002284474.1	0,024
calnexin homolog	4,84	60906	gi 225425320 ref XP_002273708.1	0,024
nad -linked oxidoreductase superfamily protein	4,84	93698	gi 147853311 emb CAN78540.1	0,024
coatomer subunit epsilon-1-like	4,79	28124	gi 225444159 ref XP_002270662.1	0,024
protein trichome birefringence-like 38	4,77	42171	gi 147767568 emb CAN60202.1	0,024
6-phosphogluconate decarboxylating 3	4,71	14967	gi 297738240 emb CBI27441.3	0,024
probable aquaporin pip2-8	4,70	21049	gi 526118191 ref NP_001267957.1	0,024
nad -binding rossmann-fold superfamily protein isoform 1	4,70	39473	gi 147781891 emb CAN69940.1	0,024
glutathione cytosolic	4,68	33888	gi 147821323 emb CAN74593.1	0,024
l-ascorbate oxidase homolog	4,68	60966	gi 225444480 ref XP_002272880.1	0,024
probable receptor-like protein kinase at1g80640	4,66	38701	gi 297743405 emb CBI36272.3	0,024
perakine reductase-like	4,61	38796	gi 225432798 ref XP_002283471.1	0,023
probable glycerophosphoryl diester phosphodiesterase 3	4,57	45486	gi 225457190 ref XP_002283945.1	0,023
sucrose synthase 2	4,53	92898	gi 225431790 ref XP_002271530.1	0,023
14-3-3-like partial	4,50	28853	gi 302141962 emb CBI19165.3	0,023
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase chloroplastic	4,49	47641	gi 225457606 ref XP_002273754.1	0,023
ras-related protein rabe1c	4,48	24073	gi 225439876 ref XP_002278842.1	0,023
glucose-6-phosphate isomerase chloroplastic-like	4,43	52719	gi 302142039 emb CBI19242.3	0,022
PREDICTED: uncharacterized protein LOC100255131	4,43	40757	gi 225450009 ref XP_002274472.1	0,022
alpha-galactosidase 2	4,40	45294	gi 225463809 ref XP_002268711.1	0,022
adenine phosphoribosyl transferase 1 isoform 1	4,36	19872	gi 225458816 ref XP_002285252.1	0,022
heat shock 70 kda mitochondrial	4,36	61513	gi 296084626 emb CBI25714.3	0,022
heat shock protein 83	4,33	36897	gi 297742232 emb CBI34381.3	0,022
tom1-like protein 2	4,25	24959	gi 302142836 emb CBI20131.3	0,021
oxysterol-binding protein 3c	4,24	52189	gi 225434911 ref XP_002283434.1	0,021
unnamed protein product Vitis vinifera	4,20	10254		0,021
reticuline oxidase-like protein	4,16	59741	gi 225444139 ref XP_002268606.1	0,021
reticuline oxidase-like protein	4,16	59550	gi 147846526 emb CAN81650.1	0,021
probable nucleoredoxin 1 isoform x1	4,11	62127	gi 297739047 emb CBI28536.3	0,021
neutral ceramidase-like	4,09	34279	gi 147823355 emb CAN64196.1	0,021
o-fucosyltransferase family protein	4,06	82807	gi 731428467 ref XP_010664349.1	0,020
pectinesterase-like	4,05	16307	gi 297737662 emb CBI26863.3	0,020
stromal 70 kda heat shock-related chloroplastic	4,04	75749	gi 225456004 ref XP_002279101.1	0,020
probable xaa-pro aminopeptidase p	4,02	35278	gi 147766118 emb CAN67971.1	0,020
plasmodesmata callose-binding protein 3	4,02	12461	gi 297738081 emb CBI27282.3	0,020
14-3-3-like protein gf14 kappa	4,01	13680	gi 225469784 ref XP_002274546.1	0,020
7-deoxyloganic acid glucosyltransferase-like	3,99	54208	gi 225449284 ref XP_002276823.1	0,020

14-3-3-like protein gf14 iota	3,98	28905	gi 297738076 emb CBI27277.3	0,020
protein disulfide isomerase-like 1-4	3,90	63826	gi 147855039 emb CAN82379.1	0,020
probable importin-7 homolog	3,88	119769	gi 225433707 ref XP_002268048.1	0,020
heat shock	3,88	46928	gi 296086250 emb CBI31691.3	0,020
tom1-like protein 2	3,79	44351	gi 225461774 ref XP_002285602.1	0,019
ras-related protein rabc1	3,74	22385	gi 147809843 emb CAN76031.1	0,019
probable pectinesterase pectinesterase inhibitor 51	3,74	63307	gi 225431521 ref XP_002275218.1	0,019
perakine reductase-like	3,72	38796	gi 297737113 emb CBI26314.3	0,019
hypothetical protein VITISV_005422	3,63	127120	gi 147834730 emb CAN70552.1	0,018
probable inactive shikimate kinase like chloroplastic	3,62	40615	gi 297742063 emb CBI33850.3	0,018
glutathione s-transferase-like	3,62	23854	gi 225437284 ref XP_002262604.1	0,018
udp-glucose 6-dehydrogenase 1-like	3,60	37078	gi 297733903 emb CBI15150.3	0,018
subtilisin-like protease	3,56	61614	gi 147791956 emb CAN75240.1	0,018
nadp-dependent malic enzyme	3,45	70328	gi 1561774 gb AAB08874.1	0,017
s-adenosyl-l-homocysteine hydrolase	3,45	26763	gi 298205241 emb CBI17300.3	0,017
patellin-3-like	3,37	45757	gi 359480790 ref XP_002271899.2	0,017
tubulin beta-1 chain	3,35	51040	gi 731401234 ref XP_010654216.1	0,017
phenylalanine ammonia-lyase	3,34	78231	gi 731412519 ref XP_010658395.1	0,017
ubiquitin-activating enzyme e1 1-like	3,33	120215	gi 297735630 emb CBI18124.3	0,017
hypothetical protein VITISV_035041	3,27	184299	gi 147832980 emb CAN68404.1	0,016
pyruvate cytosolic isozyme	3,26	53706	gi 297742713 emb CBI35347.3	0,016
ru large subunit-binding protein subunit chloro-plastic	3,22	65296	gi 225442531 ref XP_002284134.1	0,016
pith domain-containing protein at3g04780	3,20	19647	gi 225451301 ref XP_002278320.1	0,016
lysosomal alpha-mannosidase-like	3,19	106047	gi 147771032 emb CAN60239.1	0,016
subtilisin-like protease	3,17	82139	gi 297743923 emb CBI36893.3	0,016
probable alpha-galactosidase b-like	3,16	72932	gi 225424633 ref XP_002282325.1	0,016
soluble inorganic pyrophosphatase	3,14	24813	gi 225439878 ref XP_002278867.1	0,016
probable nucleoredoxin 1 isoform x1	3,14	92698	gi 731373205 ref XP_010651408.1	0,016
scopoletin glucosyltransferase-like	3,05	55682	gi 359474650 ref XP_003631503.1	0,015
monocopper oxidase-like protein sks1	2,99	105419	gi 731423236 ref XP_010662409.1	0,015
probable nucleoredoxin 1	2,96	64753	gi 147792238 emb CAN59927.1	0,015
lysosomal alpha-mannosidase-like	2,94	114040	gi 731418442 ref XP_010660681.1	0,015
udp-glucuronic acid decarboxylase 6	2,93	39157	gi 225435012 ref XP_002284153.1	0,015
pyruvate decarboxylase isozyme 2-like	2,87	63374	gi 297745869 emb CBI15925.3	0,014
pathogenesis-related protein	2,79	17337	gi 147816812 emb CAN75490.1	0,014
small ubiquitin-related modifier 1-like	2,75	10463	gi 225469335 ref XP_002271938.1	0,014
gdsl esterase lipase at4g01130-like	2,68	42299	gi 225454430 ref XP_002276525.1	0,014
hypothetical protein VITISV_041719	2,68	115461	gi 147811286 emb CAN61231.1	0,013
lysosomal beta glucosidase-like	2,67	58171	gi 225465605 ref XP_002266675.1	0,013
beta- partial	2,63	24999	gi 147810561 emb CAN76383.1	0,013
sterol methyltransferase 1 isoform 1	2,63	78253	gi 147858936 emb CAN80832.1	0,013
glutamate decarboxylase 4-like	2,54	57701	gi 225424526 ref XP_002285268.1	0,013
cysteine proteinase cot44-like	2,53	26646	gi 225438807 ref XP_002283263.1	0,013
14 kda proline-rich	2,52	12031	gi 297741175 emb CBI31906.3	0,013
pathogenesis-related protein 5-like	2,40	26138	gi 147812057 emb CAN70296.1	0,012

5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	2,40	10674	gi 296085316 emb CBI29048.3	0,012
protein p21-like	2,37	24777	gi 147798872 emb CAN74833.1	0,012
luminal-binding protein 5-like	2,35	64193	gi 296089684 emb CBI39503.3	0,012
alcohol dehydrogenase i	2,33	41826	gi 526117649 ref NP_001268079.1	0,012
fasciclin-like arabinogalactan protein 7	2,24	26994	gi 225446999 ref XP_002266893.1	0,011
ll-diaminopimelate chloroplastic	2,17	50682	gi 225429094 ref XP_002272305.1	0,011
kda class ii heat shock protein	2,06	17397	gi 147772890 emb CAN73663.1	0,010
kda class ii heat shock protein	2,06	13350	gi 296081681 emb CBI20686.3	0,010
unnamed protein product Vitis vinifera	1,96	66007		0,010
alpha-galactosidase-like	1,84	45815	gi 225463807 ref XP_002270791.1	0,009
sucrose synthase	1,78	92957	gi 225444613 ref XP_002275155.1	0,009
serpin-zx-like	1,75	48378	gi 731429314 ref XP_010664611.1	0,009
alpha-galactosidase 2	1,75	43126	gi 147810310 emb CAN66885.1	0,009
latex plastidic aldolase-like family protein	1,68	43233	gi 225427768 ref XP_002267726.1	0,008
hypothetical protein VITISV_042503	1,68	177153	gi 147828336 emb CAN68759.1	0,008
aldehyde dehydrogenase family 7 member b4	1,67	53517	gi 147777897 emb CAN71381.1	0,008
alpha tubulin 1	1,66	33491	gi 731439963 ref XP_003635553.2	0,008
pyruvate cytosolic isozyme	1,60	56009	gi 225463801 ref XP_002270400.1	0,008
e3 ubiquitin-protein ligase rnf25	1,59	45656	gi 147832395 emb CAN77784.1	0,008
polyphenol oxidase	1,41	12490	gi 55270672 gb AAV48831.1	0,007
protein p21	1,03	25149	gi 225426805 ref XP_002283064.1	0,005
luminal-binding protein 5-like	0,97	73425	gi 386685665 gb AFJ20202.1	0,005
heat shock protein isoform 2	0,88	90171	gi 731410134 ref XP_002270014.3	0,004
nadp-dependent malic enzyme isoform x2	0,45	48704	gi 297742021 emb CBI33808.3	0,002
hypothetical protein VITISV_017938	0,38	83884	gi 147800281 emb CAN73113.1	0,002
unnamed protein product Vitis vinifera		41656	gi 302142899 emb CBI20194.3	

9 Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden bzw. werden in den angegebenen Publikationen veröffentlicht:

Riebel M., Sabel A, Claus H., Fronk P., Xia N., Li H., König H., Decker H. (2015): Influence of Laccase and Tyrosinase on the Antioxidant Capacity of Selected Phenolic Compounds on Human Cell Lines. *Molecules* 20: 17194-17207

Riebel M., Sabel A, Claus H., Fronk P., Xia N., Li H., König H., Decker H.: Antioxidant Capacity of Wine on Human Cell Lines with a focus on Phenolic Wine Components as well as their Tyrosinase and Laccase Oxidation Products. Eingereicht bei Journal of Agricultural and Food Chemistry

Riebel M., Fronk P., Tenzer S., Decker H.: In depth proteomic analysis of German *Dornfelder* Grape Berries using data-independent acquisition reveals high complexity and dynamic range of grape proteome. Eingereicht bei PLOS ONE

Riebel M., Fronk P., Tenzer S., Decker H.: Qualitative Analysis of Proteomic Composition of *Riesling* Grape Berries reveals changes in Pathogenesis Related (PR) Proteins during Ripening

10 Danksagung

11 Lebenslauf

12 Erklärung

Ich versichere hiermit, die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt zu haben.

Copyright

Die Inhalte dieses Werkes sind urheberrechtliches Eigentum des Instituts für Molekulare Biophysik im Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

Mainz, März 2016