

Glucosyltransferasen in der Bildung von Hydroxyzimtsäure-Estern in *Arabidopsis thaliana*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Dirk Meißner

geb. am: 30.08.1976 in Reutlingen

Gutachter:

1. Prof. Dr. Scheel
2. Prof. Dr. Kraus
3. Prof. Dr. Hartmann

Datum der Verteidigung: 16.06.2008

urn:nbn:de:gbv:3-000014826

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000014826>]

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1.	Der pflanzliche Sekundärstoffwechsel.....	1
1.2.	Die Biosynthese von Phenylpropanen in Pflanzen.....	2
1.3.	Die Bedeutung der Hydroxyzimtsäuren für Pflanzen.....	7
1.4.	Regulation des Hydroxyzimtsäurestoffwechsels.....	11
1.5.	Die Enzymfamilie der Glycosyltransferasen in Arabidopsis.....	12
1.6.	Ziel der Arbeit.....	15
2.	Material und Methoden.....	16
2.1.	Material	16
2.1.1.	Pflanzen	16
2.1.2.	Mikroorganismen	17
2.1.3.	Vektoren	17
2.1.4.	Oligonukleotide	19
2.1.5.	Chemikalien und Enzyme.....	19
2.1.6.	Geräte.....	19
2.2.	Kultivierung, Transformation und Selektion der Organismen.....	20
2.2.1.	Anzucht, Transformation und Selektion von <i>Arabidopsis thaliana</i>	20
2.2.2.	Kultivierung, Transformation und Selektion von <i>E. coli</i>	21
2.2.3.	Kultivierung, Transformation und Selektion von <i>A. tumefaciens</i>	21
2.3.	DNA-Analytik	22
2.3.1.	Isolierung pflanzlicher genomischer DNA.....	22
2.3.2.	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i> und <i>A. tumefaciens</i>	22
2.3.3.	Polymerasenkettenreaktion (PCR)	22
2.3.4.	Agarosegelelektrophorese	23
2.3.5.	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	24
2.3.6.	Aufreinigung von DNA	24
2.3.7.	Restriktionsanalyse	24
2.3.8.	Ligation.....	24
2.3.9.	DNA-Dephosphorylierung	25
2.3.10.	DNA-Sequenzierung	25

2.3.11.	Genotypisierung der T-DNA- und Transposon-Insertionslinien.....	26
2.4.	Klonierungsstrategien	29
2.4.1.	RNAi-Pflanzen	29
2.4.2.	Überexpressionslinien	34
2.4.3.	Promotor-GUS-Konstrukte.....	34
2.5.	RNA-Analytik	35
2.5.1.	RNA-Isolierung aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	35
2.5.2.	cDNA-Synthese und semiquantitative RT-PCR	36
2.5.3.	Real-Time quantitative PCR.....	36
2.6.	Protein-Analytik	37
2.6.1.	Protein-Isolierung aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	37
2.6.2.	Bestimmung der Proteinkonzentration	37
2.6.3.	Enzymaktivitätstests der UGT 84A1-4.....	37
2.7.	Quantifizierung der pflanzlichen Metabolite.....	38
2.7.1.	Sinapatester.....	38
2.7.2.	Flavonoide	39
2.7.3.	Zellwand-gebundene HCAs	39
2.8.	LC-MS-Analyse der Samen	40
2.9.	Histochemischer Nachweis der β-Glucuronidase-Aktivität.....	41
2.10.	UV-B-Stress-Applikation von <i>Arabidopsis thaliana</i> und <i>Brassica napus</i>.....	41
2.11.	Datenbankanalysen	44
2.12.	Statistische Auswertung.....	44
3.	Ergebnisse.....	45
3.1.	Die Glucosyltransferasen UGT 84A1-A4 im HCA-Stoffwechsel	45
3.1.1.	Analyse der Genexpression	45
3.1.2.	Enzymaktivitäten der vier Ester-bildenden Glucosyltransferasen in der Entwicklung von <i>Arabidopsis thaliana</i>	47
3.1.3.	Die löslichen HCA-Metabolite.....	49
3.1.4.	Die Zellwand-gebundenen Metabolite	50
3.1.5.	Die Promotoraktivitäten von UGT 84A1-4	51
3.2.	RNAi-Suppression von <i>UGT 84A1-4</i>.....	53
3.2.1.	Suppression der <i>UGT 84A2</i> in Rosettenblättern.....	53
3.2.2.	Suppression der <i>UGT 84A2</i> in Samen	55

3.2.3.	Differentielle Suppression von <i>UGT 84A1</i> , <i>A2</i> , <i>A3</i> und <i>A4</i>	57
3.2.4.	Arabidopsis als Testorganismus für Raps-RNAi-Konstrukte	59
3.3.	Suppression der <i>UGT 84A1-4</i> Gene in verschiedenen Insertionslinien	62
3.3.1.	Transposon-Insertionslinie <i>UGT 84A2 KO</i>	62
3.3.2.	T-DNA-Insertionslinien in den <i>UGT 84A1-4</i> -Genen	67
3.4.	Überexpression der vier <i>UGT 84A1-4</i>-Gene.....	70
3.4.1.	Genexpression in den Arabidopsis-Transformanden	70
3.4.2.	UGT-Aktivitätstests der Überexpressionslinien.....	70
3.4.3.	Die löslichen HCA-Metabolite	72
3.4.4.	Die Zellwand-gebundenen HCAs.....	74
3.5.	LC-MS-Analysen von Samen mit modulierter UGT-Aktivität.....	75
3.6.	Regulation des Sinapin-Stoffwechsels im Samen.....	78
3.7.	Der Einfluss von UV-Strahlung auf den HCA-Stoffwechsel	80
3.7.1.	Die Expression von Genen des HCA-Stoffwechsels unter UV-B-Strahlung.....	80
3.7.2.	Der Einfluss von UV-B-Strahlung auf die UGT-Aktivität.....	83
3.7.3.	Analyse der Metaboliten unter UV-B-Strahlung.....	84
3.7.4.	Untersuchung der Linie <i>UGT 84A2 KO</i> unter UV-B-Stress	85
3.7.5.	Sinapatester und Flavonoide als UV-Schutzpigmente im Vergleich	87
3.7.6.	Der Einfluss von UV-B-Strahlung auf <i>Brassica napus</i>	89
4.	Diskussion	92
4.1.	Die Bedeutung der <i>UGT 84A1-4</i> im Wildtyp.....	92
4.2.	Modulation der Genexpression von <i>UGT 84A1-4</i>	96
4.2.1.	Insertions- und Überexpressionslinien	96
4.2.2.	Suppression der <i>UGT 84A1-4</i> Gene durch RNA-Interferenz.....	100
4.3.	Der Einfluss von UV-B-Strahlung auf den HCA-Stoffwechsel	102
4.4.	Regulation der <i>UGT 84A1-4</i> im Samen.....	105
5.	Zusammenfassung	107
6.	Literaturverzeichnis	109
7.	Anhang.....	117

Abbildungsverzeichnis:

1.1: Stellung des Sekundärstoffwechsels im Gesamtstoffwechsel der Pflanze	2
1.2: Biosynthese der Hydroxyzimtsäuren und Lignin	4
1.3: Biosynthese der Sinapatester in Brassicaceen	7
1.4: Konsensussequenz der PSPG-Box	13
2.1: Genotypisierung der Gabi-Linien mit Hilfe der PCR	27
2.2: Genotypisierung der Salk-Linie mit Hilfe der PCR	28
2.3: Sequenzvergleich der Glucosyltransferasen UGT 84A1-4	29
2.4: RNAi-Kassette im Vektor pBlueSfiBA	30
2.5: RNAi-Kassette des binären Vektors pLH7000	30
2.6: Sequenzvergleich der vier UGTs	31
2.7: RNAi-Kassette des binären Vektors pLH7000	31
2.8: RNAi-Kassette des binären Vektors pLH7000	32
2.9: Sequenzvergleiche zwischen Raps und Arabidopsis	33
2.10: Klonierung der Überexpressionskonstrukte	34
2.11: Promotor-GUS-Konstrukte	34
2.12: Schematischer Aufbau des Sonnensimulators	42
2.13: Die biologisch effektive UV-B-Strahlung	44
3.1: Transkriptanalyse der <i>UGT 84A1-4</i> in <i>Arabidopsis thaliana</i> (Col.)	46
3.2: RT qPCR aus verschiedenen Geweben von Arabidopsis	46
3.3: UGT-Aktivität der Proteinrohextrakte	48
3.4: HPLC-Analysen der löslichen Metaboliten von Arabidopsis (Col.)	49
3.5: Gehalt an Hydroxyzimtsäuren in Zellwänden	51
3.6: Analyse der Promotoraktivität	52
3.7: HPLC-Analysen (Sinapoylmalat) der RNAi-Pflanzen <i>35S:UGT 84A2i (256)</i>	54
3.8: HPLC-Analysen (Sinapoylglucose) der RNAi-Pflanzen <i>35S:UGT 84A2i (256)</i>	55
3.9: HPLC-Analysen (Sinapin) der RNAi-Pflanzen <i>35S:UGT 84A2i (256)</i>	56
3.10: HPLC-Analysen (Sinapoylglucose) der RNAi-Pflanzen <i>35S:UGT 84A2i (256)</i>	56
3.11: HPLC-Analysen (Samen) der RNAi-Pflanzen (<i>35S:UGT 84A1i-A4i</i>)	57
3.12: HPLC-Analysen (Keimlinge) der RNAi-Pflanzen (<i>35S:UGT 84A1i-A4i</i>)	58
3.13: HPLC-Analysen der RNAi-Pflanzen <i>Nap:UGT 84A2i:SCTi</i>	59
3.14: HPLC-Chromatogramm der Linie 24	60
3.15: HPLC-Analysen der Samen von den RNAi-Pflanzen <i>Nap:PALi</i>	60
3.16: RT-PCR der <i>UGT 84A2</i> -Expression in Samen	62
3.17: HCA-GT-Aktivität von Rosettenblättern der Linie <i>UGT 84A2 KO</i>	63
3.18: HPLC-Analyse von Arabidopsis-Samen der Linie <i>UGT 84A2 KO</i>	64
3.19: RT-PCR der <i>UGT 84A1, A3 und A4</i> Expression in Samen	64

3.20: HPLC-Analyse von Arabidopsis-Blättern der Linie <i>UGT 84A2 KO</i>	65
3.21: HPLC-Analyse von Arabidopsis-Keimlingen der Linie <i>UGT 84A2 KO</i>	65
3.22: Position der T-DNA-Insertionen	67
3.23: RT-PCR der <i>UGT 84A1-4</i> in KO-Linien	68
3.24: HPLC-Analysen der Zellwände in der Linie <i>UGT 84A3 KO</i>	69
3.25: HPLC-Chromatogramm der Wurzel der Linie <i>UGT 84A4 KO</i>	69
3.26: RT-PCR der Überexpressionslinien	70
3.27: HCA-GT-Aktivität der Überexpressionslinien	71
3.28: HPLC-Analysen der Überexpressionslinien	72
3.29: HPLC-Analyse der Zellwände der Überexpressionslinien	74
3.30: LC-MS-Analyse der Linie <i>UGT 84A2 KO</i>	76
3.31: HPLC-Analyse von Samen (WS, Col., <i>fus3-T</i> und <i>fus3-3</i>)	78
3.32: Semiquantitative RT-PCR von Arabidopsis-Samen	79
3.33: Genexpressionsanalyse mit Hilfe der Datenbank Genevestigator	80
3.34: Semiquantitative RT-PCR von cDNA aus Rosettenblättern (10h UV)	81
3.35: Semiquantitative RT-PCR von cDNA aus Rosettenblättern (6d UV)	82
3.36: UGT-Aktivität von <i>Arabidopsis thaliana</i> (Col.) Rosettenblättern (UV)	83
3.37: HPLC-Analysen der Metaboliten von WT Rosettenblättern (UV)	84
3.38: UGT-Aktivitätstest von Rosettenblättern der <i>UGT 84A2 KO</i> (UV)	85
3.39: HPLC-Analyse der Metaboliten von Rosettenblättern (<i>UGT 84A2 KO</i>)	86
3.40: HPLC-Analyse von Rosettenblätter unter UV-B Stress	87
3.41: Semiquantitative RT-PCR (Col. und Ler) nach 10h und 33h UV	88
3.42: <i>Brassica napus</i> (WT) nach 6 d UV-B Bestrahlung	89
3.43 und 3.44: HPLC-Analysen von Raps Keimlingen	90/91

Tabellenverzeichnis

1.1: Akzeptorspezifitäten der rekombinanten Arabidopsis-UGTs	14
2.1: T-DNA- und Transposon-Insertionslinien	16
2.2: Arabidopsis-Mutanten	17
2.3: Überblick über die von den Vektoren vermittelten Antibiotikaresistenzen	18
2.4: PCR-Ansätze	22
2.5: Programm zur Durchführung der PCR	23
2.6: PCRs zur Genotypisierung der Gabi-Insertionslinien	26
2.7: Reaktionsansatz und Reaktionsschritte der RT-qPCR	36
2.8: Gradient der HPLC für die Analyse der UGT-Aktivität	38
2.9: Gradient zur Quantifizierung der in Methanol löslichen Metabolite	38
2.10: Gradient der HPLC bei der Zellwand-Analyse	39
2.11: Erntezeitpunkte von <i>Arabidopsis thaliana</i> und <i>Brassica napus</i>	43
2.12: Strahlungswerte für die Versuche V693, V695 und V701	43
3.1: Sinapoylglucose- und Sinapin-Gehalt in Samen	58
3.2: Reduktion in % der einzelnen RNAi-Linien in Samen	61
3.3: Reduktion in % der einzelnen RNAi-Linien in Rosettenblättern	61
3.4: Anzahl der Signale der LC-MS-Analyse von Arabidopsis-Samen	75
3.5: Metaboliten im Samen der Linie <i>UGT 84A2 KO</i> (reduziert)	77
3.6: Metaboliten im Samen der Linie <i>UGT 84A2 KO</i> (vermehrt)	77
7.1: Verwendete Oligonukleotide	117

Abkürzungsverzeichnis

AP	alkalische Phosphatase
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Bn	<i>Brassica napus</i>
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
Col	Columbia
kDa	Kilodalton
d	Tage
dd	doppelt destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F5H	Ferulat-5-Hydroxylase
<i>FAD2</i>	<i>fatty acid ω-6-desaturase</i>
<i>fah1</i>	<i>ferulic acid-5-hydroxylase</i>
FUS3	Fusca (griech.: bräunlich)
g	Gramm
h	Stunde
HCA	Hydroxycimtsäuren (<u>H</u> ydroxy <u>c</u> innamic <u>A</u> cids)
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
Kat	Katal (Enzymmenge, die 1 Mol Substrat pro Sekunde umsetzt)
kb	Kilobasenpaare
kJ	Kilojoule
KO-Linie	Knock-Out-Linie
LC-MS	Liquid Chromatography Mass Spectrometry
Ler	Landsberg erecta
LB	Luria-Bertani Medium
M	molar
μ g	Mikrogramm
mg	Milligramm
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
mM	millimolar
μ M	mikromolar
min	Minute
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MW	Molekulargewicht

No-0	Nossen
OD600	Optische Dichte bei 600 nm
ORF	offenes Leseraster (open reading frame)
PCR	Polymerasekettenreaktion
pmol	Pikomol
PSPG	Plant Secondary Product Glycosyltransferases
RT-qPCR	Real-Time-quantitative-Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription mit anschließender Polymerasekettenreaktion
SCT	1- <i>O</i> -Sinapoyl- β -D-glucose:Cholin- <i>O</i> -Sinapoyltransferase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SMT	1- <i>O</i> -Sinapoyl- β -D-glucose:L-Malat- <i>O</i> -Sinapoyltransferase
<i>sng1</i>	<i>Sinapoylglucose Accumulator</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Trisgepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
<i>tt4</i>	<i>transparent testa</i>
T1-Generation	erste Samengeneration nach Transformationsereignis
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UGT	UDP-Glucosyltransferase
UTR	untranslatierte Region
ÜE	Überexpressionslinie
v/v bzw. w/v	Volumen pro Volumen bzw. Gewicht pro Volumen
Vol	Volumeneinheiten
x g	Einheit der Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indol- β -D-galactopyranosid

Nomenklatur der in der Arbeit untersuchten Glucosyltransferasen UGT 84A1-4:

Die Benennung der Glucosyltransferasen erfolgte durch Dr. P. I. Mackenzie, Flinders University School of Medicine, Australien, gemäss der Nomenklatur für die UGT-Superfamilie (Mackenzie et al., 1997).

Die Abkürzung UGT bezeichnet die Superfamilie UDP-Glycosyltransferase, die Zahl 84 bezeichnet pflanzliche Glycosyltransferasen dieser Familie mit einer Sequenzidentität $\geq 40\%$, der Buchstabe A verweist auf Glycosyltransferasen mit einer Sequenzidentität $\geq 60\%$ und die folgenden Nummern 1 bis 4 bezeichnen jeweils das individuelle Gen.

Nomenklatur für die UGT-Superfamilie	AGI-TIGR Name (TAIR Datenbank)
--------------------------------------	--------------------------------

UGT 84A1	At4g15480
UGT 84A2	At3g21560
UGT 84A3	At4g15490
UGT 84A4	At4g15500

[At=*Arabidopsis thaliana*, 3 bzw. 4=Nummer des Chromosoms; g=gene; fünfstellige Zahl=Nummer des Gens auf dem Chromosom]

1. Einleitung

1.1. Der pflanzliche Sekundärstoffwechsel

Der pflanzliche Stoffwechsel lässt sich in den Primär- und den Sekundärstoffwechsel einteilen. Der Primärstoffwechsel oder Grundstoffwechsel umfasst jene Biosynthesewege, die für das Überleben einer Zelle unabkömmlich sind. Für den pflanzlichen Sekundärstoffwechsel gab der Pflanzenphysiologe Julius Sachs 1873 in seinem Lehrbuch folgende Definition: „Als Nebenprodukte des Stoffwechsels kann man solche Stoffe bezeichnen, welche während des Stoffwechsels entstehen, aber keine weitere Verwendung für den Aufbau neuer Zellen finden. [...] Irgend eine Bedeutung dieser Stoffe für die innere Ökonomie der Pflanze ist bis jetzt nicht bekannt“ (Sachs, 1873). Diese Aussage gilt auch heute noch (Hartmann, 1996). Diese „Nebenprodukte“ wurden sogar bis in die zweite Hälfte des zwanzigsten Jahrhunderts als Abfallprodukte des pflanzlichen Stoffwechsels angesehen. Erst nach und nach wurde die ökologische Bedeutung von sekundären Inhaltsstoffen erkannt.

Der Sekundärstoffwechsel kann als funktionelle Ebene des pflanzlichen Stoffwechsels angesehen werden, die für das Wachstum und die Entwicklung der Pflanze abkömmlich, aber für das Überleben der Art im evolutiven Sinne unabdingbar ist (Hartmann, 1996). Die Produkte des Sekundärstoffwechsels werden meistens in speziellen Zellen produziert und als sekundäre Pflanzenstoffe oder Pflanzeninhaltsstoffe bezeichnet. Aufgrund der sessilen Lebensweise der Pflanzen ist hier der Sekundärstoffwechsel besonders stark ausgeprägt. Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe übernehmen wichtige ökologische Funktionen, wie u. a. bei der Abwehr von Pathogenen, Schutz vor abiotischem Stress (z.B. UV-Strahlung) oder bei der Bildung von Symbiosen (siehe Abbildung 1.1).

Mehr als 200.000 Strukturen von sekundären Pflanzenstoffen sind bereits bekannt (Hartmann und Ober, 2002). Diese stammen aus chemisch sehr unterschiedlichen Stoffklassen, wie zum Beispiel Phenylpropane, Terpene, Alkaloide, Polyketide und Glucosinolate. Häufig treten diese Pflanzeninhaltsstoffe nur in bestimmten Pflanzentaxa auf und sind dadurch von chemotaxonomischer Bedeutung. Trotz der Diversität der sekundären Pflanzenstoffe leiten sich diese von wenigen Biosynthesewegen des Primärstoffwechsels ab (z.B. Shikimat-Weg). Die Vielzahl von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen entsteht durch Modifikationen auf zwei Ebenen. Zunächst werden Produkte des Primärstoffwechsels oxidiert, zyklisiert und ligiert. Auf einer zweiten Ebene werden diese Stoffe glycosyliert, acyliert, prenyliert oder methyliert.

Modifikationen von Substanzen durch Glycosylierungen sind im Sekundärstoffwechsel weit verbreitet. Sie spielen in zahlreichen Prozessen eine wichtige Rolle, wie z.B. in der Detoxifikation von Xenobiotika, der Regulation der Hormonhomöostase und der Speicherung von sekundären Pflanzenstoffen (Gachon et al., 2005), da die Übertragung eines Kohlenhydrat-Rests die Wasserlöslichkeit und die chemische Stabilität (Jones und Vogt, 2001) von Verbindungen erhöhen kann.

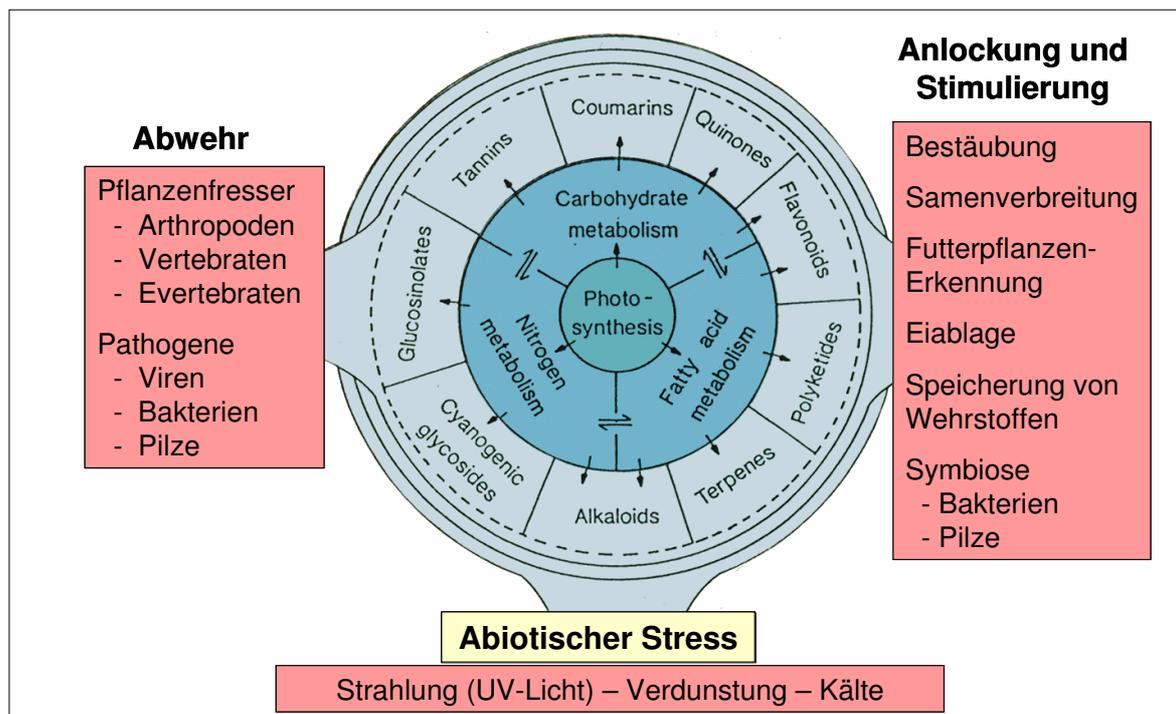


Abbildung 1.1: Schematische Übersicht zur Stellung des Sekundärstoffwechsels im Gesamtstoffwechsel der Pflanze. Die beiden inneren Kreise symbolisieren den Primärstoffwechsel. Aus ihm leiten sich die diversen Substanzklassen des Sekundärstoffwechsels ab (äußerer Kreis), die in ihrer Gesamtheit die chemischen Wechselwirkungen der Pflanze mit ihrer Umwelt repräsentieren (Reznik, 1960; Hartmann, 1996).

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Enzyme katalysieren die Veresterung von Hydroxyzimtsäuren (HCAs) mit Glucose. HCAs sind Phenylpropane, für die ein C₆-C₃ Grundgerüst (aromatischer Ring mit C₃-Seitenkette) charakteristisch ist und die im Pflanzenreich weit verbreitet sind (Heimann et al., 1971).

1.2. Die Biosynthese von Phenylpropanen in Pflanzen

Die Biosynthese von Phenylpropanen wird schon seit langem intensiv erforscht. Die meisten Enzyme dieses Stoffwechselweges sind bekannt und von vielen konnten die codierenden Gene identifiziert werden. In der Forschung stehen gegenwärtig die Aufklärung der regulatorischen Prinzipien und die Bedeutung der Naturstoffe für die Pflanze im Mittelpunkt (Wink, 1999).

Der einfachste Vertreter der HCAs ist *trans*-Zimtsäure (3-Phenylpropensäure). Diese entsteht durch nicht oxidative Desaminierung der aromatischen Aminosäure L-Phenylalanin, die im Shikimat-Weg gebildet wird. Die Desaminierung wird durch das Enzym PAL (Phenylalanin-Ammoniaklyase) katalysiert. Dieses Enzym wurde in einigen Pilzen und in allen untersuchten Höheren Pflanzen gefunden. In einigen Pflanzen konnte nur ein *PAL*-Gen identifiziert werden (z.B. in einigen Gymnospermen), während für Angiospermen das Vorkommen von mehreren Isoenzymen charakteristisch ist (Wink, 1999). So wurden in *Arabidopsis thaliana* vier Isoenzyme der PAL identifiziert (Rohde et al., 2004). Die PAL verknüpft den Primär- mit dem Sekundärstoffwechsel und kann als Ausgangspunkt des generellen Phenylpropanstoffwechsels (Hahlbrock und Scheel, 1989) angesehen werden. In diesem wird aus L-Phenylalanin über *trans*-Zimtsäure und 4-Cumarsäure der Thioester 4-Cumaroyl-CoA gebildet, welches das Substrat für die spezifischen Zweige des Phenylpropanstoffwechsels ist. Im Folgenden soll ein Überblick über den Teil des Phenylpropanstoffwechsels gegeben werden, der für die Biosynthese von HCAs und Lignin wichtig ist (siehe Abbildung 1.2).

4-Cumarsäure entsteht durch Einführung einer Hydroxyl-Gruppe an die Position 4 der *trans*-Zimtsäure durch das Enzym Cinnamat-4-Hydroxylase (C4H). Die enzymatische Aktivität der C4H wurde zuerst in mikrosomalen Präparationen von *Pisum sativum*-Keimlingen detektiert (Russell und Conn, 1967; Russell, 1971). Die C4H ist ein Membran-gebundenes Cytochrom-P450-abhängiges Enzym (Wink, 1999). 4-Cumarsäure kann auch direkt aus der Aminosäure L-Tyrosin gebildet werden. Die von der Tyrosin-Ammoniaklyase (TAL) katalysierte Desaminierung von Tyrosin zu 4-Cumarsäure, wird vorwiegend bei Poaceen realisiert (Richter, 1998). Die TAL-Reaktion kann auch durch PAL-Enzyme mit geringer Substratspezifität katalysiert werden, wie z.B. in Mais (Rosler et al., 1997).

Die Aktivierung von 4-Cumarsäure wird durch das Enzym 4-Cumarat-CoA-Ligase (4CL) katalysiert. Das Enzym 4CL weist eine breite Substratspezifität auf und kann demnach auch andere HCAs zum entsprechenden CoA-Thioester umsetzen. In *Arabidopsis* sind vier Isoenzyme der 4CL bekannt, die alle etwas unterschiedliche Substratpräferenzen haben (Hamberger und Hahlbrock, 2004). 4-Cumaroyl-CoA ist der Ausgangspunkt für die Biosynthese von Flavonoiden und Lignin. So setzt die Chalkon-Synthase 4-Cumaroyl-CoA und Malonyl-CoA zum Naringenin-Chalkon um (Peer et al., 2001). Diese Reaktion ist der erste metabolische Schritt zu der sehr diversen Klasse der Flavonoide. Ein anderer Stoffwechselweg führt von 4-Cumaroyl-CoA über eine sehr komplexe Biosynthese zum Lignin, das sich in artspezifischen Mengenverhältnis aus Hydroxyphenyl-, Guaiacyl- und Syringyl-Einheiten zusammensetzt (Boerjan et al., 2003).

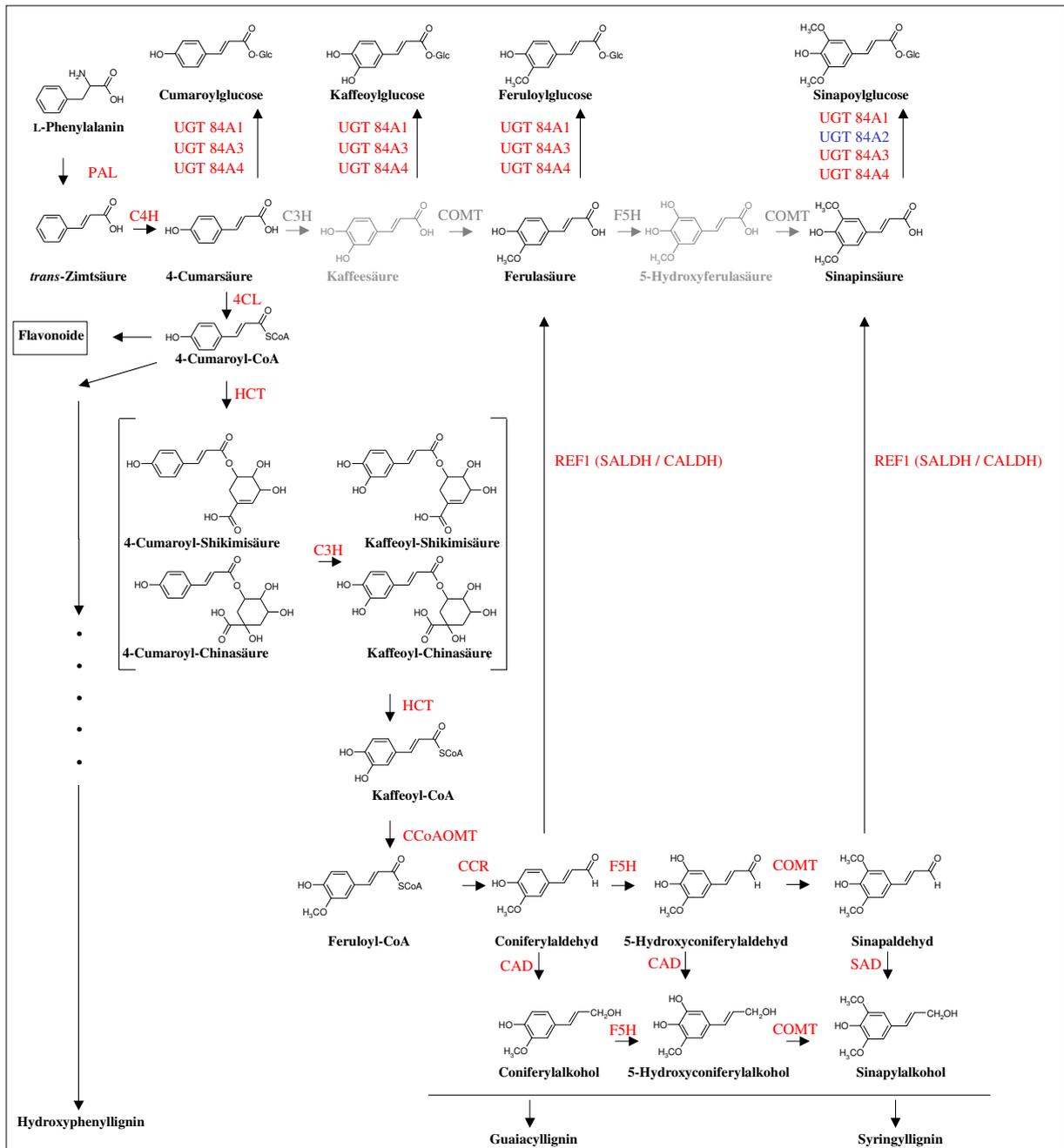


Abbildung 1.2: Biosynthese der Hydroxycimtsäuren und Lignin (modifiziert nach Humphreys und Chapple, 2002). Grau hinterlegte Strukturen und Enzyme geben potentielle Biosynthesewege zur Bildung der Hydroxycimtsäuren wieder, die bisher experimentell nicht bestätigt wurden. Die UGT 84A2 in blau ist als einziges Enzym der hier dargestellten UGTs substratspezifisch. Alle vier UGTs verwenden UDP-Glucose.

4CL 4-Cumarat-CoA-Ligase; **C3H** 4-Cumarat-3-Hydroxylase; **C4H** Cinnamat-4-Hydroxylase; **CAD** Cinnamyl-Alkohol-Dehydrogenase; **CALDH** Coniferaldehyd-Dehydrogenase; **CCoAOMT** Kaffeoyl-CoA-3-*O*-Methyltransferase; **CCR** Cinnamoyl-CoA-Reduktase; **COMT** Kaffeesäure/5-Hydroxyferulasäure-*O*-Methyltransferase; **F5H** Ferulat-5-Hydroxylase; **HCT** Hydroxycinnamoyltransferase; **PAL** Phenylalaninammoniak-Lyase; **REF** Reduced Epidermal Fluorescence **SAD** Sinapyl-Alkohol-Dehydrogenase; **SALDH** Sinapaldehyd-Dehydrogenase; **UGT** UDP-Glucosyltransferase.

Lignin ist zusammen mit Cellulose vor allem in verholzendem Gewebe zu finden. Nach Cellulose ist Lignin die häufigste organische Substanz in der Natur und macht 20-30% der Gewebe von Gefäßpflanzen aus (Buchanan et al., 2000). In den letzten Jahren wurde der Biosyntheseweg des Lignins weiter aufgeklärt (Humphreys und Chapple, 2002). Während früher angenommen wurde, dass Reaktionen wie Hydroxylierung und Methylierung am aromatischen Ring auf der Ebene der freien Hydroxyzimtsäuren ablaufen, ergeben neuere Untersuchungen ein anderes Bild (siehe Abbildung 1.2.). So wird die Hydroxylierung an Position 3 des aromatischen Rings von 4-Cumarsäure in Arabidopsis durch das Cytochrom-P450-abhängige Enzym 4-Cumarat-3-Hydroxylase (C3H) katalysiert (Schoch et al., 2001; Franke et al., 2002a; Franke et al., 2002b).

Das Enzym C3H setzt bevorzugt die Shikimisäure- und Chinasäure-Ester der 4-Cumarsäure als Substrate um. Freie Cumarsäure oder 4-Cumaroyl-CoA wird von der C3H dagegen mit geringerer Affinität akzeptiert (Schoch et al., 2001). Erstmals wurde die Hydroxylierung von 5-*O*-(4-Cumaroyl)-Chinasäure- und Shikimisäure zu den entsprechenden Kaffeoyl-Estern durch das Enzym C3H in Karotten- und Petersilien-Zellkulturen beschrieben (Heller und Kuhn, 1985). Die Substrate der C3H werden durch eine Acyltransferase bereitgestellt. Dieses Enzym, die Hydroxycinnamoyltransferase (HCT), benutzt 4-Cumaroyl-CoA als Acyl-Donor und Shikimisäure oder Chinasäure als Akzeptor (Hoffmann et al., 2003). Dadurch entstehen die Ester der Shikimsäure oder der Chinasäure. Die HCT katalysiert auch den Transfer des Kaffeoyl-Rests der Kaffeoyl-Chinasäure auf Coenzym-A, was zu Kaffeoyl-CoA führt (Hoffmann et al., 2003).

Kaffeoyl-CoA wird durch das S-Adenosyl-L-Methionin- (SAM-) abhängige Enzym CCoAOMT (Kaffeoyl-CoA-3-*O*-Methyltransferase) an der Hydroxylgruppe in der C3-Position methyliert, wobei Feruloyl-CoA entsteht (Do et al., 2007). Das Enzym CCR (Cinnamoyl-CoA-Reduktase) reduziert Feruloyl-CoA zu Coniferylaldehyd. Auf der Stufe der Hydroxycinnamaldehyde und Hydroxycinnamoylalkohole kommt es zu einer weiteren Hydroxylierung und *O*-Methylierung an der C5-Position des aromatischen Rings (Humphreys et al., 1999; Goujon et al., 2003). Dies führt schließlich zu den Vorläufern der Lignineinheiten Guaiacyllignin und Syringyllignin (Humphreys und Chapple, 2002). Die Hydroxylierung wird durch das Enzym Ferulate-5-Hydroxylase (F5H) katalysiert, das aus Mikrosomen von Höheren Pflanzen isoliert wurde (Grand, 1984). Dabei handelt es sich ebenfalls um ein Cytochrom-P450-abhängiges Enzym. Die *O*-Methylierung an der C5-Position wird durch das SAM-abhängige Enzym Kaffeesäure/5-Hydroxyferulasäure-*O*-Methyltransferase (COMT) katalysiert, wobei diskutiert wird, dass dieses Enzym auch an der *O*-Methylierung in C3-Position des aromatischen Rings beteiligt ist (Do et al., 2007).

Hydroxyzimtsäure-Ester fluoreszieren blau-grün unter UV-Strahlung. In Arabidopsis wurden verschiedene Mutanten mit veränderter Blattfluoreszenz entdeckt, die zur weiteren Aufklärung des HCA-Stoffwechsels beigetragen haben. Die Mutante *fah1* (*ferulic acid-5-hydroxylase 1*) besitzt keine funktionelle Ferulat-5-Hydroxylase (F5H) und synthetisiert dadurch keine Sinapatester mehr. Dadurch fluoresziert sie rot unter UV-Licht, da durch das Fehlen der Sinapatester die Chlorophyllfluoreszenz sichtbar wird (Ruegger und Chapple, 2001). Mit Hilfe der *fah1*-Mutante konnte das *FAH1*-Gen identifiziert und kloniert werden (Meyer et al., 1996). Die sogenannten *Ref*-Mutanten zeichnen sich durch eine reduzierte blau-grüne Fluoreszenz aus, und die Blätter dieser Mutanten erscheinen hellgrün-gelb unter UV-Strahlung, daher der Name „Reduced Epidermal Fluorescence“ (Ruegger und Chapple, 2001). Auch diese Mutanten haben einen verringerten Gehalt an Sinapatestern. Das gleiche gilt für die *brt1*-Mutante. Allerdings hat diese zusätzlich unter UV-Strahlung stark fluoreszierende Trichome, daher der Name „*bright trichomes*“ (Ruegger und Chapple, 2001). Dem *BRT1*-Gen konnte der Genort At3g21560, der für das Enzym UGT 84A2 codiert, zugeordnet werden (Sinlapadech et al., 2007). Zwei weitere Mutanten akkumulieren Sinapoylglucose und werden daher als Sinapoylglucose Akkumulatoren (*sng*) bezeichnet. Die *sng1*-Mutante (Lorenzen et al., 1996) produziert in Blättern kein Sinapoylmalat mehr und erscheint gegenüber dem Wildtyp ein wenig dunkler unter UV-Licht (Lehfeldt et al., 2000), während die *sng2*-Mutante kein Sinapoylcholin mehr in Samen produzieren kann (Shirley et al., 2001).

Mit diesen verschiedenen Mutanten konnten neue mögliche Biosynthesewege von Sinapinsäure und Ferulasäure beschrieben werden. Da die Hydroxylierung und *O*-Methylierung an Position 5 des aromatischen Rings der Hydroxyzimtsäuren auf Stufe der Hydroxycinnamaldehyde und Hydroxycinnamoylalkohole abläuft (Humphreys et al., 1999; Goujon et al., 2003), stellt sich die Frage, wie Ferulasäure und Sinapinsäure gebildet werden. Die Ferulat-5-Hydroxylase (F5H) und die Kaffeesäure/5-Hydroxyferulasäure-*O*-Methyltransferase (COMT) bevorzugen *in vitro* als Substrate Hydroxycinnamaldehyde und Hydroxycinnamoylalkohole gegenüber den freien Hydroxyzimtsäuren. Diese Ergebnisse warfen die Frage nach einer möglichen Biosynthese von Sinapinsäure durch die Oxidation von Sinapaldehyd auf (Humphreys et al., 1999; Nair et al., 2004). Diese Frage konnte mit Hilfe der *ref1*-Mutante beantwortet werden. *Ref1*-Mutanten haben reduzierte Mengen an Sinapatestern in Blättern und Samen, aber gleiche Mengen an Syringyllignin wie der Wildtyp (Ruegger und Chapple, 2001). Daraus lässt sich schließen, dass das *REF1*-Gen für die Produktion von Sinapinsäure benötigt wird, nicht aber für die Lignineinheiten. Es konnte gezeigt werden, dass das *REF1*-Gen für eine funktionelle Aldehyd-Dehydrogenase codiert (Nair et al., 2004). Dieses Enzym kann sowohl Sinapaldehyd, als auch Coniferaldehyd zu Sinapinsäure bzw. Ferulasäure oxidieren (siehe

Abbildung 1.2: SALDH / CALDH). Die Frage nach der Bildung von Kaffeesäure und 5-Hydroxyferulasäure bleibt allerdings in diesem Modell noch offen.

1.3. Die Bedeutung der Hydroxycimtsäuren für Pflanzen

Hydroxycimtsäuren sind im Pflanzenreich weit verbreitet (Heimann et al., 1971) und treten häufig in Abschlussgeweben der Pflanzen auf (z.B. Fruchtwand). Sie tragen zur Stabilität der Zellwände in diesen Geweben bei (Watzl und Rechkemmer, 2001). HCAs sind Inhaltsstoffe vieler Gemüsearten (Spinat, Kopfsalat), und so regelmäßiger Bestandteil unserer Nahrung. Freie Hydroxycimtsäuren sind jedoch im allgemeinen nicht in den Pflanzen zu detektieren. Sie liegen meistens als Ester oder Amide in Verbindung mit anderen Metaboliten vor. In Arabidopsis können HCAs durch die Glucosyltransferasen UGT 84A1, A2, A3 und A4 mit Glucose verestert werden, wobei das Enzym UGT 84A2 spezifisch für Sinapinsäure ist und somit die funktionelle UDP-Glucose:Sinapat-Glucosyltransferase (SGT) in Arabidopsis darstellt (Strack, 1980; Nurmamann und Strack, 1981; Milkowski et al., 2000b). Ob die Enzyme UGT 84A1, A3 und A4 ebenfalls eine Rolle bei der Veresterung von Sinapinsäure *in vivo* spielen, ist noch nicht bekannt. Die Abbildung 1.3 gibt einen Überblick über diesen Teil des Sinapinsäure-Stoffwechsels in der Samen- und Keimlingsentwicklung der Brassicaceen.

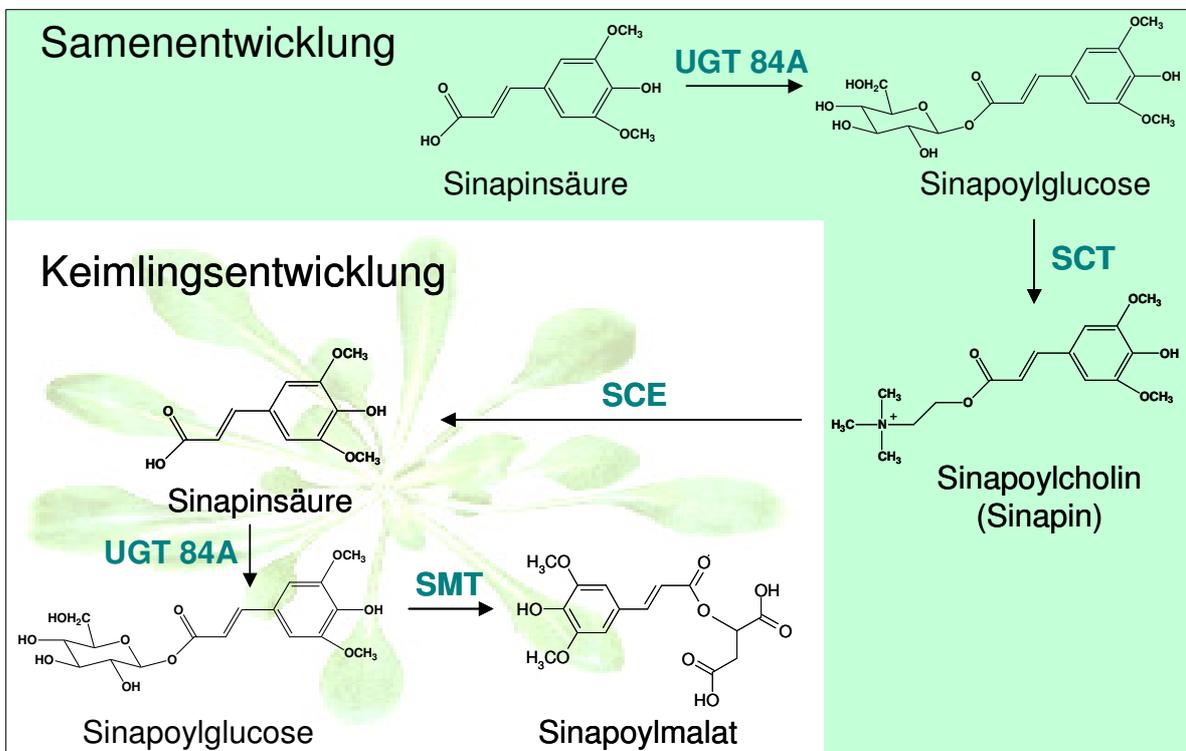


Abbildung 1.3: Biosynthese der Sinapatester in Brassicaceen (Milkowski et al., 2004). SCT=1-*O*-Sinapoyl- β -glucose:Cholin-Sinapoyltransferase (EC 2.3.1.91), SMT=1-*O*-Sinapoyl- β -glucose:L-Malat-Sinapoyltransferase (EC 2.3.1.92), SCE=Sinapinesterase (EC 3.1.1.49), UGT 84A=Subfamilie der Ester-bildenden Glucosyltransferasen 84A1-4, wobei nicht geklärt ist, welche UGTs *in vivo* neben der UGT 84A2 an dieser Reaktion beteiligt sind.

Durch spezifische Acyltransferasen kann das hohe Gruppenübertragungspotential energiereicher β -Acetalester wie 1-*O*-Sinapoyl- β -glucose (-35,7 kJ/Mol) für nachfolgende Umesterungsreaktionen genutzt werden (Mock und Strack, 1993). Während der Samenentwicklung katalysiert die 1-*O*-Sinapoyl- β -glucose:Cholin-Sinapoyltransferase (SCT) die Transacylierung von Sinapoylglucose zu Sinapoylcholin (Sinapin) (Strack et al., 1983; Regenbrecht und Strack, 1985; Shirley et al., 2001). Sinapin akkumuliert in reifenden Samen und wird während der Keimlingsentwicklung durch eine Sinapinesterase (SCE) gespalten (Nurmann und Strack, 1979; Strack, 1980). Die so entstandene Sinapinsäure wird erneut durch die UGT 84A2 zu Sinapoylglucose umgesetzt und diese durch eine weitere Acyltransferase, die 1-*O*-Sinapoyl- β -glucose:L-Malat-Sinapoyltransferase (SMT), zu Sinapoylmalat transacyliert (Tkotz und Strack, 1980; Strack, 1982; Chapple et al., 1992; Mock und Strack, 1992; Lehfeldt et al., 2000). Sinapoylmalat akkumuliert in den Vakuolen der Mesophyll- und Epidermiszellen der Blätter (Strack et al., 1985). Das Enzym SMT konnte ebenfalls in der Vakuole lokalisiert werden (Hause et al., 2002). Aufgrund seiner Absorptionseigenschaften dient Sinapoylmalat als Schutz gegenüber schädigender UV-Strahlung (Li et al., 1993; Landry et al., 1995; Sheahan, 1996; Booij-James et al., 2000).

Pflanzen sind als photosynthetisch aktive Organismen auf Sonnenstrahlung angewiesen. Für die Photosynthese nutzen sie Licht des Wellenlängenbereichs von 400-800 nm als Energiequelle, der auch PAR (Photosynthetic Active Radiation) bezeichnet wird. Da gegenwärtig durch die Abnahme der Ozonschicht immer mehr kurzwelligere Strahlung im UV-Bereich (280-315 nm; UV-B / 315-400 nm; UV-A) auf die Oberfläche der Erde gelangt, sind Pflanzen zunehmenden UV-Stress ausgesetzt. UV-Strahlung verursacht Schädigungen an der DNA (Stapleton, 1992; Bharti und Khurana, 1997), aber auch von physiologischen Prozessen. So ist die Photosynthese durch die Empfindlichkeit des Photosystems II (PSII) besonders gefährdet. Das Reaktionszentrum des PSII ist aus den D1- und D2- Proteinen zusammengesetzt, die extrem UV sensitiv sind und schon ab einer UV-B-Rate von $1 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ abgebaut werden (Booij-James et al., 2000). Dadurch verringert sich die Photosyntheserate und damit auch die CO₂-Fixierung.

Es gibt prinzipiell zwei Strategien der Pflanzen, sich vor schädigender Strahlung zu schützen: DNA-Reparatursysteme (Smith und Wang, 1989) sowie Absorption durch Pigmente, die als UV-Filter fungieren. So akkumulieren Pflanzen Flavonoide und Phenylpropane in den Vakuolen der epidermalen und subepidermalen Zellschichten, um das darunter liegende photosynthetisch aktive Gewebe vor schädigender Strahlung zu schützen (Li et al., 1993; Sheahan, 1996; Bharti und Khurana, 1997). Flavonoide zeigen in methanolischen Lösungen zwei Absorptionsmaxima: bei einer Wellenlänge von 240-285 nm (A-Ring), sowie zwischen 300-400 nm (B-Ring) (Markham und Mabry, 1975). Das

Absorptionsmaximum von HCAs liegt im Wellenlängenbereich von 300 bis 330 nm (Sheahan, 1996). Diese Absorptionseigenschaften sowie das Vorkommen in epidermalen Zellschichten (Hutzler et al., 1996), sprechen für eine Funktion dieser Sekundärmetabolite als Schutzpigmente gegen UV-Strahlung.

Mit Hilfe von Mutanten, bei denen Gene des Phenylpropanstoffwechsels defekt sind, konnte der Einfluss von UV-B-Strahlung auf die Pflanzen analysiert werden. Pflanzen reagieren sensibler gegenüber UV-B-Exposition, wenn Flavonoide fehlen (Li et al., 1993; Shirley et al., 1995). Die Mutanten *tt4* (*transparent testa*) und *tt5* sind zum Beispiel nicht mehr in der Lage Flavonoide zu synthetisieren, da die Chalkon-Synthase (*tt4*) bzw. Chalkon-Isomerase (*tt5*) mutiert sind. Ein reduzierter Gehalt an Hydroxyzimtsäure-Konjugaten führt dazu, dass die Pflanzen noch sensibler reagieren (z.B. *tt5*-Mutante). Fehlen den Pflanzen Konjugate der Sinapinsäure, wie z.B. Sinapoylmalat, und haben sie einen reduzierten Gehalt an Flavonoiden, sind sie am sensiblen gegenüber UV-B-Strahlung. Dies trifft auf die Mutante *fah1* zu (Chapple et al., 1992), die eine Mutation in der Ferulat-5-Hydroxylase (F5H) besitzt. Werden als Zeichen für UV-Stress die Oxidation von Proteinen und Lipiden, sowie die Aktivität des antioxidativen Enzyms Ascorbat-Peroxidase zu Grunde gelegt, kann folgende Sensitivität der Mutanten gegenüber UV-Exposition festgestellt werden: *fah1* > *tt5* > *tt4* (Landry et al., 1995). Sowohl Flavonoide, als auch Sinapatester sind demnach wichtig für den Schutz gegenüber UV-Strahlung. Ein weiterer Hinweis auf die UV-Schutz-Funktion der Flavonoide ist die UV-induzierte Genexpression der Chalkon-Synthase (*CHS*) (Bieza und Lois, 2001), des Eingangsenzyms für den Flavonoidstoffwechsel. Für die Gene des Sinapatester-Stoffwechsels sind unter UV-B-Stress allerdings noch keine Expressionsdaten vorhanden. Vor allem die Rolle der Ester-bildenden HCA-Glucosyltransferasen UGT 84A1-4 wurde noch nicht im Zusammenhang mit UV-B-Stress untersucht. Interessanterweise scheint es möglicherweise eine Regulation zwischen Flavonoid- und Hydroxyzimtsäurestoffwechsel zu geben, da ein Defekt im Flavonoidstoffwechsel (*tt5*) den Sinapoylmalat-Gehalt beeinflusst (Landry et al., 1995; Bharti und Khurana, 1997) und ein Defekt im Hydroxyzimtsäurestoffwechsel (*fah1*) den Flavonoid-Gehalt (Sheahan, 1996).

Über die Funktion und Bedeutung der anderen HCA-Glucose-Ester im Stoffwechsel von Arabidopsis, wie Cumaroylglucose, Kaffeoylglucose oder Feruloylglucose, ist nur sehr wenig bekannt. Im Zusammenhang mit Feruloylglucose und Cumaroylglucose wird ein Einbau der entsprechenden Hydroxyzimtsäuren über die Ester-Zwischenstufe in die Zellwand diskutiert (Strack et al., 1984; Bokern et al., 1991). Experimentelle Beweise dieser Hypothese fehlen allerdings bislang. Es konnte aber gezeigt werden, dass Hydroxyzimtsäuren Bestandteile pflanzlicher Zellwände sind (Fry, 1982; Hartley und Ford, 1989; Wallace und Fry, 1994; Mathew und Abraham, 2004) und durch alkalische

Hydrolyse aus diesen isoliert werden können (Tan et al., 2004). Deshalb soll im Folgenden die Bedeutung der Hydroxyzimtsäuren für die Zellwände beschrieben werden.

Die Zellwände der Pflanzen bestehen aus einer Matrix aus Polysacchariden und Fibrillen aus Cellulose. Außerdem sind verschiedene Proteine in die Zellwand eingelagert (Richter, 1998). Neben mechanischen Aufgaben (z.B. Schutz) hat die Zellwand auch wichtige physiologische Funktionen. Die Zellwände einzelner Zellen sind miteinander verbunden und bilden den sogenannten Apoplasten, über den Wasser mit darin gelösten Substanzen transportiert werden kann.

Hydroxyzimtsäuren sind in pflanzlichen Zellwänden von verschiedenen Monokotyledonen und einigen Dikotyledonen zu finden (Ishii, 1997). Sie sind vor allem über Esterbindungen sowohl in die Primär- als auch in die Sekundärwand integriert (Iiyama et al., 1994a). Der Mechanismus des Einbaus von Hydroxyzimtsäuren in die Zellwand ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Eine Möglichkeit wäre die Umesterung von CoA-Thioestern der Hydroxyzimtsäuren (Yamamoto et al., 1989; Iiyama et al., 1994a), eine andere über die entsprechenden Glucose-Ester als Acyl-Donor (Bokern et al., 1991; Iiyama et al., 1994a). Beide Wege erscheinen energetisch möglich. Sinapoylglucose zum Beispiel besitzt ein Gruppenübertragungspotential für den Acyltransfer von $-35,7$ kJ/mol (Mock und Strack, 1993). Dieses Potential wird analog von Acyltransferasen wie z.B. der SMT und SCT genutzt.

Bezüglich der Funktion von Hydroxyzimtsäuren in Zellwänden werden mehrere Möglichkeiten diskutiert. Ferulasäure zum Beispiel kommt überwiegend in der Familie der Poaceae vor und wird dort über eine Ester-Bindung mit der 5-O-Position des α -L-Arabinosyl-Rests von Arabinoxylan verknüpft. So können Polysaccharide miteinander vernetzt werden, aber auch Polysaccharide mit Lignin oder mit Proteinen (Phillippe et al., 2007). Hydroxyzimtsäuren sollen aber auch die Matrix innerhalb der Zellwand verstärken und die Zellexpansion verhindern (Tan et al., 1991; Tan et al., 1992; Iiyama et al., 1994b; Piber und Koehler, 2005). Desweiteren konnte in *Deschampsia antarctica* gezeigt werden, dass unter UV-B-Strahlung die Konzentration von 4-Cumarsäure, Kaffeesäure und Ferulasäure in den Zellwänden zunimmt (Ruhland et al., 2005). Es wird diskutiert, dass diese Zunahme dazu dient, die epidermale Zellelongation und Blattexpansion durch die Verknüpfung der Hydroxyzimtsäuren mit Pectinen und/oder Extensinen zu beschränken und somit die UV-exponierte Blattfläche möglichst gering zu halten (Fry, 1986; Ruhland et al., 2005).

1.4. Regulation des Hydroxycimtsäurestoffwechsels

Mit der Regulation der Genexpression auf der Ebene der Transkription kontrollieren Organismen viele wichtige biologische Prozesse. Als Transkriptionsfaktoren werden dabei Proteine genutzt, welche die DNA sequenzspezifisch erkennen und an sie binden können, wodurch die Häufigkeit der Initiation der Transkription bestimmt werden kann (Stracke et al., 2001). Transkriptionsfaktoren können Aktivatoren, Repressoren oder beides sein. Auf der Basis von Sequenzähnlichkeiten der DNA-Bindedomänen werden sie in verschiedene Familien eingeteilt (Pabo und Sauer, 1992). In Pflanzen bilden MYB- Faktoren eine der größten Familien (Romero et al., 1998). Das erste *MYB*-Gen, das identifiziert wurde, war das Onkogen *v-Myb*, das aus dem Myeloblastose-Virus stammt (Klempnauer et al., 1982). MYB-Proteine von Tieren besitzen meistens drei sich wiederholende Sequenzmotive (R1, R2 und R3), während es bei Pflanzen meist zwei sind (R2 und R3), die eine Länge von ungefähr 50 Aminosäuren haben (Martin und Paz-Ares, 1997).

MYB-Transkriptionsfaktoren spielen bei der Regulation des Phenylpropanstoffwechsels in Pflanzen eine wichtige Rolle (Weisshaar und Jenkins, 1998). So ist zum Beispiel der Transkriptionsfaktor AtMYB4 ein negativer Regulator der Cinnamat-4-Hydroxylase (Jin et al., 2000). Eine Mutation in diesem Transkriptionsfaktor führt zur Akkumulation von Sinapoylmalat durch erhöhte Transkription der Cinnamat-4-Hydroxylase. UV-B-Strahlung führt ebenfalls zu einer Verringerung der Genexpression des *AtMYB4*-Gens und zu einer Akkumulation der Sinapatester (Jin et al., 2000), was den in Kapitel 1.3 beschriebenen Zusammenhang zwischen Sinapatestern und Schutz gegenüber UV-B-Strahlung weiter unterstreicht. Desweiteren konnten R2R3-MYB Transkriptionsfaktoren identifiziert werden (*MYB11*, *MYB12* und *MYB111*), die sowohl Gene des Flavonoidstoffwechsels als auch *UGT 84A1* regulieren (Stracke et al., 2007). So wurde in Dreifach-Mutanten dieser Transkriptionsfaktoren in Wurzeln eine reduzierte Transkriptmenge der *UGT 84A1* gegenüber dem Wildtyp festgestellt.

Einige Vertreter der Brassicaceen wie z.B. *Brassica napus* und *Arabidopsis thaliana* synthetisieren während der Samenentwicklung den Cholinester der Sinapinsäure (Sinapin). Über die Regulation dieses Prozesses ist nur sehr wenig bekannt. Ein wichtiger Transkriptionsfaktor während der Samenentwicklung ist das Produkt des *FUS3*-Gens. Mutanten in diesem Gen werden *fusca* genannt, nach dem griechischen Wort für bräunlich (Müller, 1963). In einem Mutanten-Screen für letale Samen-Phänotypen konnte dieses Gen in Samen mit dunkelbrauner Färbung identifiziert werden. Die dunkle Färbung lässt sich auf die Akkumulation von Anthocyanen in reifenden Samen zurückführen. Die meisten Mutanten vom Typ *fusca* sind in späten Reifungsstadien der Samen letal. Deshalb müssen die Samen im unreifen Stadium geerntet werden, um sie weiter zu vermehren (Müller und

Heidecker, 1968). Das *FUS3*-Gen wurde kloniert und der B3-Genfamilie zugeordnet (Luerssen et al., 1998). Zu dieser Genfamilie gehören auch die Transkriptionsfaktoren *VIVIPAROUS1* aus Mais (McCarty et al., 1991) und die Arabidopsis Gene *ABSICIC ACID INSENSITIVE3* (Giraudat et al., 1992) und *LEAFY COTYLEDON2* (Meinke, 1992). Diese Transkriptionsfaktoren spielen bei der Samenentwicklung eine bedeutende Rolle, indem sie auf die Akkumulation von Speicherproteinen und Speicherlipiden und die Fähigkeit zur Dormanz und Austrocknungstoleranz regulatorisch einwirken (Bäumlein et al., 1994; Koornneef und Karssen, 1994; Meinke et al., 1994). In *fus3*-Mutanten kommt es in den Samen zu einem reduzierten Gehalt an Speicherproteinen und Speicherlipiden, sowie zur Akkumulation von Anthocyanen und zur Intoleranz gegenüber Austrocknung. Das Produkt des *FUS3*-Gens bindet die DNA am sogenannten RY-Motiv (Bäumlein et al., 1986). Dieses Motiv besteht aus der DNA-Sequenz CATGCA und befindet sich 100 bp in 5'-Richtung vom Transkriptionsstart von samenspezifischen Promotoren (Bäumlein et al., 1992), wie zum Beispiel dem Napin-Promotor. Außerdem beeinflusst das Produkt des *FUS3*-Gens die Expression des *TTG1* (transparent testa glabra)-Regulators, der u. a. für die Haarentwicklung in Blättern und Stängeln verantwortlich ist (Tsuchiya et al., 2004). Inwieweit die samenspezifische Regulation des Sinapinsäurestoffwechsels unter dem Einfluss des *FUS3*-Gens in Arabidopsis steht, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden (siehe Abschnitt 3.6).

1.5. Die Enzymfamilie der Glycosyltransferasen in Arabidopsis

Sekundäre Pflanzenstoffe können an Hydroxyl-, Thiol-, Carboxyl- oder Amino-Gruppen glycosyliert werden. Meistens ist UDP-Glucose der Zucker-Donor (Jones und Vogt, 2001). Wird Glucose übertragen, spricht man von Glucosyltransferasen. Wird auch der Transfer anderer Zucker katalysiert, spricht man allgemein von Glycosyltransferasen. Prinzipiell werden nukleotiddiphosphataktivierte Zuckereinheiten auf niedermolekulare Akzeptormoleküle übertragen. Reagiert der Zuckerrest mit der Hydroxyl-Gruppe, entsteht eine glycosidische Bindung; bei dem Transfer auf eine Carboxylgruppe wird eine Esterbindung gebildet.

Die Superfamilie der Glycosyltransferasen wird aufgrund von Sequenzähnlichkeit und Substraterkennung in 69 Familien unterteilt (Lim und Bowles, 2004). In der vorliegenden Arbeit wurden Enzyme der Familie 1 untersucht, deren Klassifizierung auf das „Glycosyltransferase Nomenclature Committee“ (Mackenzie et al., 1997) zurückgeht. Die Enzyme dieser Klasse wurden in einer Untersuchung identifiziert, in der eine bakterielle Zeaxanthin-Glycosyltransferase mit Säuger- und Pflanzenenzymen verglichen wurde (Hundle et al., 1992). Kennzeichnend für diese Familie ist die sogenannte „PSPG-Box“

[Plant Secondary Product Glycosyltransferase (Hughes und Hughes, 1994)]. Dabei handelt es sich um ein Konsensus-Motiv, das aus einer Sequenz von 44 Aminosäuren besteht und im Bereich des C-Terminus liegt (Abbildung 1.4). Die ‘‘PSPG-Box‘‘ der Glycosyltransferasen ist an der Erkennung und Bindung des Nukleotiddiphosphat-Zuckers beteiligt (Mackenzie et al., 1997). Dies konnte durch Kristallisation einer pflanzlichen Glycosyltransferase aus *Medicago truncatula* untermauert werden (Shao et al., 2005).

Konsensussequenz der PSPG-Box

N-Term.-**W**A**P**Q**V**VE**V**L**A**H**P**AV**G**C**F**V**T**H**C**G**W**N**S**T**L**E**S**I**S**A**G**V**P**M**V**A**W**P**F**F**A**D**Q**-C-Term.

Abbildung 1.4: Konsensussequenz der PSPG-Box pflanzlicher Glycosyltransferasen (Vogt und Jones, 2000). Konservierte Aminosäuren sind in **blau** (Identität >50%) oder **rot** (Identität >80%) gekennzeichnet.

Im Genom von *Arabidopsis thaliana* konnten durch einen Sequenzvergleich mit der PSPG-Box 112 Gene und 8 Pseudogene der GT-Familie 1 identifiziert werden (Paquette et al., 2003), die über alle fünf Chromosomen verteilt sind und wahrscheinlich einen monophyletischen Ursprung haben. Durch phylogenetische Analysen wurden diese Gene in 14 verschiedene Cluster gruppiert (Li et al., 2001; Lim und Bowles, 2004). Die in dieser Arbeit untersuchten Glucosyltransferasen *UGT 84A1-4* sind dem Cluster L zugeordnet, in dem sich hauptsächlich Glucosyltransferasen befinden, die mit Pflanzeninhaltsstoffen eine Ester-Bindung bilden (Li et al., 2001). Während die *UGT 84A2* auf dem Arabidopsis Chromosom III lokalisiert ist, liegen die *UGT 84A1*, *84A3* und *84A4* auf dem Chromosom IV tandemartig gekoppelt vor (Paquette et al., 2003). Die Substrate von *UGT 84A1-4* konnten durch *in vitro*-Enzymassays mit heterolog exprimierten Protein charakterisiert werden (Milkowski et al., 2000a; Lim et al., 2001). Dabei zeigte sich, dass die *UGT 84A2* eine ausgeprägte Spezifität für Sinapinsäure aufweist, während die *UGT 84A1*, *84A3* und *84A4* ohne klare Präferenzen Hydroxyzimtsäuren mit Glucose verestern können. Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über die Akzeptorspezifitäten der rekombinanten Arabidopsis UGTs.

Tabelle 1.1: Akzeptorspezifitäten der rekombinanten Arabidopsis UGTs in 0,1 M Mes Puffer (pH 6,0); entnommen aus Milkowski et al., 2000a.

Substrate ^a	Relative Aktivitäten in %			
	UGT 84A2	UGT 84A4	UGT 84A1	UGT 84A3
Sinapinsäure	100 ^b	100 ^c	57	32
Ferulasäure	7	77	77	94
Zimtsäure	- ^f	24	24	76
4-Cumarsäure	-	66	100 ^d	100 ^e
Kaffeesäure	-	23	72	45
Benzoessäure	-	-	-	-
4-Hydroxybenzoessäure	-	-	-	-
Salicylsäure	-	-	-	-
Indol-3-Acetat (IAA)	-	-	-	-

^a 2 mM mit 4 mM UDP-Glucose; ^b35,5 $\mu\text{kat kg}^{-1}$ Protein; ^c17,9 $\mu\text{kat kg}^{-1}$ Protein;

^d173 $\mu\text{kat kg}^{-1}$ Protein; ^e87,6 $\mu\text{kat kg}^{-1}$ Protein; ^f-, kein Produkt mit HPLC detektierbar

Bis jetzt konnte für keine der pflanzlichen Glycosyltransferasen ein Signalpeptid oder eine Zielsequenz identifiziert werden (Li et al., 2001; Lim und Bowles, 2004). Es wird daher allgemein angenommen, dass die pflanzlichen Glycosyltransferasen im Cytosol lokalisiert sind.

1.6. Ziel der Arbeit

Das Genom von *Arabidopsis thaliana* codiert vier Ester-bildende HCA-Glucosyltransferasen (UGT 84A1-4). Diese Enzyme katalysieren die Bildung von 1-O- β -Glucose-Estern der Hydroxyzimtsäuren. Die HCA-Glucose-Ester können als aktivierte Acyldonatoren für Transacylierungsreaktionen dienen oder in verschiedenen Geweben als Endprodukte akkumulieren. Aufgrund des breiten Substratspektrums *in vitro* ist es problematisch, Aussagen über die Funktion der Glucosyltransferasen UGT 84A1-4 in der Pflanze zu treffen.

Die vorliegende Doktorarbeit beschäftigt sich mit der zentralen Fragestellung nach der Bedeutung der Glucosyltransferasen UGT 84A1, A2, A3 und A4 *in vivo*. Dabei sollte geklärt werden, ob diese Enzyme redundante oder spezifische Funktionen innerhalb der Pflanze übernehmen.

Zur Bearbeitung dieser Fragestellungen wurden zunächst die Genexpression und die Promotoraktivität der vier Glucosyltransferasen über den gesamten Lebenszyklus von *Arabidopsis thaliana* charakterisiert und in Beziehung zur HCA-UGT-Aktivität sowie dem Vorkommen von Hydroxyzimtsäure-Konjugaten in verschiedenen Pflanzen-Organen gesetzt.

Durch gezielte Veränderung der Genexpression der vier Glucosyltransferasen sollte ein genaueres Bild über die Bedeutung dieser Enzyme im Stoffwechsel der Pflanze erhalten werden. Dabei stand die Frage im Mittelpunkt, wie die Modulation der Genexpression den Gehalt an Phenylpropanoiden im pflanzlichen Sekundärstoffwechsel beeinflussen kann. Hierfür wurden verschiedene RNAi-Linien, homozygote Mutanten und Überexpressionslinien hergestellt und analysiert. Zudem sollten Pflanzen untersucht werden, die durch Stressoren eine veränderte Genexpression der vier UGTs zeigten (z.B. UV-B-Strahlung), um weiteren Aufschluss über die biologische Bedeutung dieser Enzyme zu erhalten.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Pflanzen

Arabidopsis Ökotypen

Als pflanzlicher Modellorganismus wurde *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. verwendet. Für die Untersuchungen der vier Glucosyltransferasen UGT 84A1-4 diente der Ökotyp Columbia (Col-0). Die Konstrukte für die Überexpression, für die RNAi-Suppression und für die Promotor-GUS-Analysen wurden in Pflanzen mit einem Col-0 Hintergrund transformiert. Für die Experimente unter UV-B-Stress kamen die Ökotypen Landsberg erecta (Ler) und Nossen (No-0) hinzu. Die Ökotypen Col-0 und Ler wurden vom Nottingham Arabidopsis Stock Centre bezogen, während No-0 vom RIKEN BioResource Center (Japan) geordert wurde.

T-DNA- und Transposon-Insertionslinien und Arabidopsis-Mutanten

Alle verwendeten T-DNA Insertionslinien hatten den genetischen Hintergrund Col-0. Die Linie mit einem Transposon im Gen der *UGT 84A2* war vom Ökotyp No-0. Tabelle 2.1 gibt einen Überblick über die verwendeten Linien.

Tabelle 2.1: T-DNA- und Transposon-Insertionslinien, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden

Linie	AGI-Code des Gens mit Insertion	Charakteristik	Herkunft / Referenz
<i>UGT 84A2 Pro</i>	At3g21560	T-DNA-Insertion im Promotorbereich	Gabi-Kat Linie 445A01; (Rosso et al., 2003)
<i>UGT 84A2 KO</i>	At3g21560	Transposon-Insertion im ORF	Riken Transposon Tag Line 11-5836-1; (Kuromori et al., 2004)
<i>UGT 84A1 KO</i>	At4g15480	T-DNA-Insertion im ORF	Gabi-Kat Linie 765F10; (Rosso et al., 2003)
<i>UGT 84A3 KO</i>	At4g15490	T-DNA-Insertion im ORF	Salk_045492; (Alonso et al., 2003)
<i>UGT 84A4 KO</i>	At4g15500	T-DNA-Insertion im ORF	Gabi-Kat Linie 826F10; (Rosso et al., 2003)

In dieser Arbeit standen mehrere Mutanten von *Arabidopsis thaliana* zur Verfügung. Tabelle 2.2 fasst die untersuchten Linien mit Mutationen zusammen.

Tabelle 2.2: Arabidopsis Mutanten, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden

Mutante	Hintergrund	betroffenes Gen	Art der Mutation	Literaturverweis
<i>sng1</i>	Col-0	At2g22990 (<i>SMT</i>)	Punktmutation	(Lorenzen et al., 1996)
<i>tt4</i>	Ler	At5g13930 (<i>CHS</i>)	Punktmutation	(Shirley et al., 1995)
<i>fus3-3</i>	Col-0	At3g26790 (<i>FUS3</i>)	Punktmutation	(Tiedemann et al., 2007)
<i>fus 3-T</i>	WS	At3g26790 (<i>FUS3</i>)	T-DNA-Insertion	(Tiedemann et al., 2007)

2.1.2. Mikroorganismen

Zur Vermehrung von Plasmiden in *Escherichia coli* wurde der Bakterienstamm XL1 Blue (Stratagene) verwendet. Zur Transformation von *Arabidopsis thaliana* wurden die Bakterienstämme von *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 (Hood et al., 1993) und für die Transformation der Promotor-GUS-Konstrukte der Stamm GV3101 (Koncz und Schell, 1986) genutzt.

2.1.3. Vektoren

PCR-Produkte wurden in den Vektor pGEM[®]-T Easy (Promega, Madison WI, USA) kloniert. Das Plasmid trägt eine Ampicillin-Resistenz und erlaubt Blau/Weiß-Selektion.

Für die Zwischenklonierung von DNA-Fragmenten für die RNAi-Suppression fanden die Vektoren pBNNGUS (C. Milkowski, IPB Halle, unveröffentlicht) und pBlueSFiBA (Hausmann und Töpfer, 1999) Verwendung. Für die Transformation der Pflanzen mit den RNAi-Konstrukten wurde der binäre Vektor pLH7000 (Hausmann und Töpfer, 1999) benutzt. Dieser enthält zur Selektion von transformierten Pflanzen das *bar*-Gen, das für eine Phosphinotricin-Acetyltransferase codiert. Durch dieses Gen, das ursprünglich von Bodenbakterien stammt, sind transgene Pflanzen in der Lage das Herbizid Phosphinotricin abzubauen. Dadurch können transgene Pflanzen mit dem Herbizid Basta[®], das Phosphinotricin enthält, selektioniert werden.

Die DNA-Fragmente für die Überexpression der UGTs wurden in den Impact Vector 1.1 (Plant Research International, Wageningen, NL) zwischenkloniert und dabei mit dem rbcS-Promotor für die Pflanzenexpression fusioniert. Vom Impact Vektor 1.1 wurde das fusionierte DNA-Fragment in den binären Vektor pBINPLUS (Plant Research International, Wageningen, NL) transformiert.

Die Promotor-GUS-Konstrukte wurden in den binären Vektor 35SGUSpGREEN (Irene Stenzel, IPB Halle, unveröffentlicht) transformiert. Dieser geht auf den Vektor pGREEN zurück (Hellens et al., 2000) und enthält das promotorlose bakterielle *GUS*-Gen zwischen dem 35S-Promotor und dem nos-Terminator. Die Replikation des pGREEN-Vektors in *A. tumefaciens* ist von der Anwesenheit eines weiteren Plasmids abhängig. Das Helferplasmid (pSOUP) codiert die zur Replikation erforderliche ReplikaseA.

Tabelle 2.3 gibt einen Überblick über die von den Plasmiden vermittelten Antibiotikaresistenzen, die zur Selektion von erfolgreich transformierten Bakterienstämmen verwendet wurden.

Tabelle 2.3: Überblick über die von den Vektoren vermittelten Antibiotika Resistenzen

Plasmid	Antibiotika Resistenz zur Selektion von Bakterienstämmen	vermittelte Resistenz in transformierten Pflanzen (gilt nur für binäre Vektoren)
p-GEM [®] T-easy	Ampicillin	-
pBNNGUS	Ampicillin	-
pBNNFAD2	Ampicillin	-
pBlueSfiBA	Ampicillin	-
pLH7000	Spectinomycin	Basta [®]
pImpact Vector 1.1	Ampicillin	-
pBINPLUS	Kanamycin	Kanamycin
35SGUSpGREEN	Kanamycin	Kanamycin

2.1.4. Oligonukleotide

Für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurden verschiedene Primer von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) bezogen. Tabelle 7.1 im Anhang gibt einen Überblick über die Sequenzen dieser Oligonukleotide.

2.1.5. Chemikalien und Enzyme

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Chemikalien von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma (München) und Merck (Darmstadt) bezogen. Chemikalien für Pflanzennährmedien wurden von der Firma Duchefa (Harlem, NL) bezogen. Für molekularbiologische Arbeiten wurden, wenn nicht anders angegeben, Enzyme von Roche (Mannheim), New England Biolabs (Frankfurt), Invitrogen (Karlsruhe), Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden) und Stratagene (La Jolla CA, USA) verwendet. Alle Lösungen und Medien wurden mit doppelt entsalztem Wasser aus einer Milli-Q-Anlage (Millipore, Schwalbach) angesetzt.

2.1.6. Geräte

Folgende Geräte wurden in der vorliegenden Arbeit benutzt:

Zentrifugen:	5417R-Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg) Sorvall Super T21 (DuPont, Bad Homburg) 810R-Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg)
Thermocycler:	Eppendorf MasterCycler Gradient (Eppendorf, Hamburg)
Thermomixer:	Eppendorf comfort (Eppendorf, Hamburg)
Geldokumentation:	BioDocAnalyse (Whatmann Biometra, Göttingen)
Elektrophoresen:	Mini-PROTEAN II (BioRAD, München) XCell SureLock R Mini-Cell (Invitrogen, Karlsruhe)
Spektrophotometer:	Beckman DU 640
Bead Beater:	Biospec. Products, Bartelsville, OK, USA
HPLC:	Waters TM Millipore System (Waters, Eschborn)
pH-Meter:	inoLab pH Level 1 (WTW)
Spannungsgerät:	Power Supply EPS 301 (GE Healthcare Life Sciences, München)
Ultraschall:	UW 2070 (Bandelin, Berlin)
Elektroporator:	Micropulser TM (BioRad, München)
Klimaschrank:	Percival (CLF, Emmersacker)
Speed Vac:	Concentrator 5301 (Eppendorf, Hamburg)

2.2. Kultivierung, Transformation und Selektion der Organismen

2.2.1. Anzucht, Transformation und Selektion von *Arabidopsis thaliana*

Die Anzucht von *Arabidopsis*-Pflanzen erfolgte in einem Klimaschrank bei 24 °C, 70 % relativer Luftfeuchte, einer Lichtstärke von ca. 130 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ und unter Langtagbedingungen (16h Licht und 8h Dunkelheit). Die Samen wurden auf einem Erde/Vermiculit (2-3 mm Körnung) Gemisch angezogen. Nach ca. 2 Wochen konnten die Pflanzen in einzelne Töpfe pikiert werden.

Die Transformation von *Arabidopsis*-Pflanzen erfolgte durch den *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm EHA105 (Hood et al., 1993) nach der Blütentauchmethode (Clough und Bent, 1998). Dafür wurden zunächst 400 ml LB-Medium (Luria-Bertani-Medium; Sambrook et al., 1989) mit den entsprechenden Antibiotika versetzt und mit einer Übernachtskultur auf eine OD_{600} von 0,1 angeimpft. Die Zellen wurden bei 28 °C bis zu einer OD_{600} von ungefähr 0,8 kultiviert. Anschließend wurden die Agrobakterien abzentrifugiert (10 min, 4000 x g) und das Bakterienpellet in 200 ml 5% (w/v) Saccharose-Lösung mit 0,05% (w/v) Silwet L-77 aufgenommen. In dieser Suspension wurden Blütenstände mit gut entwickelten Knospen 2 min inkubiert. Die behandelten Pflanzen wurden anschließend unter Langtagbedingungen im Klimaschrank bis zur Samenreife kultiviert.

Für die Selektion transgener Pflanzen mit dem *bar*-Gen als Resistenzmarker wurden die Samen auf Erde ausgesät und Keimlinge ca. 1 Woche nach Aussaat mit einer 1:5000-Verdünnung (aus einer Stammlösung mit einer Konzentration von 200 mg/ml) des Herbizids Basta[®] (Hoechst Schering AgrEvo GmbH) besprüht. Diese Behandlung wurde im Abstand von ca. 3 Tagen wiederholt, bis eine ausreichende Selektion der transgenen Pflanzen erkennbar war.

Die Selektion transgener Pflanzen mit dem *nptII*-Gen, welches Kanamycin-Resistenz vermittelt, erfolgte durch Aussaat auf modifiziertem MS-Medium [1 Liter: 0,5 g MES (pH 5,7), 4,4 g MS (Duchefa, Harlem, NL), 10 g Saccharose, 8 g Agar] mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Carbenicillin (zum Abtöten der Agrobakterien) und 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin. Vor der Aussaat mussten die Samen sterilisiert werden. Dazu wurden sie 2 min in 70% (v/v) Ethanol und 10 min in Bleichlösung [12% Natriumhypochloridlösung; 0,15% (v/v) Tween[®]20] inkubiert und anschließend mehrmals mit sterilem Wasser gewaschen. Die Samen wurden zum Quellen über Nacht in Wasser bei 4 °C inkubiert und dann auf dem oben beschriebenen

Medium ausgelegt. Nach ca. zwei Wochen konnten die transgenen Pflanzen auf Erde überführt werden.

2.2.2. Kultivierung, Transformation und Selektion von *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in LB-Füssig-Medien in einem Schüttelschrank bei 200 rpm und 37 °C oder auf LB-Agar-Platten (Sambrook et al., 1989). Die Selektion der Bakterien auf bestimmte Plasmide erfolgte unter Zusatz der Antibiotika Kanamycin (50 µg/ml), Carbenicillin (50 µg/ml) oder Spectinomycin (100 µg/ml) im Medium.

Die Transformation der Plasmide in die Bakterienzellen konnte durch die Hitzeschock-Methode erreicht werden. Dazu wurde zu 50 µl Suspension mit kompetenten Bakterien 1 µl Ligationsansatz gegeben. Dieser Ansatz wurde 30 Minuten auf Eis, 45 Sekunden bei 42 °C in einen Thermocycler und danach wieder für 2 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde dem Ansatz 450 µl SOC-Medium (Sambrook et al., 1989) zugegeben und bei 37 °C und 200 rpm für 1 Stunde in einen Schüttelschrank gestellt. Von dieser Suspension wurden zwischen 50 und 100 µl auf Selektionsplatten ausgestrichen und danach bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.2.3. Kultivierung, Transformation und Selektion von *A. tumefaciens*

Die Anzucht von *A. tumefaciens* erfolgte in LB-Flüssig-Medien in einem Schüttelschrank bei 200 rpm und 28 °C. Die Selektion der Bakterien auf bestimmte Plasmide erfolgte unter Zusatz der Antibiotika Kanamycin (50 µg/ml) oder Spectinomycin (100 µg/ml) im Medium.

Die Transformation von *A. tumefaciens* erfolgte nach der Hitzeschock-Methode wie oben bei *E. coli* beschrieben. Die Selektionsplatten, auf denen die Bakteriensuspensionen ausgestrichen wurden, mussten allerdings bei 28 °C für ungefähr drei Tage inkubiert werden, da Agrobakterien langsamer wachsen als *E. coli*-Kolonien.

2.3. DNA-Analytik

2.3.1. Isolierung pflanzlicher genomischer DNA

Für die Isolierung von pflanzlicher genomischer DNA wurde das DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Zunächst wurde 100 mg frisch geerntetes Blattmaterial mit Zirconium-Kugeln im Bead Beater (Biospec Products, Bartlesville, USA) für eine Minute mit Hilfe des AP1 Puffers aufgeschlossen. Die anschließende Präparation der genomischen DNA folgte den Angaben des Protokolls vom Hersteller.

2.3.2. Plasmidpräparation aus *E. coli* und *A. tumefaciens*

Für die Präparation von Plasmiden aus Bakterienzellen wurden Bakterien in 2 ml LB-Medium über Nacht angezogen (Anzuchtbedingungen siehe Abschnitt 2.2.2. und 2.2.3.) Die Zellen wurden anschließend bei 10.000 rpm abzentrifugiert. Die Aufreinigung der Plasmide erfolgte mit dem Qiaprep[®] Spin Miniprep Kit nach Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden).

2.3.3. Polymerasenkettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der Polymerasenkettenreaktion (Mullis et al., 1986). Puffer und Go-Taq-Polymerase wurde von der Firma Promega (Mannheim) verwendet. Die dNTPs stammten von der Firma Peqlab (Köln). Die PCR wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt.

Tabelle 2.4: PCR-Ansätze

	Stammlösung	Endkonzentration	1 x (µl)
Puffer (inkl. MgCl)	5 x	1 x	10,0
dNTP	10 mM	0,2 mM	1,0
Primer fw	25 pmol / µl	0,5 pmol / µl	1,0
Primer rev	25 pmol / µl	0,5 pmol / µl	1,0
Taq-Polymerase	5 U / µl	1 U	0,2
H ₂ O	-	-	ad 50 µl
DNA	-	ca. 1 µg eingesetzt	2 oder 3

Für präparative PCR-Reaktionen wurde der Platinum PCR SuperMix High Fidelity der Firma Invitrogen (Karlsruhe) verwendet, da dieser eine geringe Fehlerrate bei der Amplifikation und eine hervorragenden Ausbeute aufwies.

Die PCR läuft prinzipiell in 3 Schritten ab. Zuerst wird die DNA denaturiert, danach folgt ein Annealingschritt der Primer und abschließend kommt es zur Elongation der DNA-Abschnitte. Die folgende Tabelle zeigt die Programmierung der Thermocycler.

Tabelle 2.5: Programm zur Durchführung der PCR

Zeit	Temperatur (°C)	Schritt
2 min	95	1. initiale Denaturierung
45 sec	95	2. Denaturierung
30 sec	Tm-5	3. Annealing
0,5 – 2,5 min	72 (Go Taq) bzw. 68 (High Fidelity)	4. Elongation
10 min	72 bzw. 68	5. finale Elongation

Die Schritte 2.-4. wurden 35-mal wiederholt. Die Zeit der Elongation (4. Schritt) variierte in Abhängigkeit von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments. Als Faustregel galt, dass die Taq-Polymerase für 1 kb DNA ca. 1 Minute benötigt. Fragmente, die länger als 2,5 kb waren, mussten im Verlauf der vorliegenden Arbeit nicht amplifiziert werden.

2.3.4. Agarosegelelektrophorese

Nucleinsäuren konnten mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt werden. Dazu wurden 1%-ige (w/v) Agarosegele in 1 x TBE-Puffer [0,45 M TrisHCl (pH 8,0), 0,45 M Borsäure, 10 mM EDTA] gegossen. Vor dem Gießen wurde zur Visualisierung der Nucleinsäuren 0,1 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Die Proben wurden vor dem Beladen des Gels mit 10 x DNA-Ladepuffer versetzt [20% (v/v) Glycerin, 0,1 M EDTA, 1% (w/v) SDS, 0,2% (w/v) Bromphenolblau, 0,2% (w/v) Xylencyanol FF]. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte je nach Gelgröße bei 90-120 Volt.

Fertiggele (E-Gel single comb; Invitrogen, Karlsruhe) kamen ebenfalls zur Auftrennung von DNA-Fragmenten zum Einsatz. Die Auftrennung erfolgte mit Hilfe der E-Gel PowerBase v.4 (Invitrogen) innerhalb von 15 bzw. 30 min.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele mit dem Geldokumentationssystem BiodocAnalyze (Whatmann Biometra, Göttingen) unter UV-Anregung fotografiert. Als Größenstandard wurde ein definiertes Fragmentgemisch (Smart Ladder) der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) verwendet.

2.3.5. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Elektrophoretisch aufgetrennte DNA wurde auf dem UV-Leuchttisch des Geldokumentationssystems BiodocAnalyse (Whatmann Biometra, Göttingen) bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm detektiert. Die gewünschten DNA-Fragmente wurden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des MinElute Gel Extraction Kit (Fragmente bis 4 kb) bzw. des QIAquick GelExtraction Kit (Fragmente über 4 kb) der Firma Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben aus der Gelmatrix eluiert.

2.3.6. Aufreinigung von DNA

Die Aufreinigung von DNA nach Restriktionsspaltungen, Polymerase-Kettenreaktionen oder Dephosphorylierung erfolgte einerseits mit dem Quick-Clean-Kit der Firma Bioline (Luckenwalde) nach Herstellerangaben. Andererseits kam auch die Ethanol-Natriumacetat-Fällung zum Einsatz. Dabei wurde die zu fällende DNA mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat und 2,5 Volumen absolutem Ethanol versetzt und 1 h bei - 20 °C inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 30 min mit 14.000 rpm wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und nach Trocknung in Wasser aufgenommen.

2.3.7. Restriktionsanalyse

Für Restriktionsanalysen zur Kontrolle von Insertgrößen wurde 1 µl (ca. 0,2 bis 0,5 µg) Plasmid-DNA mit 5 U des jeweiligen Restriktionsenzym in einem Endvolumen von 10 µl eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 60 min beim Temperaturoptimum (meistens 37 °C) des entsprechenden Enzyms. Bei präparativen Restriktionsansätzen wurden entsprechend größere Mengen DNA (2-5 µg) eingesetzt.

2.3.8. Ligation

Mit dem Platinum PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogen, Karlsruhe) amplifizierte PCR-Fragmente (siehe Abschnitt 2.3.3.) wurden aufgereinigt (siehe Abschnitt 2.3.6) und unter Verwendung des pGEM[®]-T Easy-Kits (Promega, Mannheim) in den Vektor pGEM[®]-T Easy ligiert. Die Ligation erfolgte nach Herstellerangaben. 1 µl des Ligationsansatzes wurde in kompetente *E. coli* XL1 Blue Zellen transformiert. Transformierte Zellen wurden auf LB-Agar mit Carbenicillin selektiert. Weitere Subklonierungen in andere Vektoren erfolgte nach folgendem Protokoll:

Restriktion des Vektors:

3 µl Plasmid
1 µl 10 x Restriktasepuffer
0,5 µl Restriktase 1 (10 U/ µl)
0,5 µl Restriktase 2 (10 U/ µl)
5 µl dd H₂O

Restriktion zur Gewinnung des Inserts:

20 µl rekombinantes Plasmid
5 µl 10 x Restriktasepuffer
3 µl Restriktase 1 (10 U/ µl)
3 µl Restriktase 2 (10 U/ µl)
19 µl dd H₂O

Die Restriktionsansätze wurden 2 h beim Temperaturoptimum (meistens 37 °C) der Enzyme inkubiert. Anschließend folgte die Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme durch 15 minütige Inkubation bei 65 °C. Nach der Dephosphorylierung des Vektors (siehe Abschnitt 2.3.9) wurden beide Ansätze vereinigt. Nach der Reinigung der DNA (siehe Abschnitt 2.3.6; Ethanol-fällung) wurde das DNA-Pellet in einem 20 µl Ligationsansatz aufgenommen (5µl Ligationspuffer, 14 µl dd H₂O und 1 µl T4-Ligase) und über Nacht bei 14 °C inkubiert. 1 µl des Ligationsansatzes wurde in kompetente *E. coli* XL1 Blue Zellen transformiert. Die Selektion der gewünschten Vektor-Fragment-Kombination erfolgte mit Hilfe der Antibiotikaresistenz des neuen Vektors und wurde anschließend nach der Plasmidisolation durch Restriktionsanalyse überprüft.

2.3.9. DNA-Dephosphorylierung

Um die Selbstligation von Vektoren zu verringern wurde eine Dephosphorylierung mit der SAP (Shrimp alkaline phosphatase) der Firma Roche (Mannheim) durchgeführt. Zu einem 10 µl Restriktionsansatz wurden 3 µl 10 x SAP-Puffer, 3 µl SAP (1 U/ µl) und 4 µl dd H₂O gegeben. Die Dephosphorylierung erfolgte in 15 min bei 37 °C. Anschließend wurde das Enzym durch 15 minütiges Inkubieren bei 65 °C inaktiviert.

2.3.10. DNA-Sequenzierung

DNA-Fragmente wurden durch eine Firma (MWG Biotech, Ebersberg) sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen konnten mit Hilfe des Computerprogramms Clone Manager Suite (Sci Ed Software, Durham, USA) ausgewertet werden.

Zur Gewinnung von Sequenzinformationen wurde zusätzlich die Datenbank TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>) genutzt. Mit Hilfe dieser Datenbank konnten außerdem die in der vorliegenden Arbeit verwendeten T-DNA-Insertionslinien ausfindig gemacht werden.

2.3.11. Genotypisierung der T-DNA- und Transposon-Insertionslinien

In der vorliegenden Arbeit konnten vier T-DNA-Insertionslinien und eine Transposon-Insertionslinie (siehe Tabelle 2.1) untersucht werden. Mit Hilfe der PCR sollte überprüft werden, ob eine Pflanze eine T-DNA bzw. Transposon-Insertion besitzt und ob diese homozygot ist.

Gabi-Kat Linien (Rosso et al., 2003)

Tabelle 2.6 zeigt die Primerkombinationen und die entsprechenden Amplikons der PCRs. Zunächst wurden Pflanzen gesucht, die eine T-DNA-Insertion besaßen.

Tabelle 2.6: PCRs zur Genotypisierung der Gabi Insertionslinien

Linie	Primer	Amplikon	bp
<i>UGT 84A2 Pro</i>	Gabi UGT 84A2 fw / Gabi T-DNA rev	T-DNA	1 000
<i>UGT 84A2 Pro</i>	Gabi UGT 84A2 fw / UGT 84A2 rev	UGT 84A2 + Teil des Promotors	1 500 bp + 700 bp
<i>UGT 84A1 KO</i>	Gabi UGT 84A1 KO fw / Gabi T-DNA rev	T-DNA	1 000
<i>UGT 84A1 KO</i>	UGT 84A1 fw / UGT 84A1 rev	UGT 84A1	1 500 bp
<i>UGT 84A4 KO</i>	Gabi UGT 84A4 KO fw / Gabi T-DNA rev	T-DNA	1 000
<i>UGT 84A4 KO</i>	UGT 84A4 fw / UGT 84A4 rev	UGT 84A4	1 500 bp

Zeigte die PCR ein Fragment der T-DNA mit der Größe von ca. 1000 bp, so wurde überprüft, ob diese Insertion homozygot ist. Dies konnte mit einer weiteren PCR gezeigt werden, indem Primer verwendet wurden, die ein Amplikon der kompletten UGT Sequenz (Primer UGT 84A1-4 fw bzw. rev; siehe Tabelle 7.1) generieren konnten. Für die *UGT 84A2 Pro* Linie wurde der gleiche Forward Primer verwendet wie bei der PCR für die Amplifikation der T-DNA. Dieser liegt ca. 700 bp vor dem ATG der *UGT 84A2*, und ergibt ein Amplikon von ca. 2200 bp (1500 bp + 700 bp). Falls die T-DNA nur in einem Allel einer UGT inseriert war, so ergab die Amplifikation mit diesen Primern ein Fragment der Größe 1500 bp (bzw. 2200 bp), was der kompletten Sequenz der UGT entspricht (gilt für alle vier UGTs). Ist jedoch die T-DNA in beiden Allelen inseriert, so kann es aufgrund der Größe der T-DNA bei einer Elongationszeit von 2 Minuten zu keiner Amplifikation mehr kommen. In entsprechenden Kontrollen wurde überprüft, ob die DNA überhaupt

amplifiziert werden konnte (getestet mit Ubiquitin Primern) und ob die Primer der UGTs funktionsfähig sind (getestet mit WT DNA). Abbildung 2.1 gibt einen Überblick über die Genotypisierung der Gabi-Linien.

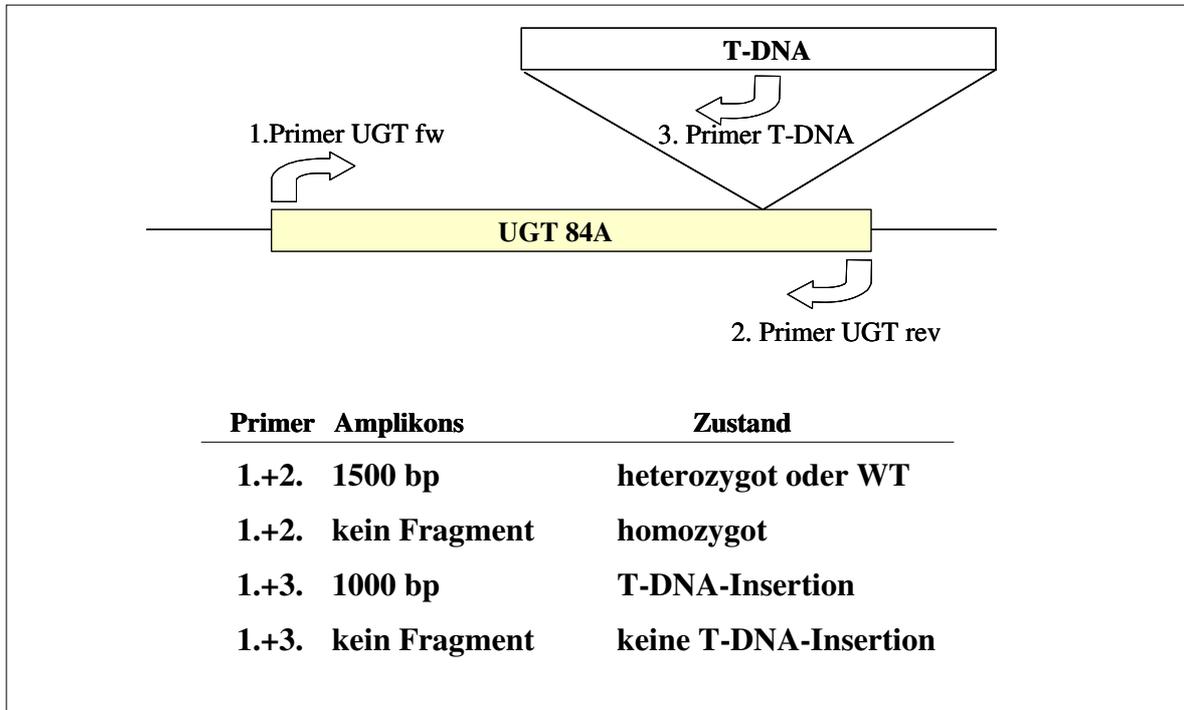


Abbildung 2.1: Genotypisierung der Gabi-Linien mit Hilfe der PCR

Riken-Linie (Kuromori et al., 2004)

Die Linie *UGT 84A2 KO* mit einem Transposon im Gen der *UGT 84A2* wurde mit Hilfe der PCR wie die Gabi-Linien getestet. Es wurde überprüft, welche Pflanzen mit den Primern *UGT 84A2 fw* / *UGT 84A2 rev* kein Fragment ergeben (mit entsprechenden Kontroll-PCRs wie oben bei den Gabi-Linien beschrieben). Diese Pflanzen sollten homozygot im Hinblick auf die Transposon-Insertion sein und wurden für weitere Experimente verwendet.

Salk-Linien (Alonso et al., 2003)

Die Linie *UGT 84A3 KO* konnte ebenfalls mit Hilfe der PCR auf eine T-DNA-Insertion getestet werden. Abbildung 2.2 gibt einen Überblick über die PCR-Strategie zur Genotypisierung der Salk-Linien.

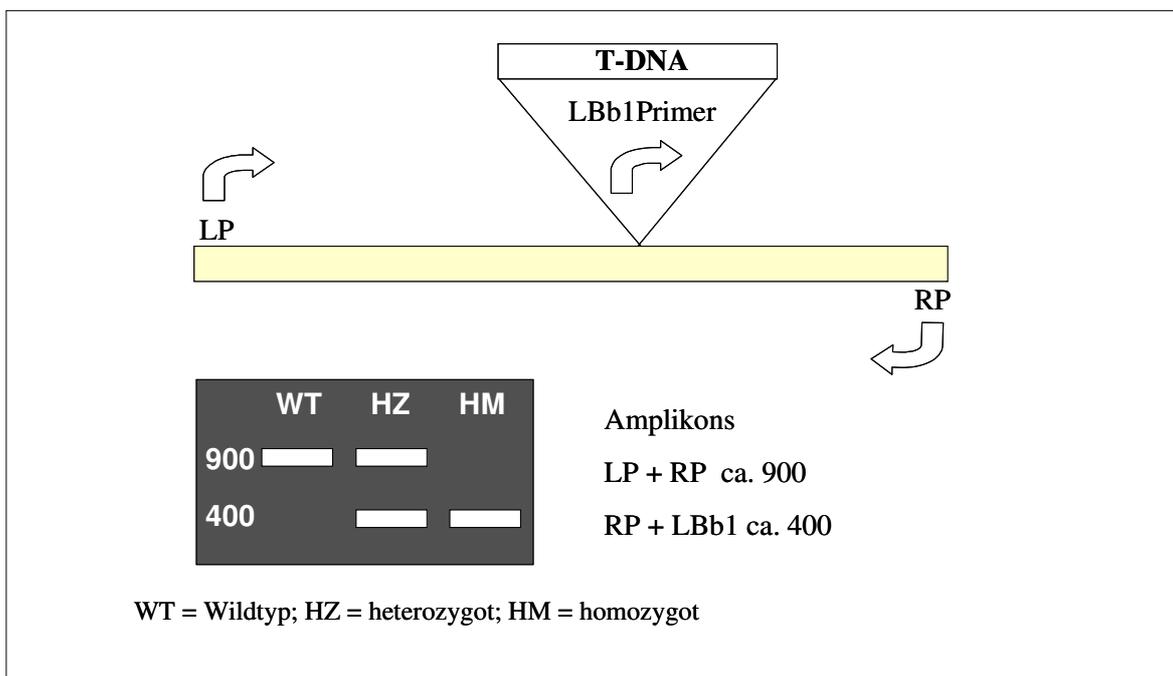


Abbildung 2.2: Genotypisierung der Salk-Linie mit Hilfe der PCR

Diese Linie wurde auf T-DNA-Insertion und auf Homozygotie mit drei Primern überprüft. Das Primerpaar LP und RP (siehe Tabelle 7.1: Salk UGT 84A3 KO LP bzw. RP) ergibt im Wildtyp ein Fragment von ca. 900 bp. Ist die Pflanze heterozygot, erscheint ein zusätzliches Fragment durch die T-DNA-Insertion auf einem der beiden Allele. Das ca. 400 bp große Fragment wurde in diesem Fall durch das Primerpaar RP und LBb1 generiert. Ist die T-DNA in beiden Allelen vorhanden und damit homozygot, ergibt die PCR nur eben dieses eine Fragment mit einer Größe von ca. 400 bp. Zur zusätzlichen Überprüfung der Homozygotie wurde eine PCR mit den Primern UGT 84A3 fw bzw. rev durchgeführt. Ist die T-DNA nicht in beiden Allelen inseriert, wird ein Fragment bei 1.500 bp (komplette Gen der *UGT 84A3*) erhalten. Kann keine Bande generiert werden, ist die Pflanze homozygot in Bezug auf die T-DNA-Insertion. Kontrollen wurden bei dieser PCR durchgeführt wie oben bei den Gabi-Linien beschrieben.

Die PCR-Fragmente mit den T-DNA-Primern wurden in den Vektor pGEM[®]-T Easy kloniert und zum Sequenzieren geschickt (MWG Biotech). Dadurch konnte die genaue Position der T-DNA in den Genen der UGTs festgestellt werden (siehe Abbildung 3.22).

2.4. Klonierungsstrategien

2.4.1. RNAi-Pflanzen

35S:UGT 84A1i, *35S:UGT 84A2i*, *35S:UGT 84A3i* und *35S:UGT 84A4i*

Die Reduktion der Expression der *UGT 84A1-4*-Gene sollte zuerst mit RNAi-vermittelter Suppression erreicht werden. Abbildung 2.3 zeigt einen Sequenzvergleich der vier DNA-Abschnitte, die zur Klonierung der sense- und antisense-Abschnitte der RNAi-Vektoren verwendet wurden.

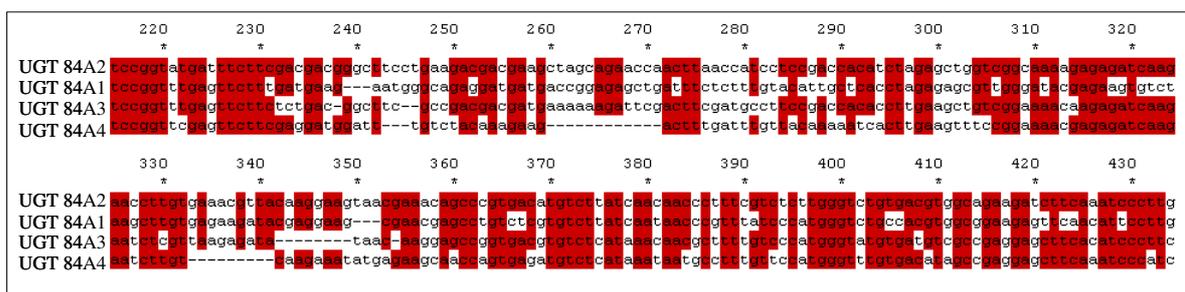


Abbildung 2.3: Sequenzvergleich der Glucosyltransferasen *UGT 84A1-4* im Bereich der für den RNAi-Ansatz gewählten Sequenzabschnitte.

In diesem Sequenzabschnitt beträgt die Identität der vier Gene nur noch ungefähr 55 %, während die kompletten Gene auf DNA-Ebene ca. 70 % identische Sequenzen aufweisen. Damit sollte erreicht werden, dass die Glucosyltransferasen einzeln supprimiert werden, um eventuelle Unterschiede im Phänotyp auf einzelne UGTs zurückführen zu können.

Ungefähr 110 bp große DNA-Fragmente (*35S:UGT 84A1i*, Nukleotidposition nt 238-352; *35S:UGT 84A2i*, nt 270-400; *35S:UGT 84A3i*, nt 226-334; *35S:UGT 84A4i*, nt 229-330) wurden für die sense- und antisense-Abschnitte mittels einer PCR amplifiziert (Primer UGT 110 sense bzw. antisense; siehe Tabelle 7.1) und in den Vektor pGEM[®] T-easy kloniert. Die entsprechenden Schnittstellen für die weitere Klonierung dieser Fragmente wurden den PCR-Primern angefügt (*NheI* und *BamHI* an die sense Primer und *NcoI* und *SmaI* an die antisense Primer). Ausgangsvektor für die Klonierungen war der Vektor pBNNGUS (siehe Abschnitt 2.1.3). Das *GUS*-Insert wurde durch das *FAD2*-Intron ersetzt, indem es mit *NcoI* und *NheI* aus dem Vektor pGEM[®] T-easy geschnitten wurde und in den ebenfalls mit *NcoI* und *NheI* geschnittenen Vektor pBNNGUS ligiert wurde. RNAi-Konstrukte mit einem *FAD2*-Intron zwischen dem sense- und dem antisense-Abschnitt zeigen bessere Suppressions-effekte als Vektoren mit dem *GUS*-Insert (Singh et al., 2000; Smith et al., 2000).

In den Vektor pBNNFAD2 wurden die sense- und antisense-Abschnitte aus dem Vektor pGEM[®] T-easy kloniert, indem die Vektoren mit *NheI* und *BamHI* (sense-Abschnitt) bzw. *NcoI* und *SmaI* (antisense-Abschnitt) geschnitten und anschließend ligiert wurden.

Der Vektor pBNNFAD2 mit der Kassette, die in Abbildung 2.4 dargestellt ist, wurde ebenso wie der Vektor pBlueSfiBA mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *NotI* geschnitten und anschließend ligiert.

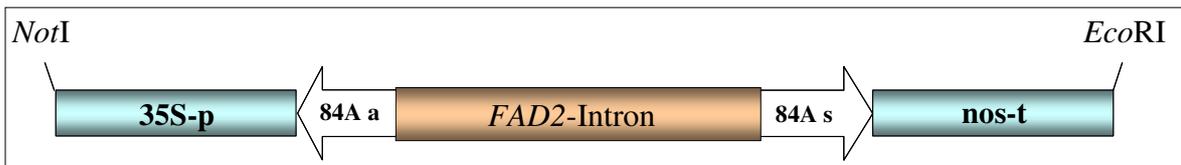


Abbildung 2.4: RNAi-Kassette, die in den Vektor pBlueSfiBA zwischenkloniert wurde. 35S-p=35S-Promotor; nos-t=nos-Terminator; 84A a=antisense-Abschnitt der UGT-Gene; 84A s=sense-Abschnitt der UGT-Gene.

Im Vektor pLH7000 wurde der 35S-Promotor (ca. 400 bp) durch den nos-Promotor (ca. 300 bp) ersetzt. Der nos-Promotor stammt aus *A. tumefaciens* vom Gen der Nopalin-Synthase. Anschließend wurde die Kassette aus Abbildung 2.4 mit dem Restriktionsenzym *SfiI* aus dem Vektor pBlueSfiBA geschnitten und in den Vektor pLH7000, der ebenfalls mit dem Enzym *SfiI* verdaut wurde, ligiert. Abbildung 2.5 zeigt die T-DNA-Kassette des binären Vektors pLH7000. Der Vektor wurde in *Agrobacterium tumefaciens* und anschließend in *Arabidopsis thaliana* transformiert.

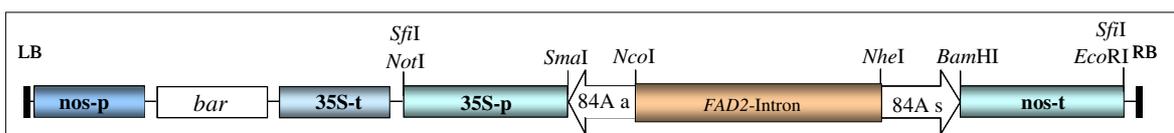


Abbildung 2.5: RNAi-Kassette des binären Vektors pLH7000. Nos-p=Nos-Promotor; *bar*=Gen für Basta-Resistenz; 35S-t=35S-Terminator; 35S-p=35S-Promotor; nos-t=nos-Terminator; 84A a=antisense-Abschnitt der UGT-Gene; 84A s=sense-Abschnitt der UGT-Gene; LB=Left Border; RB=Right Border.

35S:UGT 84A2i (256) und Nap:UGT 84A2i

Mit zwei weiteren RNAi-Konstrukten sollte die Suppression der *UGT 84A2* untersucht werden. Dazu wurde im Vergleich zum oben beschriebenen Konstrukt *35S:UGT84A2i* ein anderer Sequenzabschnitt der *UGT 84A2* gewählt (Abbildung 2.6) und für ein Konstrukt der 35S-Promotor gegen den Napin-Promotor ausgetauscht. Der Napin-Promotor ist samenspezifisch und sollte deshalb die Suppression der *UGT 84A2* im Samen verstärken. Die Sequenz des sense- bzw. antisense-Abschnitts erstreckte sich vom Startcodon (ATG) bis zur Nukleotidposition 256 des *UGT 84A2*-Gens. Abbildung 2.6 gibt den Sequenzvergleich der vier UGTs in diesem Sequenzabschnitt wieder.

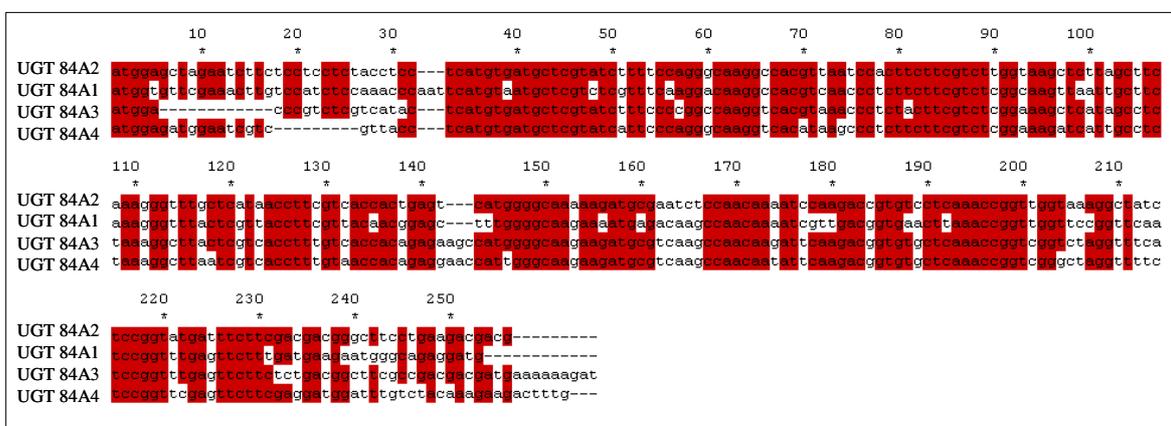


Abbildung 2.6: Sequenzvergleich der vier UGTs im Bereich von Nukleotidposition 1 bis 256. In diesem Sequenzabschnitt weisen die UGTs eine Identität von ca. 70% auf.

Die Identität der vier UGTs ist in diesem Sequenzabschnitt höher als in den *35S:UGT 84A1i-A4i* Konstrukten (siehe Abbildung 2.3). Die Wahrscheinlichkeit, dass die beiden Konstrukte mehrere der vier UGTs supprimieren können, ist demnach höher. Dies wurde in Kauf genommen, da zunächst das Ziel war, überhaupt Effekte mit der RNAi-Strategie in Arabidopsis zu erreichen. Die Vektoren pLH7000 mit den RNAi-Konstrukten unter dem Napin- bzw. 35S-Promotor wurden von C. Milkowski (IPB, Halle) erhalten. In Abbildung 2.7 ist die Kassette des binären Vektors pLH7000 zu sehen, die letztendlich ins Genom der Pflanze integriert wurde. Das Konstrukt unter dem Napin-Promotor wurde für die Analyse der Samen herangezogen, während das Konstrukt unter dem 35S-Promotor hauptsächlich in Blättern analysiert wurde.

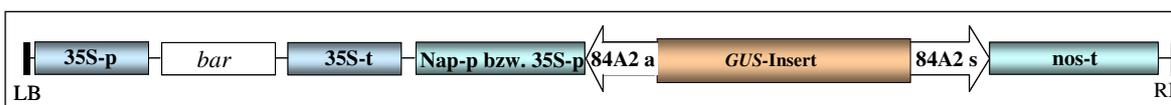


Abbildung 2.7: RNAi-Kassette des binären Vektors pLH7000 mit Konstrukt zur Suppression der *UGT 84A2*. Nos-p=Nos-Promotor; *bar*=Gen für Basta-Resistenz; 35S-t=35S-Terminator; 35S-p=35S-Promotor; nos-t=Nos-Terminator; 84A2 a=antisense-Abschnitt des *UGT 84A2* Gens; 84A2 s=sense-Abschnitt des *UGT 84A2* Gens; LB=Left Border; RB=Right Border.

Nap:UGT 84A2i:SCTi

Mit Hilfe der RNAi-Strategie wurde versucht, die *UGT 84A2* und die 1-*O*-Sinapoyl- β -glucose:Cholin-Sinapoyltransferase (*SCT*) im Samen von Arabidopsis zu supprimieren. Dieses Konstrukt wurde von Juliane Mittasch (IPB, Halle) zur Verfügung gestellt. Die Sequenzen für die sense- bzw. antisense-Abschnitte stammten für dieses Konstrukt vom Raps (*Brassica napus*). Der Abschnitt der *BnSGT1* (homolog zur *UGT 84A2* in Arabidopsis) mit einer Größe von 182 bp hat in diesem Bereich eine Sequenzidentität von ca. 90 % zwischen Brassica und Arabidopsis. Das gleiche gilt für den verwendeten Sequenzabschnitt der *SCT* mit einer Größe von 198 bp. Aufgrund der Ähnlichkeit der Sequenzen sollte dieses Konstrukt auch in Arabidopsis einen Effekt erzielen können. Abbildung 2.8 zeigt die T-DNA-Kassette des binären Vektors pLH7000, die in das Genom von Arabidopsis integriert werden sollte.

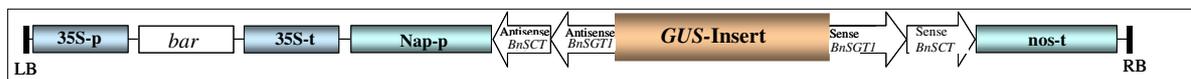


Abbildung 2.8: RNAi-Kassette des binären Vektors pLH7000. Nos-p=Nos-Promotor; *bar*=Gen für Basta-Resistenz; 35S-t=35S-Terminator; 35S-p=35S-Promotor; nos-t=Nos-Terminator; LB=Left Border; RB=Right Border.

Nap:PALi

Zur Suppression der *PAL* in Arabidopsis wurde ein RNAi-Konstrukt verwendet, das *PAL*-Sequenzen aus *Brassica napus* trägt. Die sense- bzw. antisense-Abschnitte der *PAL* hatten jeweils eine Größe von 429 bp im binären Vektor pLH7000. Die RNAi-Kassette ist analog zur Abbildung 2.7 aufgebaut. Abbildung 2.9 gibt die Sequenzvergleiche zwischen der verwendeten RNAi-Sequenz aus *B. napus* (429 bp) und den cDNA-Sequenzabschnitten der vier *PAL*-Gene aus Arabidopsis wieder.

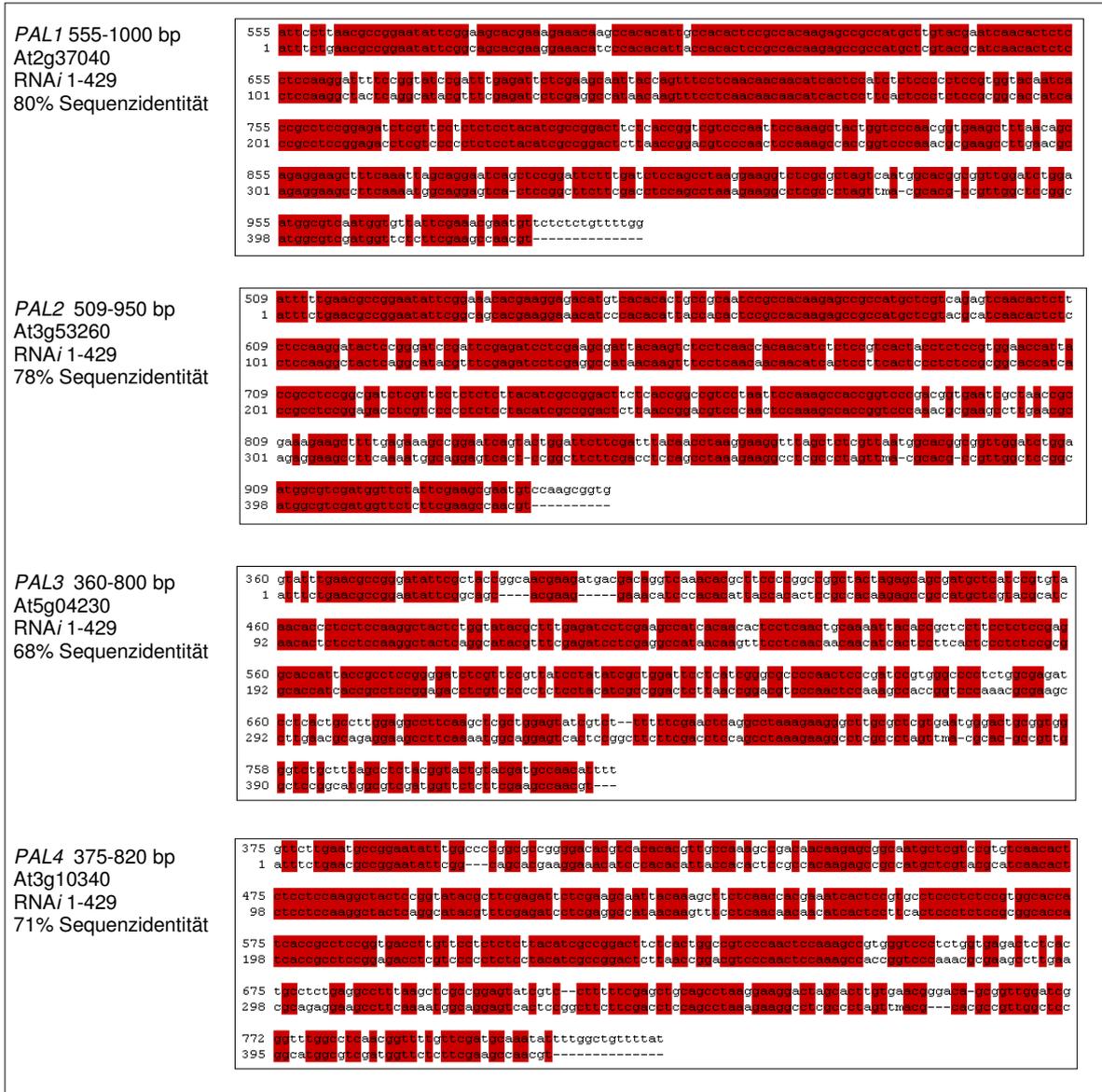


Abbildung 2.9: Sequenzvergleiche zwischen der verwendeten RNAi-Sequenz aus *B. napus* (429 bp) und den cDNA Sequenzabschnitten der vier *PAL*-Gene aus *Arabidopsis*. Mit einer Sequenzidentität von 68-80% könnte dieses Konstrukt die Suppression aller vier *PAL*-Gene in *Arabidopsis* vermitteln.

2.4.2. Überexpressionslinien

Die vollständigen Leserahmen der UGTs wurden mit Hilfe der PCR (Primer UGT 841-4 fw bzw. rev; siehe Tabelle 7.1) amplifiziert und in den Vektor pGEM[®] T-easy kloniert. Die Fragmente wurden sequenziert (MWG) und mit der Software Clone Manager auf Richtigkeit überprüft. Vom Vektor pGEM[®] T-easy aus konnten die Gene der UGTs in den Vektor pImpact 1.1 zwischenkloniert werden, indem beide Vektoren mit *NotI* und *BamHI* verdaut und anschließend wieder ligiert wurden. Dabei wurden die Gene der UGTs mit dem starken Rubisco-Promotor (RbcS-p) fusioniert. Abbildung 2.10 zeigt die Kassette des pImpact 1.1 Vektors, die durch Verdau mit den Restriktionsenzymen *AscI* und *PacI* aus diesem wieder herausgeschnitten wurde und in den binären Vektor pBINPLUS ligiert werden konnte.

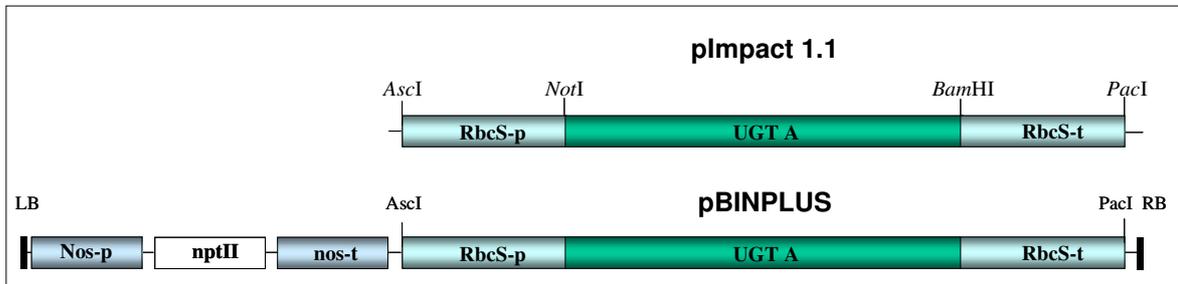


Abbildung 2.10: Konstruktion der Überexpressions-Kassetten. Kassette des pImpact 1.1 Vektors und die Kassette des pBINPLUS Vektors. RbcS-p=Rubisco-Promotor; RbcS-t=Rubisco-Terminator; Nos-p= Nos-Promotor; nos-t= Nos-Terminator; *nptII*=Gen für Kanamycin-Resistenz; LB=Left Border; RB=Right Border.

2.4.3. Promotor-GUS-Konstrukte

Mit Hilfe der Arabidopsis-Genomsequenz konnten Primer (siehe Tabelle 7.1 UGT 84A1-4 Prom fw und rev) abgeleitet werden, mit denen Sequenzen von je 1 kb in 5'-Richtung vom Startcodon der UGTs amplifiziert werden konnten. Diese Sequenzen wurden in den Vektor pGEM[®] T-easy kloniert und dort mit Hilfe der Restriktionsenzyme *HindIII* und *BamHI* (bzw. *HindIII* und *SmaI* bei der *UGT 84A1*) geschnitten und in den Vektor 35SGUSpGREEN ligiert. Abbildung 2.11 gibt die T-DNA wieder, die über *Agrobacterium tumefaciens* in Arabidopsis transformiert wurde.

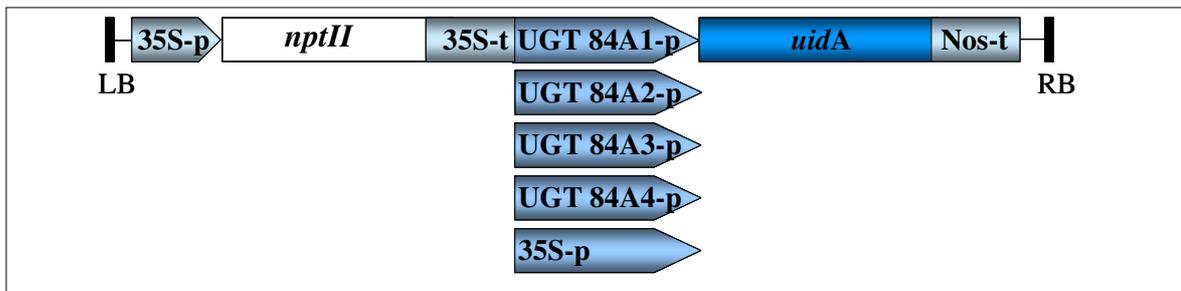


Abbildung 2.11: Promotor-GUS-Konstrukte. 35S-p=35S-Promotor; 35S-t=35S-Terminator; p=Nos-Promotor; nos-t= Nos-Terminator; *nptII*=Gen für Kanamycin-Resistenz; *uidA*=GUS-Gen; UGT84 A1-4=putativen Promotoren der vier Glucosyltransferasen; LB=Left Border; RB=Right Border.

2.5. RNA-Analytik

2.5.1. RNA-Isolierung aus *Arabidopsis thaliana*

Die Isolierung von RNA aus Arabidopsis-Blättern erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben. RNA aus Samen wurde nach einem publizierten Protokoll isoliert (Vicient und Delseny, 1999). Hierfür wurden ca. 100 mg Samen mit Hilfe von Seesand und flüssigem Stickstoff gemörsert und in 2 ml auf -20 °C vorgekühlten Extraktionspuffer (8 M Lithiumchlorid und 2% Mercaptoethanol) überführt. Dieser Ansatz inkubierte bei 4 °C über Nacht im Kühlschrank. Nach kurzer Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Es schloss sich eine Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C an, wonach das entstandene Pellet mit 4 °C kaltem Ethanol gewaschen wurde. Anschließend wurde das luftgetrocknete Pellet in 1 ml Solubilisierungspuffer (0,5% SDS; 100 mM NaCl; 25 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl, pH 7,6; 2% Mercaptoethanol) gelöst. Nun folgten mehrere Extraktionsschritte:

2 x mit 1 Vol. Phenol (pH 7,6)

1 x mit 1 Vol. Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)

2 x mit 1 Vol. Chloroform:Isoamylalkohol (24:1)

Nach jeder Extraktion wurden die Proben 15 min bei 13.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand weiterverwendet. Der letzte extrahierte Überstand wurde mit 0,1 Vol. 3 M Na-Acetat und 1,5 Vol. 96% Ethanol versetzt und über Nacht bei -20 °C inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C für 30 Minuten. Das erhaltene Pellet wurde in 0,5 ml 3 M Na-Acetat gelöst und für 1 Minute mit dem Vortex-Gerät geschüttelt. Abschließend erfolgte erneut eine Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C für 10 Minuten. Das Pellet wurde nochmals mit 70% Ethanol gewaschen und schließlich in 100 µl RNase-freiem Wasser gelöst.

Die gelöste RNA wurde mit dem RNA Cleanup Protokoll aus dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Dabei wurde die RNA-Präparation mit einer DNase zur Beseitigung von restlicher DNA behandelt. Dies geschah ebenfalls nach Herstellerangaben.

Die gereinigte RNA wurde im Photometer quantifiziert und durch Gelelektrophorese auf einem 1 %-igem Agarosegel auf eventuellen Abbau hin überprüft.

2.5.2. cDNA-Synthese und semiquantitative RT-PCR

Für die cDNA-Synthese wurde 1 µg Total-RNA eingesetzt. Die reverse Transkription wurde mit dem Omniscript RT Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt. Von der erhaltenen cDNA wurden 2 µl für die PCR mit der Go-Taq Polymerase (siehe Abschnitt 2.3.3.) eingesetzt. Die Amplifikate wurden anschließend mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese analysiert.

2.5.3. Real-Time quantitative PCR

Die Real-Time quantitative PCR erfolgte mit dem Mx3005P™ Gerät (Stratagene, La Jolla) unter Verwendung des qPCR™ Mastermix Plus for SYBR® Green I (Eurogentec, Liège). Tabelle 2.7 zeigt den Reaktionsansatz und die Reaktionsschritte der RT qPCR:

Tabelle 2.7: Reaktionsansatz und Reaktionsschritte der RT qPCR

Wasser	23 µl
Puffer-Mix	30 µl
Primer-Mix	6 µl (1 pmol / µl)
cDNA	1 µl
PCR Schritt 1	10 min 95 °C (initiale Denaturierung)
PCR Schritt 2 (40 x)	30 sec 95 °C (Denaturierung)
	1 min 60 °C (Annealing)
	30 sec 72 °C (Elongation)

Die Auswertung erfolgte mit der MxPro Software. Als *threshold fluorescence* wurde die Einstellung *background based* gewählt, die Daten exportiert und anschließend der *comparative expression level* ($CEL = 2^{Ct_{GenX} - Ct_{GenY}}$) errechnet. Der Ct Wert gibt an, in welchem Zyklus der PCR die Amplifikat-Menge den *threshold*-Wert überschreitet. GenX stellt das konstitutiv exprimierte Kontrollgen (z.B. *Ubiquitin*) dar, wohingegen GenY (z.B. *UGT 84A1-4*) das zu untersuchende Gen bezeichnet. Als Primer wurden die Oligonukleotide UGT 84A1-4 50 fw und rev (siehe Tabelle 7.1) verwendet.

2.6. Protein-Analytik

2.6.1. Protein-Isolierung aus *Arabidopsis thaliana*

100 mg Pflanzenmaterial wurden in 1 ml 0,1 M Phosphatpuffer (pH 6,0) im Glashomogenizer aufgeschlossen. Danach wurde der Ansatz bei 14.000 x g abzentrifugiert und der Überstand über eine Sephadex G25 Säule (Amersham Biosciences, Freiburg) entsalzt. Die Säule wurde vorher mit 25 ml 0,1 M Phosphatpuffer equilibriert. Der Überstand wurde mit 0,1 M Phosphatpuffer auf ein Volumen von 2,5 ml gebracht und auf die Säule gegossen. Der Durchlauf wurde verworfen. Nun wurde mit 3,5 ml 0,1 M Phosphatpuffer das Proteingemisch von der Säule eluiert. Das Eluat wurde durch Ultrafiltration mit einer MWCO-Säule von Millipore (Schwalbach) durch Zentrifugation bei 4000 rpm auf ein Volumen von ungefähr 1 ml eingeengt. Anschließend wurde die Proteinkonzentration des Rohextraktes bestimmt (siehe Abschnitt 2.6.2).

2.6.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

10 µl Proteinlösung wurden nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976) mit 1 ml Bradford Reagenz (0,065 % (w/v) Coomassie G-250 in 5 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Phosphorsäure) versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Die Extinktion wurde bei 595 nm gegen einen entsprechenden Leerwert im Spektralphotometer gemessen. Die Proteinkonzentration wurde durch Vergleich mit einer BSA-Eichkurve ermittelt.

2.6.3. Enzymaktivitätstests der UGT 84A1-4

Proteinrohextrakte (siehe Abschnitt 2.6.1. Protein-Isolierung) konnten auf UGT-Aktivität getestet werden. Dazu wurden 60-80 µg Gesamtprotein in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 6,0) mit 4 mM UDP-Glucose und 2 mM Zimt-, Kaffee-, Cumar-, Ferula- oder Sinapinsäure bei 30 °C für 1 h bei leichtem Schütteln im Thermomixer inkubiert. Die Reaktion wurde mit 10 µl 100 % TFA (Trifluoressigsäure) abgestoppt. Danach wurden die Proben 15 min bei 14.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand mittels HPLC analysiert. Es wurden je zwei Negativkontrollen durchgeführt. Zum einen wurde statt den Substraten Wasser verwendet. Zum anderen wurde statt der Proteinlösung Wasser verwendet. Dadurch konnten Verunreinigungen ausgeschlossen werden. Beide Kontrollen ergaben in allen Experimenten kein entsprechendes Produkt.

Zur HPLC-Analyse wurde ein System der Firma Waters (Eschborn) verwendet. Die Chromatographie erfolgte an einer 5 µm Nucleosil C18-Säule (250 mm x 4 mm) der Firma Macherey-Nagel (Düren). Die Flussrate betrug 1 ml min⁻¹. Die Detektion der Substanzen

erfolgte bei einer Wellenlänge von 330 nm; die HCA-Ester wurden mit Hilfe einer Eichkurve von Sinapoylglucose quantifiziert. Die HPLC-Analyse erfolgte mit dem in Tabelle 2.8 gezeigten linearen Gradienten:

Tabelle 2.8: Gradient der HPLC für die Analyse der HCA-Ester. Lösung A: (1,5 % (v/v) Phosphorsäure in Wasser); Lösung B: Acetonitril

Zeit in min	Lösung A [%]	Lösung B [%]
0	90,0	10,0
15	60,0	40,0
20	30,0	70,0
21	0,0	90,0
22	90,0	10,0
32	90,0	10,0

2.7. Quantifizierung der pflanzlichen Metabolite

2.7.1. Sinapatester

Samen, Keimlinge und Rosettenblätter (100 mg) von *Arabidopsis thaliana* wurden mit Hilfe eines Glashomogenizers in 80 % Methanol aufgeschlossen. Die Proben wurden bei 13.000 rpm für 5 min abzentrifugiert. 50 µl des Überstandes konnten mittels HPLC analysiert werden. Die HPLC-Analyse erfolgte wie in Abschnitt 2.6.3 beschrieben. Es wurde aber ein anderer Gradient verwendet, der in Tabelle 2.9 aufgeführt ist.

Tabelle 2.9: Gradient zur Quantifizierung der in Methanol löslichen Metabolite; Lösung A: (1,5 % (v/v) Phosphorsäure in Wasser); Lösung B: Acetonitril

Zeit in min	Lösung A [%]	Lösung B [%]
0	90	10
40	60	40
41	10	90
45	10	90
46	90	10
56	90	10

Die Detektion der Sinapatester erfolgte bei einer Wellenlänge von 330 nm. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe einer Eichkurve von Sinapoylglucose.

2.7.2. Flavonoide

Die Quantifizierung von verschiedenen Flavonoiden erfolgte wie in Abschnitt 2.7.1. beschrieben. Allerdings wurden die Substanzen bei einer Wellenlänge von 350 nm detektiert. Zur Kalkulation der Flavonoid-Gehalte wurde eine Eichkurve mit einer Verdünnungsreihe von Rutin (Quercetin-3-*O*-rhamnoglucosid) erstellt. Eine vorläufige Differenzierung von Kaempferol- und Quercetin-Derivaten war aufgrund von UV-Spektren möglich. In methanolischen Lösungen hat das UV-Spektrum von 3-*O*-substituierten Quercetin-Derivaten ein erstes Absorptionsmaximum bei etwa 255 nm, mit einer charakteristischen Schulter bei etwa 269 nm. Diese Schulter tritt bei Kaempferol-Derivaten mit einem Absorptionsmaximum bei ca. 266 nm nicht auf (Markham, 1989).

2.7.3. Zellwand-gebundene HCAs

Die Isolierung von Zellwänden wurde nach einem leicht modifizierten Protokoll von Tan et al. (2004) durchgeführt. Dazu wurden 500 mg Blattmaterial in 80% Methanol mit Hilfe des Glashomogenizers aufgeschlossen und anschließend bei 14.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das entstandene Pellet wurde mit je 2 ml folgender Lösungen gewaschen: 1. Methanol, 2. Wasser, 3. 1 N NaCl, 4. Wasser, 5. Methanol, 6. Aceton, 7. Hexan. Nach jedem Waschschrift erfolgte eine Zentrifugation von 1 Minute bei 14.000 rpm. Danach wurde das Pellet in einer Speed Vac (Eppendorf, Hamburg) getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde gewogen. Meistens lag das Gewicht der Pellets zwischen 20 und 30 mg. Das Pellet wurde in 0,5 ml 1 N NaOH gelöst und bei 80 °C im Thermomixer über Nacht inkubiert. Die Proben wurden mit Aluminiumfolie abgedeckt. Danach wurden die Proben mit ca. 65 µl konzentrierter Salzsäure auf einen sauren pH gebracht. Anschließend wurden die Proben zweimal mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Abschließend wurden die Proben in der Speed Vac eingeeengt und das entstandene Pellet in 20 µl 80 % (v/v) Methanol gelöst. Die Proben wurden mit Hilfe der HPLC analysiert. Tabelle 2.10 zeigt den verwendeten Gradienten. Die Flussrate betrug 1 ml min⁻¹. Die HCAs wurden bei einer Wellenlänge von 330 nm detektiert und durch Vergleich mit einer Eichkurve von Sinapinsäure quantifiziert.

Tabelle 2.10: Gradient der HPLC bei der Zellwand-Analyse; Lösung A: 0,1% TFA in Wasser; Lösung B: 0,1 % TFA, 1,9 % Wasser, 98 % Acetonitril

Zeit in min	Lösung A [%]	Lösung B [%]
0 und 47-60	100	0
3	94	6
40	76	24
44	37	63
45-47	0	100

2.8. LC-MS-Analyse der Samen

Für diesen Versuch wurden Pflanzen der Überexpressionslinien UGT 84A1, A2, A3 und A4, sowie der KO-Linien *UGT 84A1 KO*, *UGT 84A2 KO*, *UGT 84A3 KO* und *UGT 84A4 KO* auf selektiven Medien angezogen und mit Hilfe von PCR-Analysen genetisch überprüft (siehe Abschnitt 2.3.11). Die Überexpressionslinien wurden mit Hilfe von semi-quantitativen RT-PCR-Analysen auf verstärkte Genexpression der entsprechenden UGT hin analysiert. Für jede Linie wurden von drei positiv getesteten Pflanzen die Samen geerntet und für die LC-MS-Analysen verwendet. Von jeder Probe wurden zudem zwei technische Replikate untersucht.

Etwa 20 mg Samen wurden in 1 ml 80% Methanol (v/v) mit Hilfe von Zirkonium-Kugeln (1 mm im Durchmesser) im Bead Beater für 1 min homogenisiert. Nach Zentrifugation bei 11.000 x g für 10 Minuten wurden 700 µl des Überstandes in der Speed Vac bei Umgebungstemperatur bis zur Trockenheit evaporiert. Das zurückgebliebene Pellet wurde in 70 µl 80% Methanol (v/v) durch starkes Schütteln gelöst und mit 630 µl Wasser verdünnt. Für die LC-MS-Analysen wurden die Extrakte mit einem 0,45 µm PTFE Spritzenfilter (Whatman) gefiltert. Ein µl der Extrakte wurden durch ein Kapillar-LC-System (Ultimate, Dionex) aufgetrennt. Das LC-System war mit einem Autosampler (Famos, Dionex) und einer modifizierten C₁₈ Säule (GROMSIL ODS 4HE, 150 x 0,3 mm, Partikelgröße 3 µm, Porengröße 12 nm, Säule 10 x 0,3 mm, Alltech Grom GmbH) ausgestattet. Der folgende Gradient wurde für die Analysen verwendet:

0-5 min: isokratisch: 95% A [Wasser / Ameisensäure, 99,9 / 0,1 (v/v)] und
5% B [Acetonitril /Ameisensäure 99,9 / 0,1 (v/v)]

5-55 min: linear von 5 zu 55% B

55-65 min: isokratisch: 95% B

65-75 min: isokratisch: 5% B

Die Flussrate betrug 5 µl min⁻¹. Eluierte Komponenten wurden durch ein API QSTAR Pulsar Hybrid QqTOF-MS (Applied Biosystems / MDS Sciex) im positiven Ionenmodus detektiert, das mit einer Ion-Spray-Quelle ausgerüstet war. Typische Instrument Einstellungen waren: Ion-Spray Voltage 5,5 kV, DP1 50V, DP2 15V, FP 220 V, Nebulizer-Gas (Stickstoff) 25 Einheiten, Curtain-Gas (Stickstoff) 20 Einheiten, Kollisions-Gas (Stickstoff) 4 Einheiten, Pulsfrequenz 9,986 kHz. Die Rohdaten wurden mit Hilfe des Analyst QS File Translator Utility in das netCDF Format konvertiert und mit dem XCMS Software-Paket prozessiert (<http://metlin.scripps.edu/download/>). Die erhaltene Datenmatrix wurde in Excel (Microsoft) importiert. Dort wurden die Daten weiterverarbeitet und einer statistischen Untersuchung unterzogen.

2.9. Histochemischer Nachweis der β -Glucuronidase-Aktivität

Zum histochemischen Nachweis der β -Glucuronidaseaktivität (GUS) wurden die zu untersuchenden Pflanzenteile nach kurzer Vakuuminfiltration 20 h bei 37 °C in Reaktionspuffer (100 mM NaH₂PO₄, pH 7,0; 10 mM EDTA, pH 7,0; 0,5 mM Ferricyanid; 0,5 mM Ferrocyanid; 2 mM X-Gluc; 0,1% (v/v) Triton X-100) inkubiert. Anschließend wurden die Proben zum Entfärben mehrmals mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Die Präparate wurden unter einem Stereomikroskop Stemi 2000-C (Zeiss) analysiert und mit einer FUJIX Digital Camera HC-300Z fotografiert.

2.10. UV-B-Stress-Applikation von *Arabidopsis thaliana* und *Brassica napus*

Pflanzen von *Arabidopsis thaliana* und *Brassica napus* wurden am GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit in München in speziellen Versuchskammern der Abteilung „Experimentelle Umweltsimulation“ erhöhter UV-B-Strahlung ausgesetzt. Abbildung 2.12 zeigt den schematischen Aufbau und Fotos der benutzten Kammer. Diese sogenannten Sonnensimulatoren hatten eine Versuchsraumgröße von ca. 1,4 m Breite und Tiefe sowie ca. 1 m Höhe (unterer Teil des Simulators in Abbildung 2.12). Durch Kombination verschiedener Lampen (Metallhalogenidlampen, Halogenlampen und blaue Leuchtstofflampen) wird ein Spektrum erzeugt, das die natürliche Sonnenstrahlung vom ultravioletten (UV) bis zum infraroten (IR) Spektralbereich reproduziert.

Überschüssige Infrarot- oder Wärmestrahlung wird mittels eines darunter platzierten ungefähr 3 cm starken Wasserfilters beseitigt. Fehlende Strahlung im UV-Spektrum wird durch zusätzliche UV-B-Leuchtstofflampen ergänzt. Entsprechend der stratosphärischen Ozonschicht wird überschüssige UV-Strahlung durch Verwendung von geeigneten Glas- oder Kunststofffiltern reduziert bzw. eliminiert. Durch unterschiedliche Kombination oder Dicke der Filter lässt sich der Anteil an UV-Strahlung steuern, so dass verschiedene Ozonschichtdicken simuliert werden können (Döhring et al., 1996; Thiel et al., 1996). Neben Licht und Strahlung können auch andere Umweltparameter wie Temperatur und Feuchte angepasst werden.

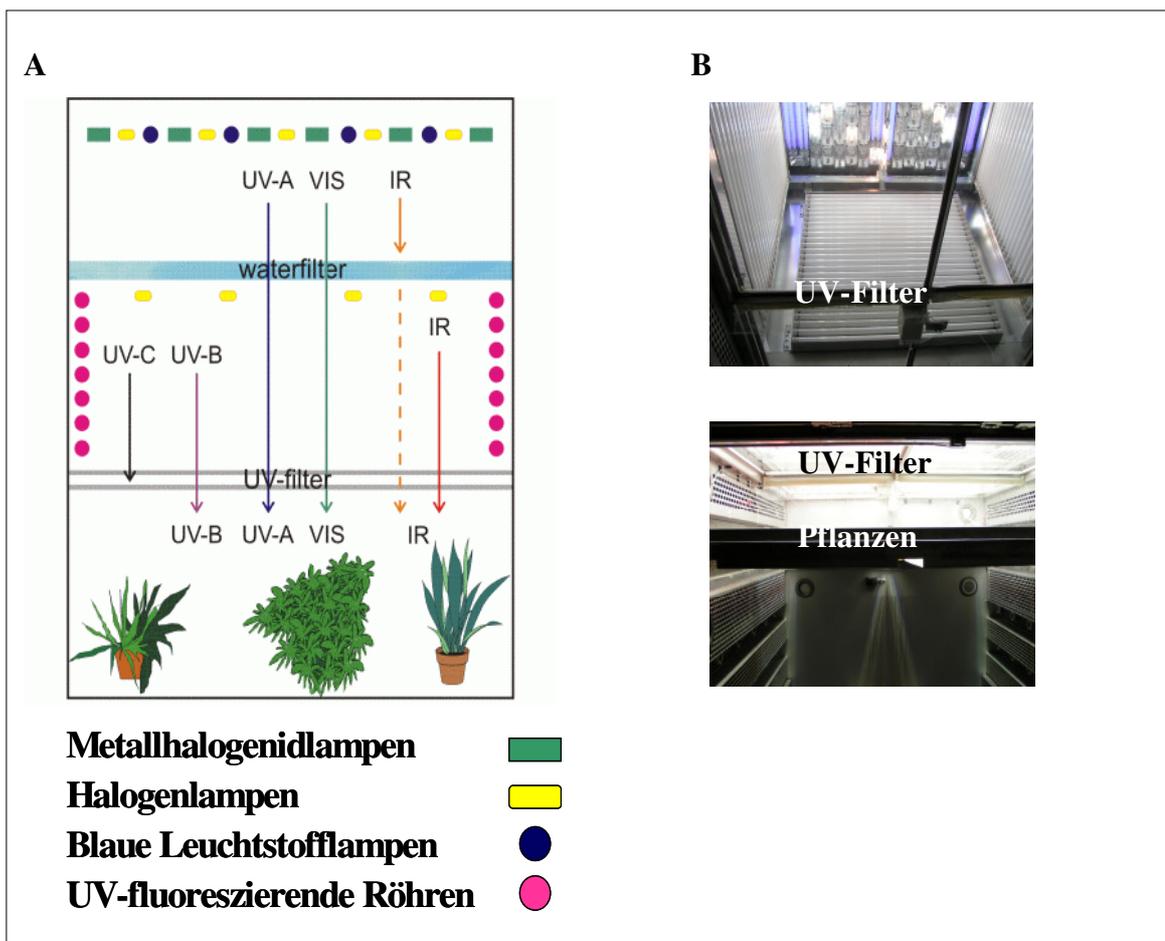


Abbildung 2.12: Schematischer Aufbau des Sonnensimulators (A). Als UV-Filter können verschiedene Gläser wie z.B. Borsilikat- und Kalziumoxidglassfilter verwendet werden. In Abbildung (B) sind Fotos des Sonnensimulators gezeigt.

Die Pflanzen wurden bei einer Temperatur von 24 °C und einer relativen Luftfeuchte von 70% angezogen. Die Lichtintensität wurde im Verlauf der drei Experimente (V693, V695, V701) nach einer mehrtägigen Akklimatisierungsphase ohne UV-Behandlung nach und nach erhöht, bis die Intensität während der Behandlung von ca. 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erreicht wurden. Im letzten Experiment (V701) fand die Akklimatisierungsphase der Pflanzen allerdings in einer separaten Kammer bei ca. 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ statt. Der genaue Ablauf ist dem Anhang zu entnehmen (V693, V695 und V701).

Die UV-B-Bestrahlung pro Tag dauerte 12 h (V963) bzw. 14 h (V695 und V701). Kontrollpflanzen wurden gleichzeitig in den Sonnensimulatoren unter exakt gleichen Bedingungen kultiviert. Sie befanden sich unter Fensterglasfiltern (8 mm dick), die die UV-B-Strahlung weitgehend komplett absorbierten (siehe V693, V695 und V701 im Anhang). Der erste Erntezeitpunkt war bei allen drei Experimenten nach der Akklimatisierungsphase. Tabelle 2.11 gibt die Erntezeitpunkte der verschiedenen Experimente wieder:

Tabelle 2.11: Erntezeitpunkte von *Arabidopsis thaliana* und *Brassica napus* bei den verschiedenen Experimente zur UV-B-Stress-Adaptation

Versuch	Erntezeitpunkt	Alter Arabidopsis/ Brassica in Wochen	UV-B Bestrahlung bis zur Ernte
V693	0	3 / 1	0 h
	1	3 / 1	10 h
	2	3 / 1	33 h
V695	0	3 / 1	0 h
	1	3 / 1	10 h
	2	4 / 2	6 d
V701	1	1 / 1	10 h

Tabelle 2.12 gibt die Strahlungswerte (sichtbares Licht und UV-Strahlung in Pflanzenhöhe) für die Versuche V693, V695 und V701 in den Zonen der behandelten Pflanzen wieder. Unbehandelte Pflanzen (= Kontrolle) wurden ohne UV-B bestrahlt. Die Standardabweichung bezieht sich auf die räumliche Variabilität in den Versuchskammern.

Tabelle 2.12: Strahlungswerte für die Versuche V693, V695 und V701 in den Zonen der behandelten Pflanzen

Strahlungsart	Strahlungswerte	Standardabweichung
PAR ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	496	28
UV-A (W m^{-2})	10,5	2,2
UV-B (W m^{-2})	1,25	0,10
UV-B _{BE} (mW m^{-2})	397	41
Daily PAR ($\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1}$)	28,6	-
Daily UV-A ($\text{kJ m}^{-2} \text{d}^{-1}$)	605	-
Daily UV-B ($\text{kJ m}^{-2} \text{d}^{-1}$)	63	-
Daily UV-B _{BE} ($\text{kJ m}^{-2} \text{d}^{-1}$)	20	-

Zur Berechnung der Tagesdosis ist für UV-B-Strahlung eine Exposition von 14 Stunden, für UV-A-Strahlung und sichtbares Licht von 16 Stunden berücksichtigt. Die sogenannte biologisch effektive UV-B-Strahlung UV-B_{BE} errechnet sich nach dem generalisierten Wirkungsspektrum (Caldwell, 1971). PAR ist die photosynthetisch aktive Strahlung zwischen 400 und 700 nm, UV-A-Strahlung zwischen 315 und 400 nm und UV-B-Strahlung zwischen 280 und 315 nm. In Abbildung 2.13 sind die Spektren der Behandlung und Kontrolle gezeigt.

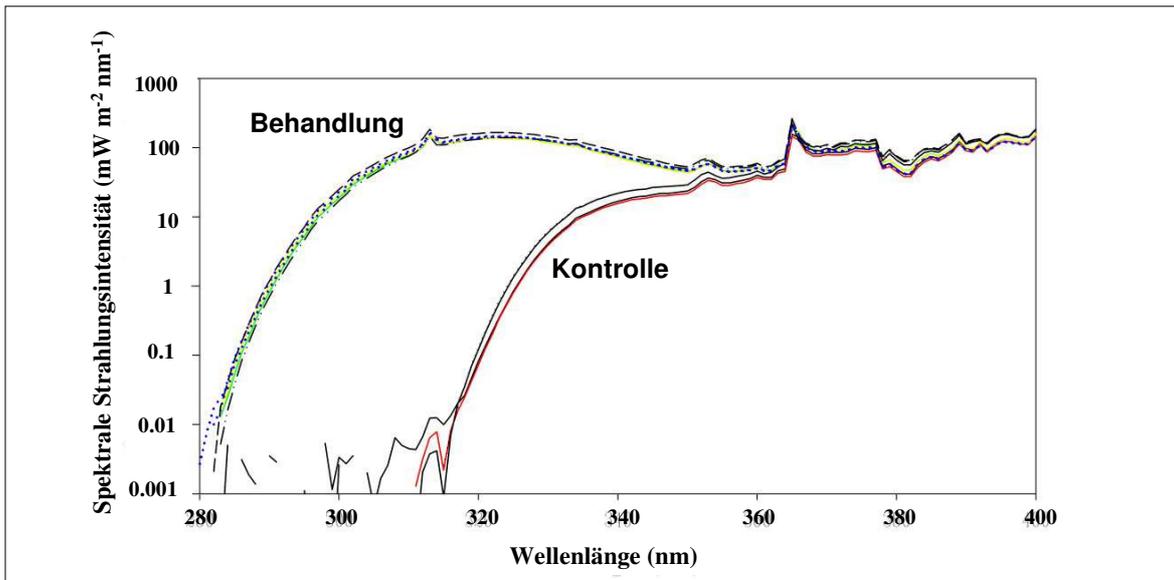


Abbildung 2.13: Die biologisch effektive UV-B-Strahlung $UV-B_{BE}$ errechnet sich nach dem generalisierten Wirkungsspektrum nach (Caldwell, 1971). Gezeigt sind die Spektren der Behandlung und der Kontrolle.

2.11. Datenbankanalysen

DNA-Sequenzen konnten mit Hilfe von NCBI und TAIR verglichen werden. Mit Hilfe von TAIR konnten Primer für die putativen Promotorsequenzen generiert werden. Expressionsanalysen konnten mit Hilfe der Datenbank Genevestigator durchgeführt werden. Im folgendem sind die entsprechenden Internetadressen aufgeführt:

TAIR: <http://www.arabidopsis.org/>
 NCBI: <http://www.ncbi.nih.gov/>
 Genevestigator: <http://www.genevestigator.ethz.ch/>

2.12. Statistische Auswertung

Alle Mittelwerte und Standardabweichungen der Messreihen wurden mit Hilfe von Microsoft Excel berechnet. Konnten Unterschiede zwischen zwei Messreihen beobachtet werden, wurde der „Zweistichproben-t-Test Gleicher Varianzen“ mit Hilfe des Programms Microsoft Excel durchgeführt. Damit konnte überprüft werden, ob die Unterschiede statistisch signifikant waren. Als hypothetische Differenz der Mittelwerte wurde 0 angenommen. Die Irrtumswahrscheinlichkeit betrug 5 % (Signifikanzniveau $\alpha=0,05$). Ist der errechnete p-Wert der Analyse kleiner als das festgelegte Signifikanzniveau von 0,05 liegt statistische Signifikanz vor.

3. Ergebnisse

3.1. Die Glucosyltransferasen UGT 84A1-A4 im HCA-Stoffwechsel

Zu Beginn der Arbeit wurden die Genexpression, die Enzymaktivität, die Promotoraktivität der vier UGTs und die Metaboliten im Wildtyp (Col.) untersucht. Dadurch sollte ein Bild über die zeitliche und organspezifische Aktivität der vier UGTs erhalten werden.

3.1.1. Analyse der Genexpression

Zunächst wurden mit Hilfe der Datenbank Genevestigator Expressionsprofile der einzelnen UGT-Gene aus Array-Daten erstellt. Dadurch konnte ein Überblick gewonnen werden, in welchen Geweben ein Gen besonders stark exprimiert wird. Solche Gewebe wurden anschließend noch genauer analysiert. Die Micro-Array-Daten aus dem Genevestigator¹ mit entsprechenden Standardabweichungen stammen aus dem Kapitel „Gene Atlas“. Die Anzahl der verwendeten Chips variierte zwischen den einzelnen Geweben zwischen 3 und 710.

In Abbildung 3.1 sind die Expressionsdaten der *UGT 84A1-4* von Genevestigator dargestellt. Demnach werden die Gene der *UGT 84A1* und *A4* in allen Geweben relativ schwach transkribiert. Die beiden anderen Glucosyltransferasen sind im Vergleich dazu in einigen Geweben stärker exprimiert. Die *UGT 84A2* weist die stärkste Expression in Samen auf. Die *UGT 84A3* erreicht die höchsten Transkriptmengen in den Sepalen und in den Schoten nach der Datenbank von Genevestigator. In Keimlingen und Blättern werden die *UGT 84A2* und *A3* ebenfalls relativ gut exprimiert.

In Samen und Keimlingen akkumuliert Sinapoylglucose (Milkowski et al., 20004) und in Blättern das Folgeprodukt Sinapoylmalat. Daher wurden Samen, Keimlinge und Rosettenblätter einer Transkriptionsanalyse mit Hilfe der RT qPCR unterzogen (siehe Abbildung 3.2).

¹ im Internet unter <https://www.genevestigator.ethz.ch>

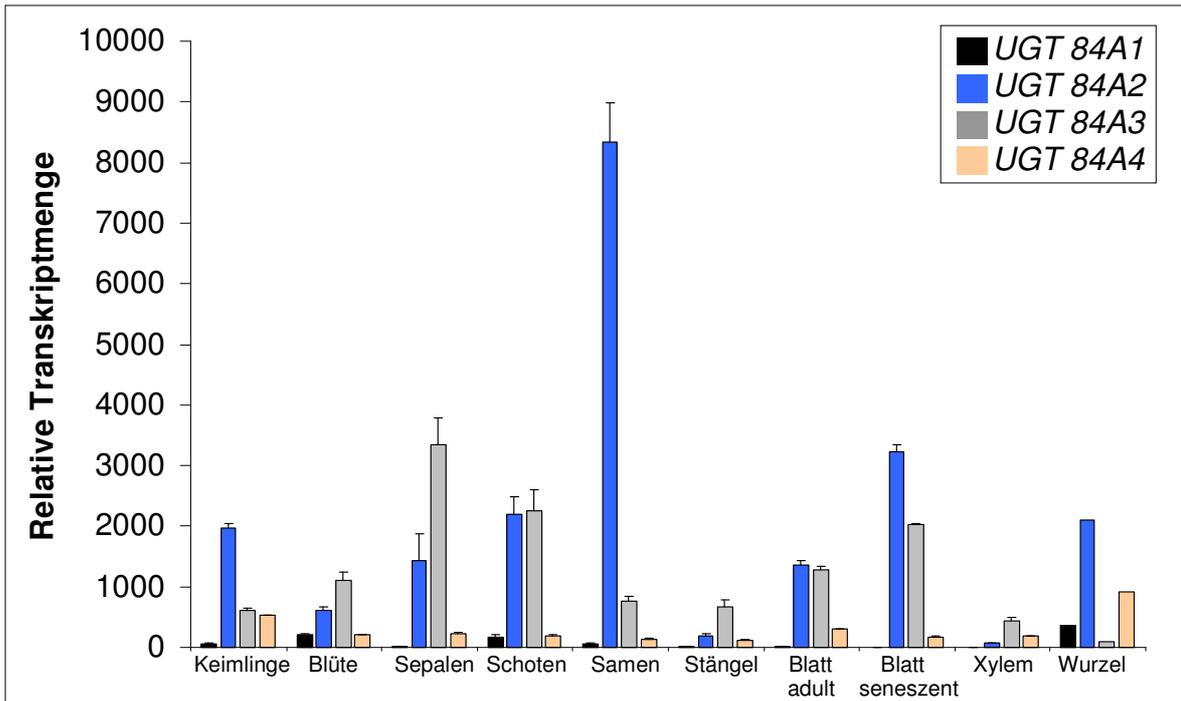


Abbildung 3.1: Transkript-Analyse der *UGT 84A1-4* in *Arabidopsis*. Gezeigt sind die Expressionsdaten von verschiedenen Geweben der Datenbank Genevestigator (Array-Typ: ATH1: 22k array).

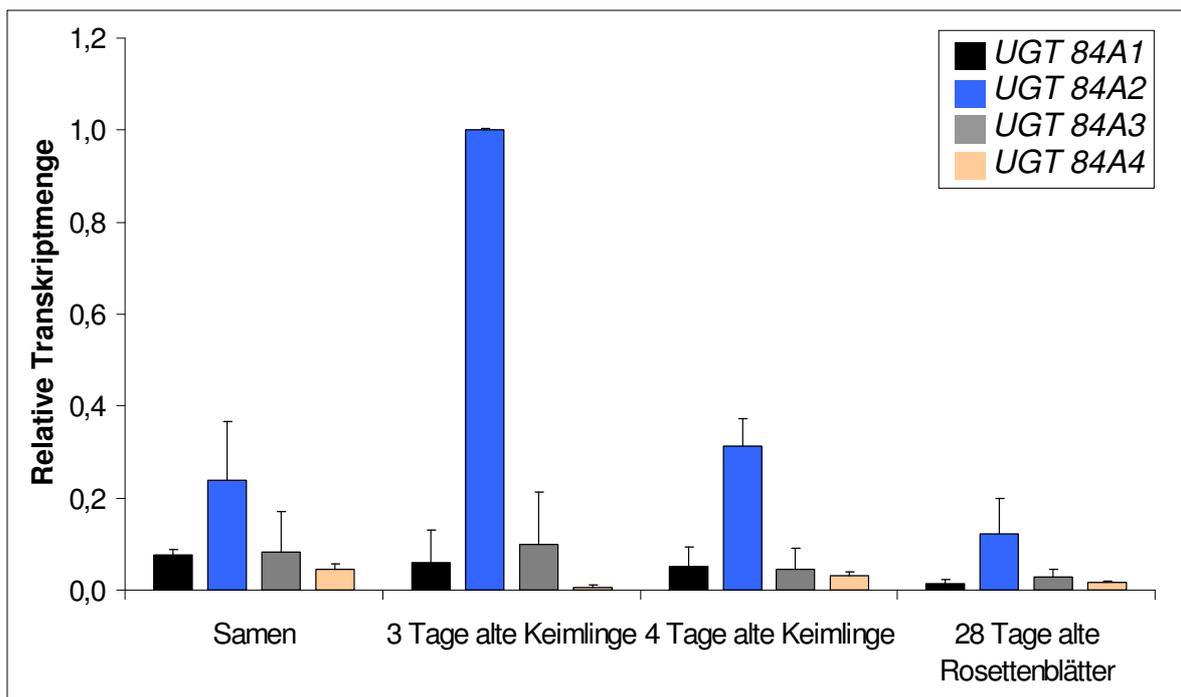


Abbildung 3.2: RT qPCR aus verschiedenen Geweben von *Arabidopsis thaliana*. Es wurden je 3 unabhängige Proben vermessen. Als konstitutives Gen wurde Ubiquitin verwendet. Als Primer wurden die *UGT 84A1-4* 50er Oligonukleotide benutzt.

Wie in Abbildung 3.2 zu sehen ist, werden auch hier die *UGT 84A1* und *A4* am schwächsten exprimiert. In Samen und Keimlingen ist die Genexpression dieser beiden Gene aber stärker als in Blättern, wo sie kaum mehr zu detektieren ist. Die *UGT 84A2* weist die höchste Transkriptmenge in drei Tage alten Keimlingen auf. Danach nimmt sie wieder deutlich ab. Das Gen der *UGT 84A2* ist aber auch noch im Blatt der adulten Pflanze

exprimiert. Die Daten von Genevestigator zeigen demgegenüber die höchste Expression der *UGT 84A2* im Samen. Der relativ niedrige Wert in der Datenbank für das Keimlingsstadium ist allerdings dadurch bedingt, dass dieses bis zu einem Alter von sechs Tagen definiert wurde. Die mittels RT qPCR nachgewiesene starke Abnahme der Transkriptmenge von *UGT 84A2* vom dritten Tag der Keimlingsentwicklung an, ist demnach für den geringen Wert der Genevestigator-Datenbank verantwortlich.

In der Datenbank von Genevestigator (siehe Abbildung 3.1) erreicht das *UGT 84A3*-Gen die höchsten Transkriptmengen in den Sepalen und in den Schoten. Die Analysen der RT qPCR ergaben, dass die *UGT 84A3* eine etwas stärkere Expression im Samen und in den Keimlingen im Vergleich zum Rosettenblatt hat. Aber auch dieses Gen ist in allen untersuchten Stadien exprimiert.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass alle vier UGT-Gene in den analysierten Geweben transkribiert werden, wobei *UGT 84A2* das dominant exprimierte Gen ist. Vor allem in drei Tage alten Keimlingen ist die Expression dieses Gens stark erhöht. Die *UGT 84A1* und *UGT 84A4* sind sehr schwach exprimiert, ihre Transkripte sind im Samen leicht erhöht (siehe Abbildung 3.2). Die *UGT 84A3* ist im Samen und den Keimlingen stärker exprimiert als im Rosettenblatt.

3.1.2. Enzymaktivitäten der vier Ester-bildenden Glucosyltransferasen in der Entwicklung von *Arabidopsis thaliana*

Aus verschiedenen pflanzlichen Geweben wurden Proteinrohextrakte hergestellt und mit verschiedenen Hydroxyzimtsäuren und UDP-Glucose inkubiert. Die entstandenen HCA-Ester wurden mit Hilfe der HPLC quantifiziert. Damit sollte überprüft werden, ob die erhöhte Expression der UGTs während der Samen- und Keimlingsentwicklung mit einer verstärkten Enzymaktivität in diesen Entwicklungsstadien korreliert und ob zu bestimmten Zeitpunkten bestimmte Substrate bevorzugt umgesetzt werden.

In-vitro-Analysen von heterolog exprimierten Enzymen haben gezeigt, dass die UGT 84A1, A3 und A4 Cumarsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure und Sinapinsäure mit Glucose verestern können (Milkowski et al., 2000a; Lim et al., 2001), während die UGT 84A2 spezifisch für Sinapinsäure ist. Demzufolge kann mit den hier vorgenommenen Enzymaktivitätstests die Produktion bestimmter HCA-Ester aufgrund der überlappenden Substratspezifitäten der Enzyme UGT 84A1-4 nicht auf die Aktivität einzelner Enzyme zurückgeführt werden. Es sollte aber gezeigt werden, in welchen Entwicklungsstadien von *Arabidopsis* Hydroxyzimtsäuren mit Glucose verestert werden.

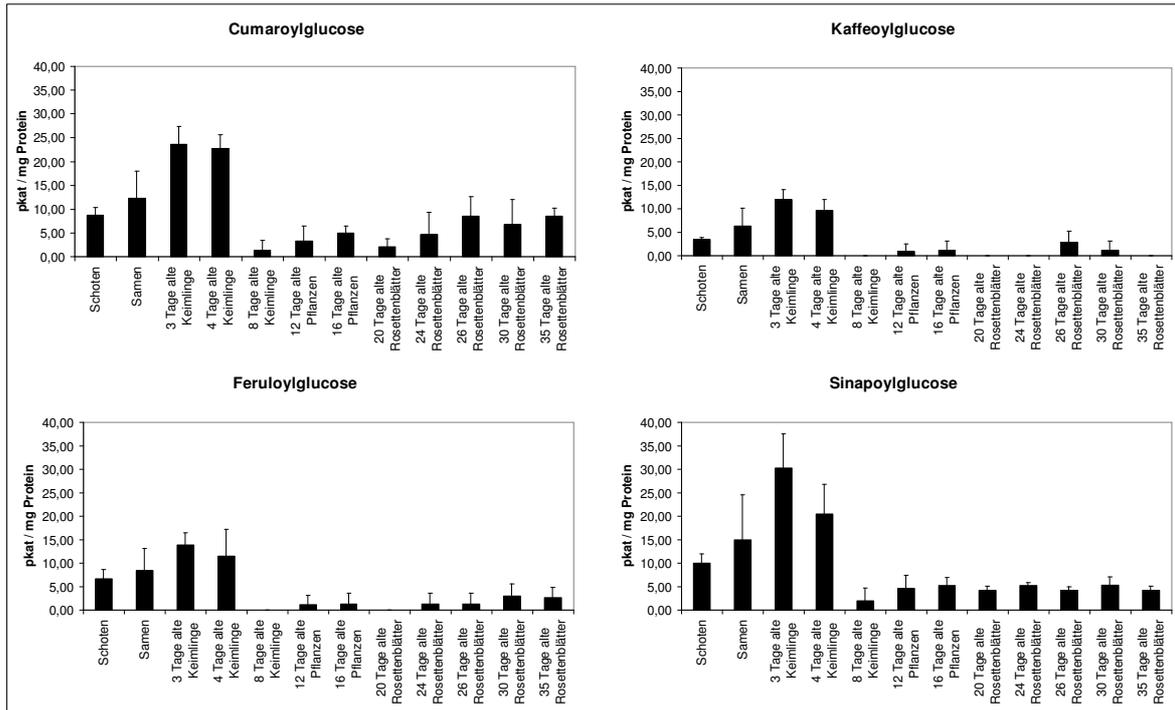


Abbildung 3.3: UGT-Aktivität der Proteinrohextrakte aus verschiedenen Geweben von *Arabidopsis thaliana* mit $n = 3$ unabhängigen Proben. Quantifiziert wurde die Bildung der angegebenen HCA-Glucose-Ester aus den entsprechenden HCAs.

In Abbildung 3.3 sind die UGT-Aktivitäten der Proteinrohextrakte aus verschiedenen Pflanzenorganen anhand der Bildung der HCA-Ester gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass HCA-Ester vor allem in den Schoten, im Samen und in drei bzw. vier Tage alten Keimlingen produziert werden. Ab dem achten Tag nach Aussaat der Samen werden HCA-Ester zwar noch immer synthetisiert, aber auf einem sehr niedrigen Niveau. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der Transkriptionsanalysen (siehe Abschnitt 3.1). Diese haben auch gezeigt, dass die UGT 84A2 am stärksten exprimiert wird. Wahrscheinlich setzt hauptsächlich dieses Enzym Sinapinsäure zum entsprechenden Glucose-Ester um, wobei noch nicht geklärt werden kann, ob hier auch die UGT 84A1, A3 und A4 am Umsatz beteiligt sind. Die *UGT 84A1* und *UGT 84A3* sind im Samen und in den Keimlingsstadien stärker exprimiert als in den Blättern (siehe Abbildung 3.1 und 3.2). Dies könnte die erhöhte Bildung an Cumaroylglucose, Kaffeoylglucose und Feruloylglucose in der Samen- und frühen Keimlingsentwicklung im Vergleich zu älteren Keimlingen (ab 8. Tag) bzw. adulten Blättern erklären. Inwieweit die in diesen Stadien sehr schwach exprimierte UGT 84A4 eine Rolle spielt, müssen Experimente zeigen, in denen die Genexpression dieser Glucosyltransferase moduliert wird (siehe Abschnitt 3.3 und 3.4).

3.1.3. Die löslichen HCA-Metabolite

Nachdem sowohl die Expressionsdaten, als auch die UGT-Aktivitäten zeigten, dass die Veresterung von Hydroxyzimtsäuren mit UDP-Glucose verstärkt während der Samen- und Keimlingsentwicklung stattfindet, erfolgte die Analyse der in Methanol löslichen Metaboliten in diesen Entwicklungsstadien.

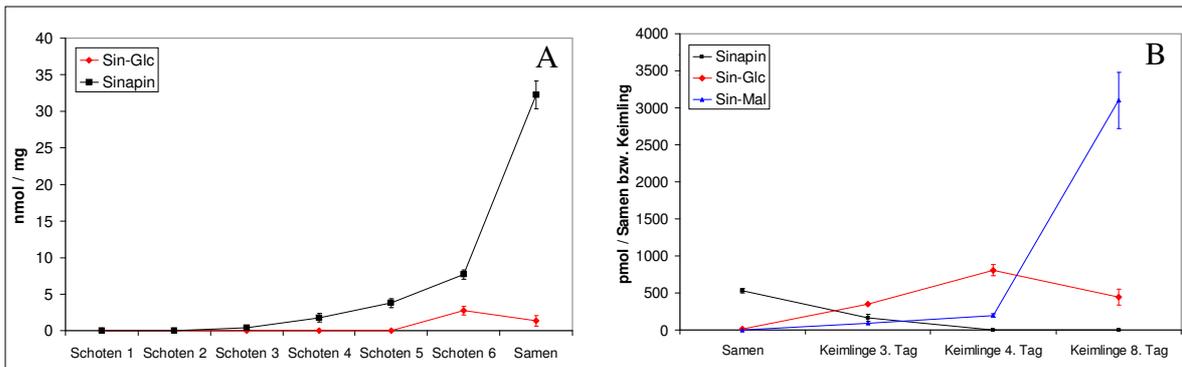


Abbildung 3.4: HPLC-Analysen der löslichen HCA-Metaboliten von *Arabidopsis thaliana*. (A) zeigt den Sinapin- und Sinapoylglucose-Gehalt von Schoten [Schoten 1 wurden 30 Tage, Schoten 2 35 Tage, Schoten 3 37 Tage, Schoten 4 39 Tage, Schoten 5 42 Tage und Schoten 6 45 Tage nach der Aussaat geerntet], Samen und Keimlingen. (B) Sinapin-, Sinapoylglucose- und Sinapoylmalat-Gehalt von Samen und Keimlingen. Es wurden $n = 3$ Proben für jeden Datenpunkt vermessen. Sin-Glc=Sinapoylglucose; Sin-Mal= Sinapoylmalat.

Sinapin wird während der Samenentwicklung gebildet und akkumuliert im reifen Samen [Abbildung 3.4 (A)]. Während der Keimlingsentwicklung wird Sinapin von einer Esterase zu Sinapinsäure und Cholin abgebaut (Nurmann und Strack, 1979; Strack, 1980).

Sinapoylglucose ist zwar im Samen vorhanden, aber in vier Tage alten Keimlingen ist der Gehalt am höchsten. Danach nimmt der Gehalt an Sinapoylglucose wieder ab. In älteren Rosettenblättern ist keine Sinapoylglucose mehr zu detektieren (nicht gezeigt). Nur in einzelnen Messungen konnten Gehalte in adulten Blättern von bis zu maximal 20 pmol/mg Frischgewicht festgestellt werden. Dies hängt sicher damit zusammen, dass Sinapoylglucose ein typisches Intermediat ist und schnell umgesetzt wird. Die Ergebnisse dieser Analysen passen sehr gut zu den Ergebnissen der Transkriptionsanalysen und der Enzymaktivitätstests aus den vorherigen Abschnitten. Das weist darauf hin, dass der Sinapatester-Stoffwechsel auf transkriptionaler Ebene reguliert wird.

Die Transkription ist in drei Tage alten Keimlingen am stärksten und auch der *in-vitro*-Umsatz von Sinapinsäure und UDP-Glucose zu Sinapoylglucose ist am höchsten, wenn Proteinrohextrakte aus drei Tage alten Keimlingen verwendet werden. Es kommt zur Akkumulation von Sinapoylglucose vor allem in vier Tage alten Keimlingen. Doch schon bei vier Tage alten Keimlingen nimmt die Transkription der *UGT 84A2* wieder ab (siehe Abbildung 3.2: RT qPCR) und dadurch sinkt auch wieder der Sinapoylglucose-Gehalt in älteren Keimlingsstadien. Zudem wird etwa zu diesem Zeitpunkt die Synthese von

Sinapoylmalat hochreguliert, weshalb möglicherweise weniger Sinapoylglucose akkumuliert, da es direkt umgesetzt wird. In Rosettenblättern ist die Transkription der *UGT 84A2* auf einem relativ niedrigen Niveau und dementsprechend ist kaum Sinapoylglucose zu detektieren.

Sinapoylmalat ist vor allem in Rosettenblättern zu finden. Der Gehalt von etwa 1200 pmol/mg Frischgewicht ändert sich hier kaum noch. In Samen und Schoten konnte kein Sinapoylmalat detektiert werden. Erst in Keimlingen beginnt die Akkumulation von Sinapoylmalat. Bei acht Tage alten Keimlingen waren neben den Keimblättern auch Primärblätter vorhanden. In den Primärblättern entsteht die *de novo*-Synthese von Sinapoylmalat (Brandl et al., 1984; Nielsen et al., 1984), was einen deutlichen Anstieg von Sinapoylmalat zur Folge hat [Abbildung 3.4 (B)].

Es konnte mit diesen HPLC-Analysen gezeigt werden, dass in den löslichen methanolischen Gewebeextrakten vor allem Sinapin, Sinapoylglucose und Sinapoylmalat zu finden waren (Analyse nur auf Hydroxyzimtsäure-Konjugate bezogen). Wahrscheinlich geht die Produktion des wichtigen Zwischenprodukts Sinapoylglucose vor allem auf die Aktivität der *UGT 84A2* zurück. Inwieweit die anderen drei Glucosyltransferasen einen Ausfall der *UGT 84A2* kompensieren können, soll die Analyse von Überexpressions- und Suppressionslinien zeigen (siehe Abschnitt 3.3 und 3.4). Interessanterweise konnten mit den HPLC-Analysen in den löslichen Extrakten keine Konjugate von Cumar-, Kaffee- oder Ferulasäure detektiert werden, obwohl die Analyse der Enzymaktivität einen erhöhten Umsatz dieser Säuren zu Glucose-Estern in der Samen- und Keimlingsentwicklung gezeigt hatten (siehe Abbildung 3.3). Möglicherweise werden die Konjugate dieser Säuren für den Einbau in die Zellwände verwendet. Oder die freien Säuren sind in diesen Stadien in der Pflanze nicht verfügbar. Deshalb wurde auch eine Analyse der unlöslichen methanolischen Rückstände vorgenommen, deren Ergebnisse im folgenden Kapitel beschrieben werden.

3.1.4. Die Zellwand-gebundenen Metabolite

Aus den in Methanol unlöslichen Fraktionen des Pflanzenmaterials konnten durch alkalische Hydrolyse ebenfalls Hydroxyzimtsäuren freigesetzt werden. Die Abbildung 3.5 (A) zeigt das Chromatogramm einer Zellwand-Analyse. Dabei konnten durch Vergleiche mit den Spektren von Standardsubstanzen und deren Retentionszeiten drei Peaks identifiziert und den Hydroxyzimtsäuren Cumarsäure (Peak 1), Ferulasäure (Peak 2) und Sinapinsäure (Peak 3) zugeordnet werden. Die quantitative Auswertung der HPLC-Daten ist in Abbildung 3.5 (B) zu sehen.

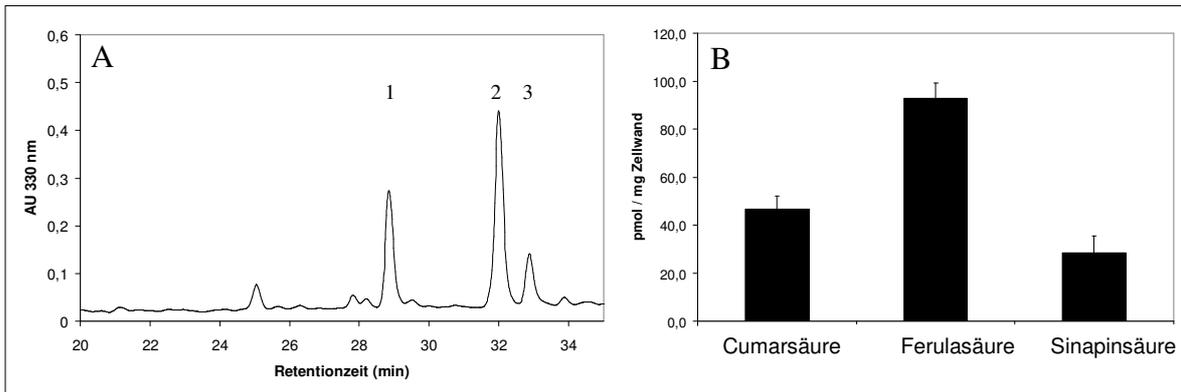


Abbildung 3.5: Gehalt an Hydroxycimtsäuren in Zellwänden von Rosettenblättern (aus 500 mg Frischgewicht) von *Arabidopsis thaliana*. (A) Chromatogramm der HPLC-Analyse: Peak 1 = Cumarsäure; Peak 2 = Ferulasäure; Peak 3 = Sinapinsäure. (B) zeigt die quantitative Auswertung mit n=3 Proben. Die Identifizierung der Peaks erfolgte mit Hilfe von Standardsubstanzen.

Ferulasäure weist demnach den größten Gehalt unter den Hydroxycimtsäuren auf, gefolgt von Cumarsäure und Sinapinsäure. In Rosettenblättern konnte UGT-Aktivität gegenüber Cumar-, Ferula- und Sinapinsäure nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.3). In der löslichen Metabolitenfraktion waren aber keine Konjugate der Cumar- oder Ferulasäure zu detektieren. Dagegen konnte mit dieser Analyse gezeigt werden, dass HCAs in die Zellwände von *Arabidopsis* eingebaut werden können, wobei der Mechanismus dieses Einbaus noch nicht bekannt ist.

3.1.5. Die Promotoraktivitäten von UGT 84A1-4

Promotoren sind Sequenzabschnitte im Genom, an denen die Transkription eines Gens initiiert wird. Durch Fusion von Promotoren mit Reportergenen, deren Expression leicht zu quantifizieren ist, kann die Promotoraktivität eines Gens abgeschätzt werden. Als Reportergen wurde das *uidA*-Gen aus *E. coli* verwendet, das die β -Glucuronidase codiert (GUS) und nicht in Pflanzen vorkommt. Dieses Enzym katalysiert die hydrolytische Spaltung von β -Glucuroniden und β -Galakturoniden. Die enzymatische Aktivität kann in den Geweben von Pflanzen durch eine Farbreaktion (Blaufärbung) nachgewiesen werden.

Durch die Analyse der Promotoraktivität der Glucosyltransferasen UGT 84A1-4 sollte gezeigt werden, in welchen Geweben die Transkription besonders aktiviert wird, um Rückschlüsse auf mögliche Funktionen innerhalb der Pflanze zu ziehen.

Ein jeweils 1 kb großer Sequenzabschnitt vor dem Transkriptionsstart der Glucosyltransferasen UGT 84A1-4 wurde in den Vektor pGREEN vor das *uidA*-Gen kloniert. Für die Analyse der Promotoraktivitäten wurden je Konstrukt drei unabhängige T2-Linien in *Arabidopsis thaliana* erzeugt und auf die Aktivität der β -Glucuronidase geprüft.

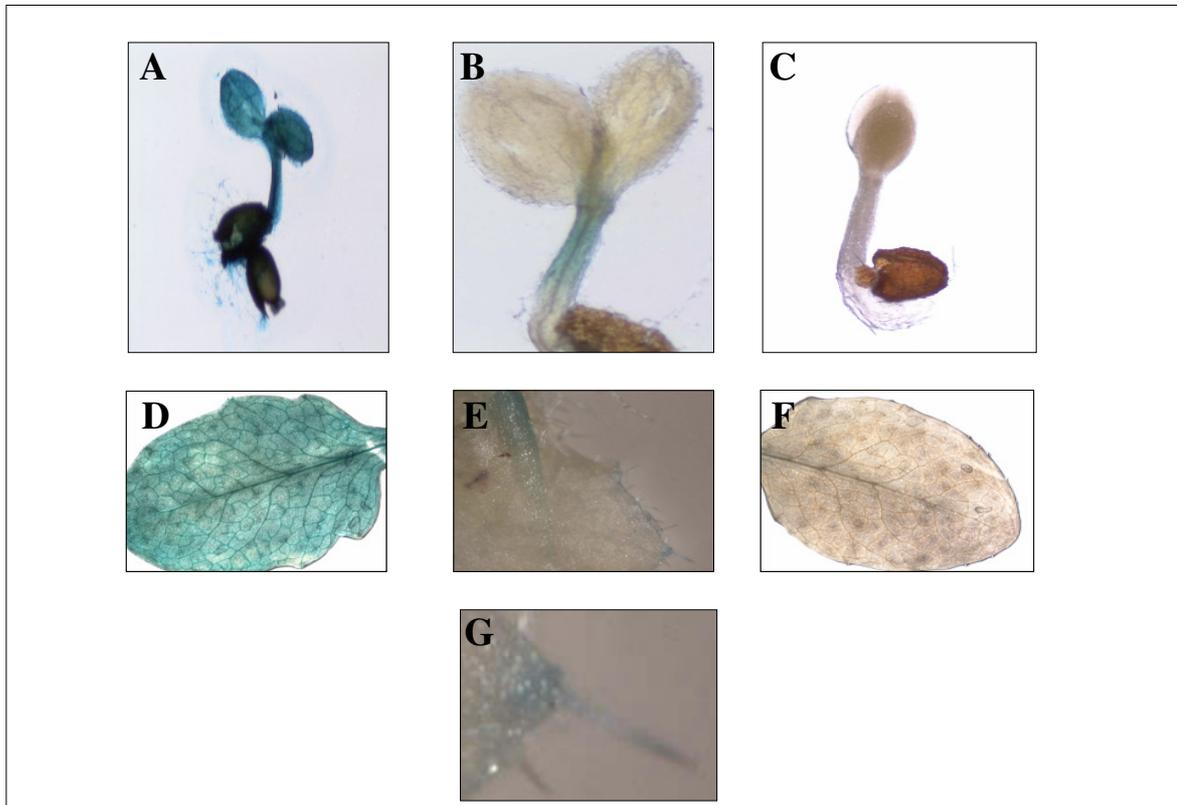


Abbildung 3.6: Analyse der Promotoraktivität durch Nachweis der GUS-Aktivität. Gezeigt sind 3 Tage alte Keimlinge (A-C) von *Arabidopsis thaliana*, Rosettenblätter (D-F) sowie Trichome eines Rosettenblatts (G); (A) und (D) 35S-Promotor-GUS als Positivkontrolle; (B), (E) und (G) UGT 84A2 Promotor-GUS; (C) und (F) untransformierte Pflanzen als Negativkontrollen.

Für den Promotor der *UGT 84A2* konnte GUS-Färbung, und damit Promotoraktivität im Hypokotyl von drei Tage alten Keimlingen [Abbildung 3.6 (B)], im Leitgewebe von Rosettenblättern [Abbildung 3.6 (E)] und in Trichomen von Rosettenblättern [Abbildung 3.6 (G)] nachgewiesen werden. Außerdem wurden Samen, 15 Tage alte Pflanzen mit Wurzeln, die Infloreszenz und Schoten auf Promotoraktivität untersucht. Es konnte aber keine Blaufärbung in diesen Stadien nachgewiesen werden. Für die Konstrukte mit den putativen Promotorsequenzen der *UGT 84A1*, *A3* und *A4* konnten in keinem der untersuchten Stadien (Schoten, Samen, drei Tage alte Keimlinge, 15 Tage alte Pflanzen mit Wurzeln und die Infloreszenz) Promotoraktivität nachgewiesen werden. Die Analysen der Promotoren zeigten nur für die *UGT 84A2* Aktivität. Dieses Gen war auch in den Transkriptions-Analysen am stärksten exprimiert.

3.2. RNAi-Suppression von *UGT 84A1-4*

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit waren keine T-DNA-Insertionsmutanten oder andere Mutanten für die Gene der *UGT 84A1*, *A2*, *A3* und *A4* verfügbar. Daher wurde zunächst ein RNA-Interferenz-Ansatz (RNAi) zur Suppression der Glucosyltransferasen verfolgt. Dabei handelt es sich um die Einführung von Genabschnitten, die doppelsträngige RNA bilden können und so sequenzähnliche mRNA degradieren können. Dieser Effekt wurde erstmals nach Einführung einer zusätzlichen Kopie eines Gens unter Kontrolle eines exogenen Promotors in Pflanzen entdeckt und am Anfang Co-Suppression genannt (van der Krol et al., 1990; Vaucheret et al., 2001). Der Vorteil dieses Ansatzes ist, dass er es aufgrund seiner dominanten Ausprägung (McGinnis et al., 2007) erlaubt, die erste transgene Generation (T1) unmittelbar nach der Transformation zu analysieren. Allerdings handelt es sich dabei nicht um einen KO-Effekt, sondern um ein breites Spektrum unterschiedlicher Suppressionsstärke. In verschiedenen Mutanten-Hintergründen oder Ökotypen kann so aber trotzdem schnell nach Effekten gesucht und daraus Hypothesen abgeleitet werden, die anschließend in verfügbaren Mutanten überprüft werden können. Außerdem ist es möglich, mit einem Konstrukt mehrere Gene auszuschalten und durch die Wahl eines bestimmten Promotors Gene gewebespezifisch zu supprimieren. So wurde in der vorliegenden Arbeit zum Beispiel der samenspezifische Napin-Promotor verwendet, um den Samen-Stoffwechsel gezielt zu untersuchen.

Ziel dieses Ansatzes war, Pflanzen mit verschiedenen RNAi-Konstrukten zu transformieren und mit Hilfe der HPLC Unterschiede im Metaboliten-Gehalt aufzuzeigen. Alle RNAi-Pflanzen wurden auf das Markergen *bar* selektioniert, das Resistenz gegen das Herbizid Basta[®] vermittelt. Anschließend wurde mit Hilfe einer PCR gegen das *bar*-Gen überprüft, ob das Konstrukt stabil ins Genom der Pflanze integriert wurde.

3.2.1. Suppression der *UGT 84A2* in Rosettenblättern

Die Expression des *UGT 84A2*-Gens sollte zunächst mit Hilfe eines RNAi-Ansatzes (siehe Abschnitt 2.4.1.) supprimiert werden. Kontrollpflanzen wurden mit dem Vektor pLH7000 ohne die RNAi-Kassette transformiert. Zunächst wurden Rosettenblätter der T1-Generation analysiert. Durch HPLC-Analysen von methanolischen Blattextrakten sollten

nach Unterschieden gesucht werden zwischen Kontrollpflanzen und *35S:UGT84A2i (256)* Linien. In diesen Analysen konnten in den Rosettenblättern aller Linien keine Sinapoylglucose detektiert werden, da sie in diesem Gewebe wahrscheinlich sehr schnell umgesetzt wird und hier als Meßgröße nicht geeignet ist. Deshalb wurde der Gehalt des Folgeprodukts Sinapoylmalat in den Blättern von Arabidopsis analysiert. Die Analyse wurde bis zur T3-Generation fortgesetzt. Pflanzen mit dem geringsten Gehalt an Sinapoylmalat wurden dabei jeweils ausgesät, mit Basta[®] selektiert und schließlich die Blattextrakte mit Hilfe der HPLC untersucht. Anhand der Segregation des Basta[®]-Selektionsmarkers der T2-Generation konnte eine Insertion mehrerer RNAi-Konstrukte ins Arabidopsis-Genom belegt werden. Die T2-Nachkommen der RNAi-Linien waren komplett Basta[®]-resistent. Bei einer Einzelkopie-Insertion wäre hier eine 3:1 Verteilung von resistenten zu nicht-resistenten Pflanzen zu erwarten gewesen. Alle untersuchten Pflanzen waren demnach genetisch sehr unterschiedlich und die Auswirkungen der RNA-Interferenz entsprechend heterogen in den folgenden Generationen. In Abbildung 3.7 sind die Ergebnisse der HPLC-Analysen von zwei Generationen abgebildet. Als Kontrollwerte werden hier übersichtshalber nur die Daten des leeren Vektors im Vergleich mit den RNAi-Linien angegeben (siehe Abbildung 3.7: schwarze Balken). Der Wildtyp wurde zwar ebenfalls vermessen, zeigte aber keine wesentlichen Unterschiede zu den Kontrollpflanzen, die mit dem Vektor pLH7000 transformiert waren. Der Sinapoylmalat-Gehalt der Kontrollpflanzen variierte zwischen 600 pmol/mg FW (T2) und 1300 pmol/mg FW (T1). Für das RNAi-Konstrukt gegen das Gen der *UGT 84A2* lagen die Sinapoylmalat-Gehalte zwischen 500 pmol/mg FW (T2) und 1590 pmol/mg FW (T3, Daten nicht gezeigt). Werden die niedrigsten Werte zugrunde gelegt, kam es zwischen leerem Vektor und RNAi-Konstrukt zu einer Verringerung des Sinapoylmalat-Gehalts um maximal 17% (von 600 auf 500 pmol/mg FW) in der T2-Generation.

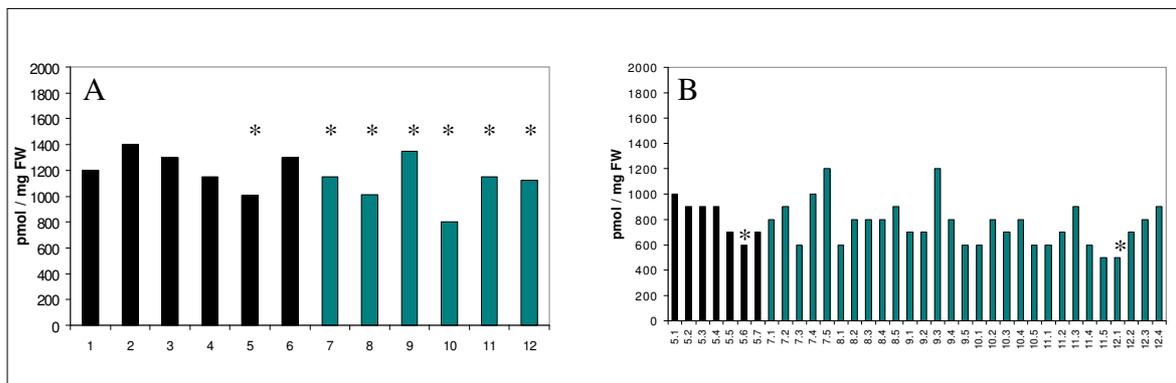


Abbildung 3.7: HPLC-Analysen des Sinapoylmalat-Gehaltes von einzelnen RNAi-Pflanzen mit dem Konstrukt *35S:UGT 84A2i (256)* von der T1- (A) und der T2-Generation (B) in Rosettenblättern. Kontrollpflanzen (leerer Vektor) 1-6, *35S:UGT 84A2i (256)* Pflanzen 7-12. Arabidopsis-Linien, die weitergeführt wurden, sind mit einem * gekennzeichnet; Ergebnisse der T3 Generation sind nicht gezeigt, da keine Unterschiede zwischen den Nachkommen der mit * gekennzeichneten RNAi-Linie und den Kontrollpflanzen zu sehen waren.

In Rosettenblättern des Wildtyps (Col.) konnte kaum Sinapoylglucose detektiert werden. Damit RNAi-Effekte möglicherweise besser gezeigt werden können, wurde die *sngI*-Mutante (siehe Tabelle 2.2) untersucht. In dieser Mutante kann die 1-*O*-Sinapoyl- β -Glucose:L-Malate Sinapoyltransferase (*SMT*) durch eine Punktmutation kein Sinapoylmalat mehr produzieren. Dadurch akkumuliert Sinapoylglucose in Blättern und kann leicht mit Hilfe der HPLC detektiert werden (Lorenzen et al., 1996). Aus der *sngI*-Mutante wurden deshalb RNAi-Pflanzen mit dem *35S:UGT 84A2i (256)* Konstrukt hergestellt. Abbildung 3.8 zeigt die Ergebnisse der HPLC-Analysen.

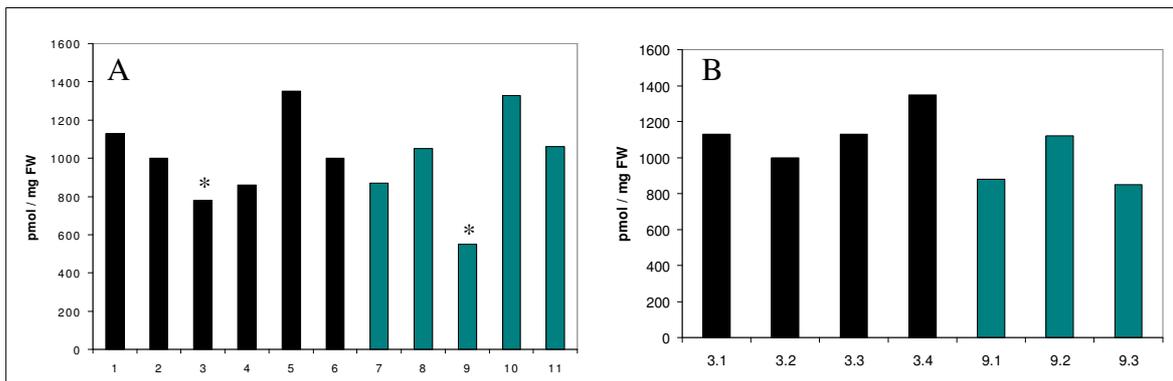


Abbildung 3.8: HPLC-Analyse des Sinapoylglucose-Gehalts der Rosettenblätter von einzelnen RNAi-Pflanzen *35S:UGT 84A2i (256)* im *sngI*-Hintergrund. Die T1- (A) und T2- Generation (B) wurde vermessen. Kontrollpflanzen (leerer Vektor) 1-6, *35S:UGT 84A2i (256)* Pflanzen 7-11. Arabidopsis-Linien, die weitergeführt wurden, sind mit einem * gekennzeichnet.

Zwischen der *sngI*-Mutante ohne und den Kontrollpflanzen mit leerem Vektor gab es keine wesentlichen Unterschiede im Gehalt an Sinapoylglucose. In den Kontrollpflanzen lag der niedrigste Wert bei 780 pmol/mg FW (T1) und der höchste bei 1350 pmol/mg FW (T1 und T2). In den RNAi-Pflanzen *35S:UGT 84A2i (256)* im *sngI*-Hintergrund konnten Werte von Sinapoylglucose zwischen 550 pmol/mg FW (T1) und 1330 pmol/mg FW (T1) gemessen werden. Werden die niedrigsten Werte zugrunde gelegt, kam es zwischen den Kontrollpflanzen und den RNAi-Linien zu einer Reduktion um maximal 30% (von 780 auf 550 pmol/mg FW) im Sinapoylglucose-Gehalt.

3.2.2. Suppression der *UGT 84A2* in Samen

Die Glucosyltransferasen *UGT 84A1-4* werden im reifenden Samen relativ stark exprimiert (siehe Abschnitt 3.1). Deshalb wurde mit zwei RNAi-Konstrukten versucht, die Expression der *UGT 84A2* im Samen von Arabidopsis zu supprimieren. Dazu wurde das RNAi-Konstrukt wie in den Rosettenblättern unter dem konstitutiven *35S*-Promotor und ein RNAi-Konstrukt unter einem samenspezifischen Promotor verwendet. Bei diesem handelte es sich um den Napin-Promotor aus *Brassica napus*. Abbildung 3.9 zeigt die HPLC-Analysen der Arabidopsis-Samen der transgenen T2-Generation.

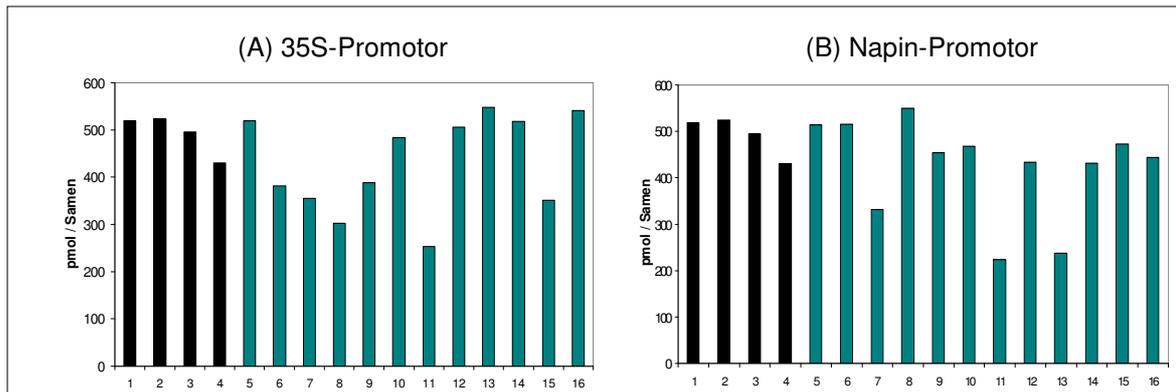


Abbildung 3.9: HPLC-Analysen des Sinapin-Gehalts der T2-Samen von einzelnen RNAi-Pflanzen *35S:UGT 84A2i (256)* (A) und *Nap:UGT 84A2i (256)* (B). Kontrollpflanzen (leerer Vektor) 1-4, *35S:UGT 84A2i (256)* bzw. *Nap:UGT 84A2i (256)* Pflanzen 5-16.

Die niedrigsten Sinapin-Werte der Kontroll-Population wurden zur Abschätzung des RNAi-Effekts zugrunde gelegt. Unter dem 35S-Promotor wird der Sinapin-Gehalt in RNAi-Linien gegenüber den Kontrollpflanzen um 29% reduziert (von 429 auf 303 pmol/Samen). Unter dem Napin-Promotor wurde der Sinapin-Gehalt in RNAi-Linien um bis zu 48 % (von 429 auf 224 pmol/Samen) gesenkt.

Im Samen konnte im Gegensatz zu Rosettenblättern Sinapoylglucose mit Hilfe der HPLC detektiert werden. Abbildung 3.10 gibt die Unterschiede zwischen Kontrollpflanzen und RNAi-Pflanzen wieder. Bei den Pflanzenlinien 1-16 handelt es sich um die gleichen Pflanzen wie in Abbildung 3.9. Die niedrigsten Werte des Sinapoylglucose-Gehalts aus den Kontrollpflanzen wurden für die Abschätzung der Suppressionsstärke zugrunde gelegt. Unter dem 35S-Promotor gibt es eine Reduktion zwischen Kontrollpflanzen und RNAi-Konstrukt um 69% (von 13 auf 4 pmol/Samen). Der Napin-Promotor erreicht eine Reduktion des Sinapoylglucose-Gehalts von 100% (von 13 auf 0 pmol/mg Samen).

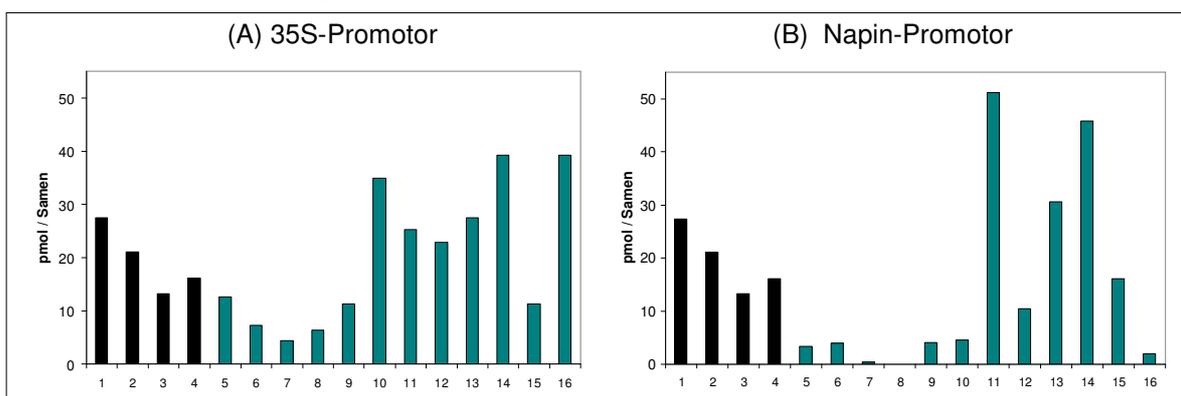


Abbildung 3.10: HPLC-Analysen des Sinapoylglucose-Gehalts der T2-Samen von einzelnen RNAi-Pflanzen *35S:UGT 84A2i (256)* (A) und *Nap:UGT 84A2i (256)* (B). Kontrollpflanzen (leerer Vektor) 1-4, *35S:UGT 84A2i (256)* bzw. *Nap:UGT 84A2i (256)* Pflanzen 5-16.

Sowohl der Sinapin- als auch der Sinapoylglucose-Gehalt in Samen konnten in einzelnen Linien mit beiden Konstrukten gegen die *UGT 84A2* reduziert werden. Der Effekt unterliegt aber einer großen Variabilität, was wahrscheinlich durch die mehrfache Insertion

der RNAi-Konstrukte ins Genom der Pflanzen und die damit verbundene Segregation in der T2-Generation erklärt werden kann. Dadurch kommt es zu genetisch sehr unterschiedlichen Linien.

3.2.3. Differentielle Suppression von *UGT 84A1*, *A2*, *A3* und *A4*

Bisher wurde nur die Suppression der *UGT 84A2* untersucht. Es sollten aber auch die *UGT 84A1*, *A3* und *A4* mit Hilfe von RNAi-Konstrukten supprimiert werden. Deshalb wurden vier RNAi-Konstrukte unter dem 35S-Promotor kloniert (*35S:UGT 84A1i-A4i*; siehe Abschnitt 2.1.4.) Da die RNAi-Suppression der *UGT 84A2* in Rosettenblättern (siehe Abschnitt 3.2.1) kaum Effekte zeigte und in diesem Gewebe die Glucosyltransferasen nur schwach exprimiert werden, konzentrierte sich die folgende Analyse auf Samen und Keimlinge, da hier Effekte besser zu beobachten sein sollten.

Zunächst wurde der RNAi-Effekt in Samen mit HPLC-Analysen untersucht. Abbildung 3.11 zeigt den Sinapoylglucose- und Sinapin-Gehalt in Samen von RNAi-Linien und von Kontrollpflanzen.

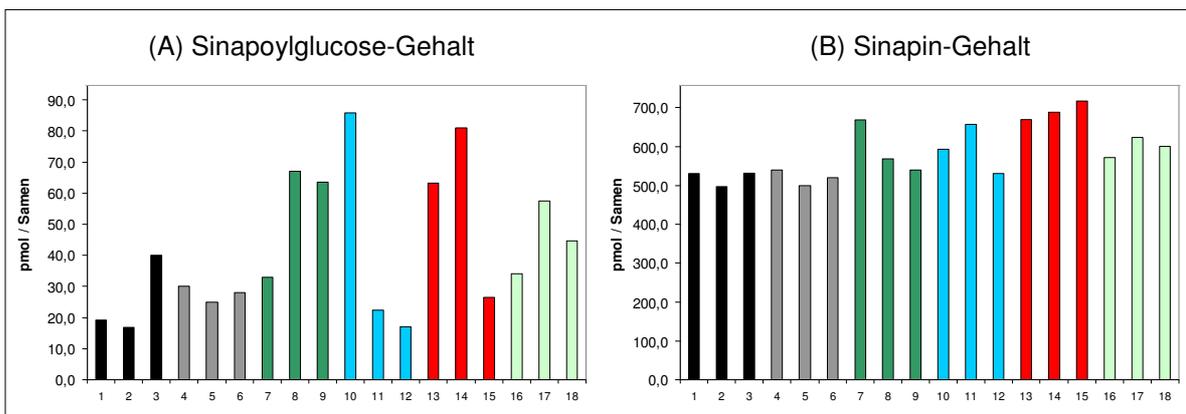


Abbildung 3.11 : HPLC-Analysen des Sinapoylglucose- (A) und Sinapin-Gehalts (B) der Samen von einzelnen RNAi-Pflanzen (*35S:UGT 84A1i-A4i*) der T2-Generation. Kontrollpflanzen (WT 1-3 schwarze und leerer Vektor 4-6 graue Balken), *35S:UGT 84A2i* (7-9 grüne Balken), *35S:UGT 84A1i* (10-12 blaue Balken), *35S:UGT 84A3i* (13-15 rote Balken), *35S:UGT 84A4i* (16-18 hellgrüne Balken).

Sowohl der Sinapoylglucose-, als auch der Sinapin-Gehalt sind in den RNAi-Linien nicht verringert im Vergleich zur Kontrolle. Teilweise sind sogar erhöhte Mengen an Sinapoylglucose und Sinapin in den RNAi-Linien vorhanden, was wahrscheinlich auf die große biologische Varianz und nicht auf RNAi-Effekte zurückgeführt werden kann. Tabelle 3.1 gibt die niedrigsten gemessenen Werte der RNAi-Linien im Vergleich zur Kontrolle an. In Samen konnte demnach kein RNAi-Effekt festgestellt werden.

Tabelle 3.1: Sinapoylglucose- und Sinapin-Gehalt in Samen von verschiedenen RNAi-Linien im Vergleich zu Pflanzen, die mit dem leeren Vektor pLH7000 transformiert wurden.

Werte in pmol/Samen	pLH7000	UGT 84A1i	UGT 84A2i	UGT 84A3i	UGT 84A4i
Sin-Glc	16,9	17,0	32,9	26,4	34,1
Sinapin	500	530	539,2	670,1	570,9

Neben den Samen wurden vier Tage alte Keimlinge mit Hilfe der HPLC analysiert. Dabei wurden der Sinapoylglucose- und Sinapoylmalat-Gehalt gemessen. In vier Tage alten Keimlingen ist im Wildtyp (Col.) eine Akkumulation von Sinapoylglucose zu beobachten und ab dem dritten Tag kann Sinapoylmalat mit der HPLC detektiert werden (siehe Abbildung 3.4). Abbildung 3.12 zeigt den Einfluss der RNAi-Konstrukte auf den Sinapoylglucose- und Sinapoylmalat-Gehalt in vier Tage alten Keimlingen im Vergleich zu Kontrollpflanzen, die mit dem Vektor pLH7000 ohne RNAi-Kassette transformiert wurden.

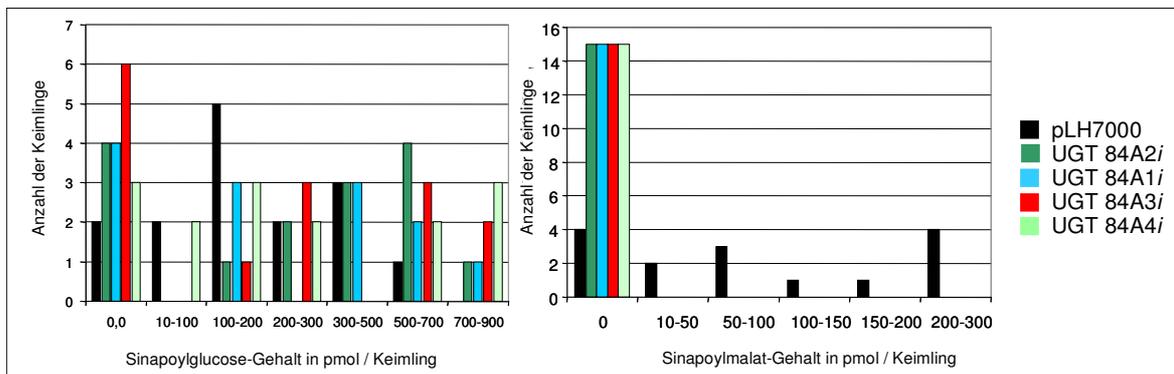


Abbildung 3.12: HPLC-Analysen des Sinapoylglucose- und Sinapoylmalat-Gehalts von 4 Tage alten Keimlingen von RNAi-Pflanzen (*35S:UGT 84A1i-A4i*) der T2-Generation. Kontrollpflanzen mit leerem Vektor (schwarze Balken), *35S:UGT 84A2i* (grüne Balken), *35S:UGT 84A1i* (blaue Balken), *35S:UGT 84A3i* (rote Balken), *35S:UGT 84A4i* (hellgrüne Balken). Angegeben sind die Anzahl der Keimlinge, die einen bestimmten Gehalt an Sinapoylglucose oder Sinapoylmalat (in pmol / Keimling) haben.

In vier Tage alten Keimlingen betrug der Sinapoylglucose-Gehalt in der Kontrolle zwischen 0-700 pmol/Keimling. Der Gehalt in den RNAi-Linien ist ebenfalls sehr variabel und liegt zwischen 0-900 pmol/Keimling. Der Sinapoylmalat-Gehalt ist in allen RNAi-Linien bei 0, während er in der Kontrolle zwischen 0 bis 300 pmol/Keimling liegt. Mit diesen RNAi-Konstrukten konnte auch in Keimlingen kein Effekt gezeigt werden. Vielmehr wird erneut die große biologische Variabilität deutlich. Wahrscheinlich wachsen die Keimlinge unterschiedlich schnell, was zu der großen Varianz im Gehalt an Sinapoylglucose und Sinapoylmalat führt.

Auch mit diesen Konstrukten konnte anhand der Segregation des Basta[®]-Selektionsmarkers in der T2-Generation eine mehrfache Insertion der RNAi-Konstrukte ins Arabidopsis-Genom belegt werden. So wurden auch in diesen RNAi-Linien genetisch

sehr unterschiedliche Individuen vermessen, was ebenfalls zu den sehr variablen Ergebnissen geführt haben könnte.

3.2.4. Arabidopsis als Testorganismus für Raps-RNAi-Konstrukte

RNAi-Konstrukte, die vor allem im Raps zur Anwendung kommen sollen, wurden in Arabidopsis getestet, da hier die Transformation weniger Zeit beansprucht und die Generationszeit kürzer ist als im Raps. In Raps soll in Samen der Sinapin-Gehalt möglichst stark gesenkt werden, da dieser Stoff antinutritive Eigenschaften hat und dadurch die Proteinqualität von *Brassica napus*-Samen herabsetzt. Mit einem RNAi-Ansatz gegen die *SCT* konnte der Sinapin-Gehalt in Arabidopsis um bis zu 88 % reduziert werden (Schmidt, 2006). Deshalb wurde nun ein RNAi-Ansatz mit dem Konstrukt *Nap:BnSGT1i:BnSCTi* verwendet, der sowohl die *UGT 84A2* (homolg zur *BnSGT1* in Raps), als auch die 1-*O*-Sinapoyl- β -glucose:Cholin-Sinapoyltransferase (*SCT*) im Samen von Arabidopsis supprimieren sollte. Abbildung 3.13 zeigt die Ergebnisse der HPLC-Analysen der Samen der T2-Generation.

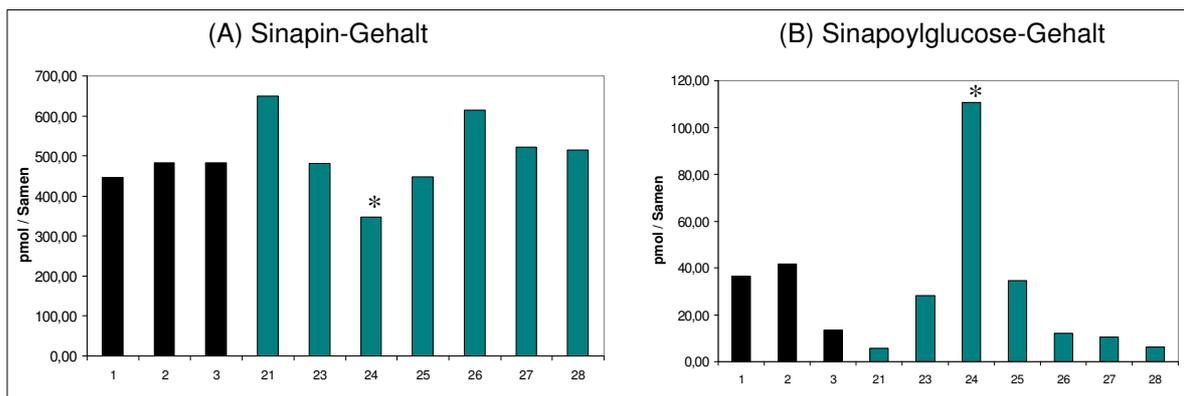


Abbildung 3.13: HPLC-Analysen des Sinapin- (A) und Sinapoylglucose-Gehalts (B) der T2-Samen von einzelnen RNAi-Pflanzen *Nap:BnSGT1i:BnSCTi*. Kontrollpflanzen (leerer Vektor) 1-3, *Nap:BnSGT1i:BnSCTi* Pflanzen 21-28. Arabidopsis-Linien, die weitergeführt wurden, sind mit einem * gekennzeichnet.

Der Sinapin-Gehalt konnte nur in einer Linie (24) um 28% (von 483 auf 347 pmol/ Samen) im Vergleich zu Kontrollpflanzen gesenkt werden. In dieser Linie akkumuliert dafür Sinapoylglucose. Abbildung 3.14 zeigt das Chromatogramm der Linie 24 im Vergleich zu Kontrollpflanzen. Hier ist die Akkumulation von Sinapoylglucose deutlich zu sehen (Peak 1). In Linie 21 ist der Sinapoylglucose-Gehalt um 57% (von 14 auf 6 pmol/Samen) reduziert, dafür ist hier der Sinapin-Gehalt erhöht im Vergleich zu Kontrollpflanzen. Der „biochemische Phänotyp“ der Linie 24 (weniger Sinapin und deutlich mehr Sinapoylglucose im Vergleich zum Wildtyp) in der T2-Generation war nicht stabil und konnte in der T3-Generation nicht reproduziert werden. Segregation der Basta[®]-Resistenz in Arabidopsis war erneut der Beleg für eine mehrfache Insertion der RNAi-Konstrukte ins pflanzliche Genom. Dadurch waren die Nachkommen in der T3-Generation genetisch sehr

heterogen und zeigten folglich ein sehr variables Spektrum im Gehalt von Sinapin und Sinapoylglucose.

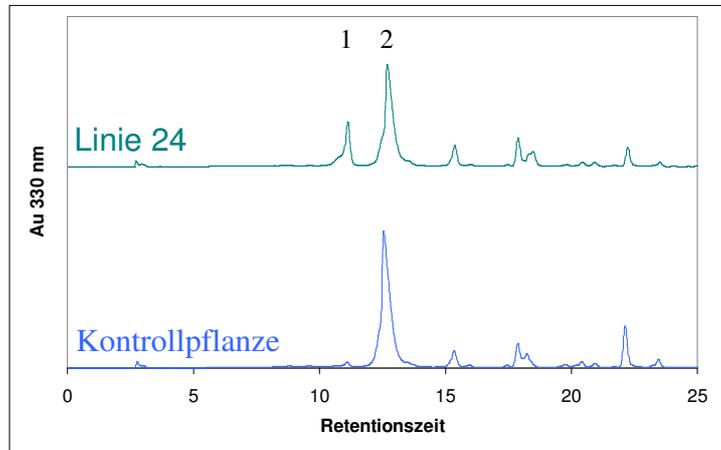


Abbildung 3.14: HPLC-Chromatogramm der Linie 24 und einer Kontrollpflanze. Peak 1=Sinapoylglucose; Peak 2= Sinapin.

Suppression der *PAL* in Samen von Arabidopsis

Ein weiteres RNAi-Konstrukt (*Nap:BnPALi*), das vor allem im Raps zur Anwendung kommen soll, wurde ebenfalls in Arabidopsis getestet. Die Sequenzen der Gene sind zwischen Raps und Arabidopsis relativ ähnlich (siehe Abschnitt 2.4.1). In Arabidopsis gibt es vier *PAL*-Gene. Inwieweit das RNAi-Konstrukt gegen die *PAL* aus Raps die Bildung des Sinapin- und Sinapoylglucose-Gehalts im Samen von Arabidopsis ändern kann, sollte im folgenden durch HPLC Analysen der Samen untersucht werden.

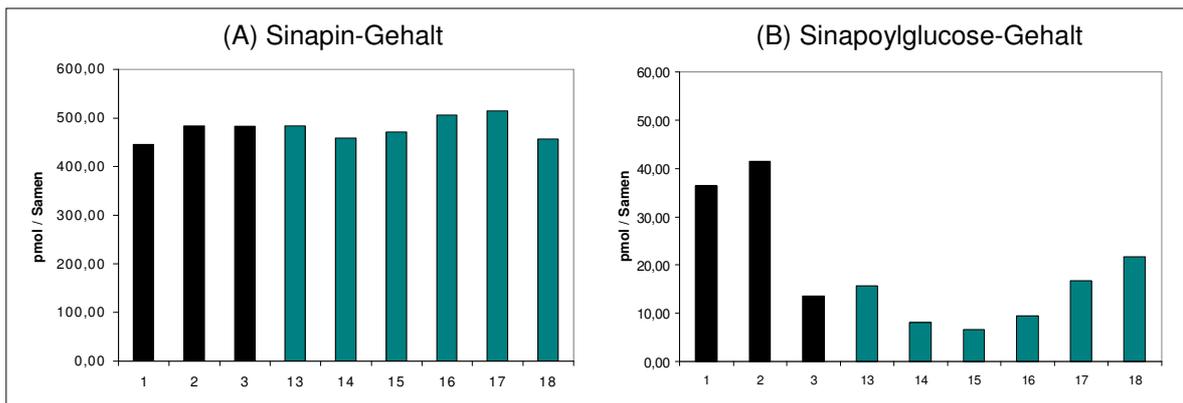


Abbildung 3.15: HPLC-Analysen der T2-Samen von einzelnen RNAi-Pflanzen mit dem Konstrukt *Nap:BnPALi*. Kontrollpflanzen (leerer Vektor) 1-3, *Nap:BnPALi* Pflanzen 13-18.

Der Sinapin-Gehalt ist in den RNAi-Linien gegenüber Kontrollpflanzen im wesentlichen nicht verändert. Der Sinapoylglucose-Gehalt ist in der Linie 15 jedoch um 50% gegenüber Kontrollpflanzen gesenkt (von 14 auf 7 pmol/Samen). Demnach kann mit diesem Konstrukt zumindest der Sinapoylglucose-Gehalt im Raps beeinflusst werden.

Zusammenfassung der Ergebnisse der RNAi-Suppression in Arabidopsis:

Die Tabellen 3.2 und 3.3 geben einen Überblick über den jeweils deutlichsten Unterschied der einzelnen Konstrukte gegenüber Kontrollpflanzen (Pflanzen, die mit dem Vektor pLH7000 ohne RNAi-Kassette transformiert wurden).

Tabelle 3.2: Reduktion in % der einzelnen RNAi-Linien gegenüber Kontrollpflanzen in T2-Samen.

	Sinapin	Sinapoylglucose
<i>35S:UGT 84A2i (256)</i>	29	69
<i>Nap:UGT 84A2i</i>	48	100
<i>35S:UGT 84A1i</i>	0	0
<i>35S:UGT 84A2i</i>	0	0
<i>35S:UGT 84A3i</i>	0	0
<i>35S:UGT 84A4i</i>	0	0
<i>Nap:BnSGT1:BnSCTi</i>	28	0
<i>Nap:BnSGT1:BnSCTi</i>	0	57
<i>Nap:BnPALi</i>	0	50

Mit den Konstrukten *35S:UGT 84A2i (256)* und *Nap:UGT 84A2i* kommt es zu einer Reduktion des Sinapin- und Sinapoylglucose-Gehalts in Samen, wobei die Suppression unter dem samenspezifischen Napin-Promotor einen größeren Effekt erbrachte. Mit den RNAi-Konstrukten *35S:UGT84A1i-A4i* konnten keine Effekte erzielt werden. Zur weiteren Reduktion des Sinapin-Gehalts in Samen erbrachte das RNAi-Konstrukt *Nap:BnSGT1:BnSCTi* in Arabidopsis keine Verbesserung der Suppression. Mit dem *Nap:BnPALi* Konstrukt wurde nur der Gehalt an Sinapoylglucose reduziert.

In Keimlingen hatte die Suppression mit allen Konstrukten keinen Erfolg. Die biologische Varianz ist hier sehr hoch, so dass auch in den Kontrollen teilweise kein Sinapoylglucose oder Sinapoylmalat zu detektieren war und dadurch Effekte schwer zu detektieren waren.

Tabelle 3.3: Reduktion in % der einzelnen RNAi-Linien gegenüber Kontrollpflanzen in Rosettenblättern.

	Sinapoylglucose	Sinapoylmalat
<i>35S:UGT 84A2i (256)</i> (Col. Hintergrund)	n.d.	17
<i>35S:UGT 84A2i (256)</i> (<i>sng1</i> Hintergrund)	30	n.d.

In Rosettenblättern konnte mit dem Konstrukt *35S:UGT 84A2i (256)* der Sinapoylmalat-Gehalt im Wildtyp (Col.) und der Sinapoylglucose-Gehalt im *sng1*-Hintergrund reduziert werden.

Der RNAi-Ansatz hat gezeigt, dass der erzielte Effekt in einzelnen Pflanzen sehr unterschiedlich ausfallen kann. Das Ergebnis der RNAi-Linien *Nap:BnSGT1:BnSCTi* hat am Beispiel der Linie 24 sehr deutlich gezeigt, dass ein erhaltener Effekt nicht stabil in die nächste Generation übernommen wird. Leider war in allen Fällen das pflanzliche Material genetisch zu heterogen und zu limitiert für weiterführende Untersuchungen. Nur bei genetisch stabilen Linien (wie bei Einzelkopie-Insertionen) hätte genügend Material herangezogen werden können.

Ein weiteres Ergebnis dieses RNAi-Ansatzes ist, dass in den Linien, in denen es zu Reduktionen von Sinapin, Sinapoylglucose oder Sinapoylmalat kam, keine neuen Stoffwechselprodukte mit Hilfe der HPLC bei einer Wellenlänge von 330 nm detektiert werden konnten.

3.3. Suppression der *UGT 84A1-4* Gene in verschiedenen Insertionslinien

Im Laufe der Arbeit wurden mehrere T-DNA-Insertionslinien verfügbar. Diese Linien mußten zunächst auf ihre Insertionen überprüft und homozygote Linien erzeugt werden. Danach sollten die Transkription der jeweils ausgeschalteten Glucosyltransferase überprüft und der Einfluss auf die Enzymaktivität und den Phenylpropanstoffwechsel untersucht werden.

3.3.1. Transposon-Insertionslinie *UGT 84A2 KO*

Von der Riken Transposon Tag Line 11-5836-1 (Kuromori *et al.*, 2004) konnten homozygote Pflanzen erzeugt werden (siehe Abschnitt 2.3.11.). Diese Linie soll im folgenden *UGT 84A2 KO* genannt werden, da die Insertion im ORF lag und zu einem Knock-Out der *UGT 84A2* führen sollte. Zur Überprüfung dieser Annahme wurde zunächst eine semiquantitative RT-PCR (Abbildung 3.16) durchgeführt.

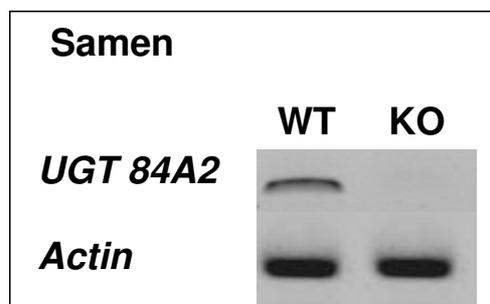


Abbildung 3.16: Semiquantitative RT-PCR (30 Zyklen) mit *UGT 84A2* UTR und Actin Primern (siehe Anhang Tabelle 7.1). 1 µg RNA aus Samen wurde in cDNA umgeschrieben. WT=Wildtyp (No-0); KO=*UGT 84A2 Knock Out* Linie. Actin diente als konstitutiv exprimiertes Gen.

Im Samen ist die Transkription der *UGT 84A2* in der KO-Linie nicht mehr zu detektieren im Vergleich zum Wildtyp. RT qPCR Experimente bestätigten diese Befunde. Zur Überprüfung, ob die fehlende Genexpression der *UGT 84A2* einen Einfluss auf die Bildung von HCA-Glucose-Estern hat, wurden Enzymaktivitätstests von Rosettenblättern durchgeführt. Abbildung 3.17 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung.

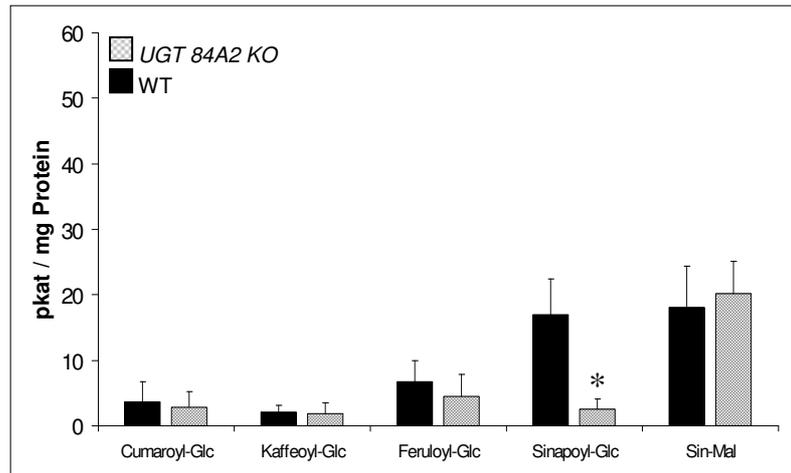


Abbildung 3.17: HCA-GT-Aktivität von Rosettenblättern der *UGT 84A2 KO* Linie im Vergleich zum Wildtyp (No-0). Es wurden n=6 unabhängige Messungen vorgenommen. Ein * bedeutet, dass ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und KO-Linie vorlag ($p < 0,05$; T-Test).

Während es bei der Bildung von Cumaroylglucose, Kaffeyoylglucose, Feruloylglucose und Sinapoylmalat keine Unterschiede zwischen Wildtyp und KO-Linie gibt, ist die Bildung von Sinapoylglucose signifikant reduziert. In der *UGT 84A2 KO* Linie bleibt eine Restaktivität zur Bildung von Sinapoylglucose von 14,7 % im Vergleich mit dem Wildtyp (von 17,0 auf 2,5 pkat/mg Protein). In der *brt1*-Mutante (Sinlapadach *et al.* 2007), in der die *UGT 84A2* durch eine Punktmutation ausgeschaltet ist, blieb eine Restaktivität von ungefähr 5% erhalten.

Die *UGT 84A2 KO* Linie zeigte nur eine Verminderung der Aktivität gegenüber Sinapinsäure, was in Einklang mit der *in vitro* gemessenen Substratspezifität von *UGT 84A2* (Milkowski *et al.* 2000; Lim *et al.* 2001) steht. Die Restaktivität von 14,7% könnte auf die Redundanz der anderen drei *UGTs* (84A1, A3 und A4) zurückzuführen sein.

Mit den bisherigen Experimenten zur *UGT 84A2 KO* Linie konnte eine Verminderung der *UGT 84A2* Expression und Enzymaktivität gegenüber dem Wildtyp (No-0) gezeigt werden. Im folgendem wurde die Auswirkung dieser Reduktion auf den HCA-Stoffwechsel untersucht.

Zunächst wurde die Metabolitenzusammensetzung der Samen mit Hilfe der HPLC analysiert. Abbildung 3.18 zeigt die Ergebnisse dieser Analysen. In der KO-Linie konnte keine Sinapoylglucose detektiert werden. Dafür ist der Gehalt an Sinapin gleich groß wie im Wildtyp. Möglicherweise reicht die Enzymaktivität der UGT 84A1, A3 und A4 gegenüber Sinapinsäure und UDP-Glucose aus, um die Akkumulation von Sinapin zu gewährleisten. Transkriptionsanalysen zeigten, dass die Expression der *UGT 84A1*, *A3* und *A4* in der KO-Linie im Vergleich zum Wildtyp auf gleichem Niveau blieb (Abbildung 3.19).

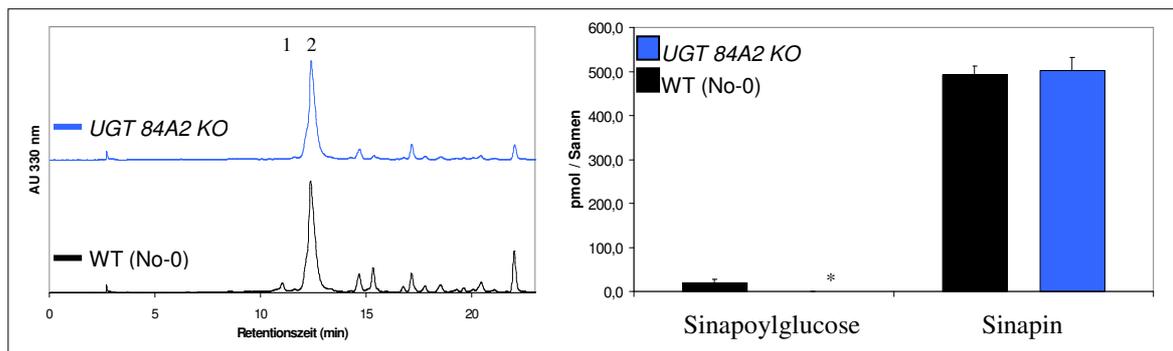


Abbildung 3.18: HPLC-Analysen von Extrakten aus Arabidopsis-Samen. Die Linie *UGT 84A2 KO* wurde mit dem Wildtyp (No-0) verglichen. (A) Chromatogramm der methanolischen Samenextrakte; Peak 1=Sinapoylglucose und Peak 2=Sinapin. (B) Quantitative Auswertung der HPLC-Analysen mit einer Probenanzahl von n=6. Ein * bedeutet, dass ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und KO-Linie vorlag ($p < 0,05$; T-Test).

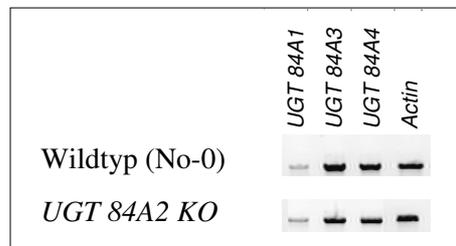


Abbildung 3.19: Semiquantitative RT-PCR (30 Zyklen) mit UGT 84A1, A3 und A4 200er und Actin Primern (siehe Anhang Tabelle 7.1). 1 μ g RNA aus Samen wurde in cDNA umgeschrieben. Actin diente als konstitutiv exprimiertes Gen.

Desweiteren wurden Rosettenblätter mit Hilfe der HPLC analysiert (Abbildung 3.20). Der Gehalt an Sinapoylglucose von 22 pmol/mg (Mittelwert aus 3 Stichproben) im Wildtyp (No-0) ist in Rosettenblättern sehr gering, wie in Kapitel 3.1.3. bei der Untersuchung des Wildtyps (Col.) schon erwähnt wurde. In der KO-Linie ist sogar nur noch ein Sinapoylglucose-Gehalt von 3 pmol/mg (Mittelwert aus 3 Stichproben) detektierbar. Der Unterschied ist aufgrund der Standardabweichung im Wildtyp nicht signifikant. Dafür ist die Akkumulation von Sinapoylmalat signifikant reduziert im Vergleich zum Wildtyp (No-0).

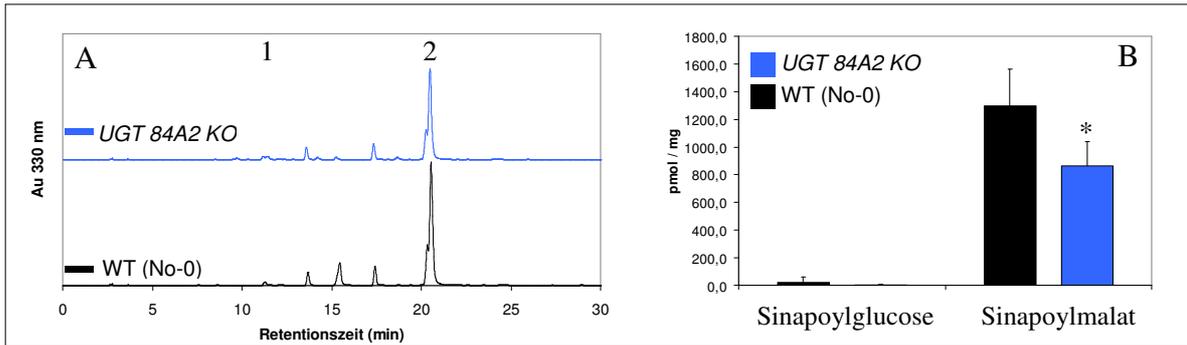


Abbildung 3.20: HPLC-Analysen von Extrakten aus Rosettenblättern. Die Linie *UGT 84A2 KO* wurde mit dem Wildtyp (No-0) verglichen. (A) Chromatogramm der methanolischen Extrakte; Peak 1=Sinapoylglucose und Peak 2=Sinapoylmalat. (B) Quantitative Auswertung der HPLC-Analysen mit einer Probenanzahl von n=6. Ein * bedeutet, dass ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und KO-Linie vorlag ($p < 0,05$; T-Test).

In den Keimlingen (6 Tage alt) kann Sinapoylglucose sehr gut detektiert werden. In diesem Stadium war die Reduktion des Sinapoylglucose-Gehalts gut zu quantifizieren. Auch Sinapoylmalat war hier signifikant reduziert (Abbildung 3.21). In der KO-Linie wird Sinapoylglucose anscheinend vollständig zu Sinapoylmalat umgesetzt. Dadurch kann sie in Keimlingen und Rosettenblättern nicht akkumulieren. Offensichtlich ist durch die Aktivität der *UGT 84A1*, *A3* und *A4* gewährleistet, dass die Synthese von Sinapoylmalat als Folgeprodukt aufrechterhalten werden kann. In der KO-Linie werden statt Sinapoylglucose keine anderen HCA-Ester produziert.

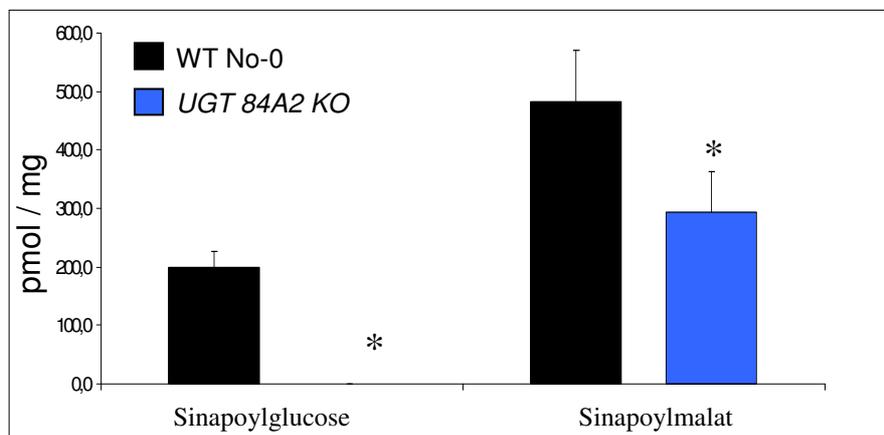


Abbildung 3.21: HPLC-Analyse von Extrakten aus 6 Tage alten Keimlingen. Die Linie *UGT 84A2 KO* wurde mit dem Wildtyp (No-0) verglichen. Gezeigt ist die quantitative Auswertung der HPLC-Analysen mit einer Probenanzahl von n=6. Ein * bedeutet, dass ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und KO-Linie vorlag ($p < 0,05$; T-Test).

In den Zellwänden der Linie *UGT 84A2 KO* konnte im Vergleich zum Wildtyp ein verringerter Gehalt an Sinapinsäure nachgewiesen werden. Der Unterschied war aber nicht signifikant. Der Gehalt an Cumar- und Ferulasäure war in der Zellwand der KO-Linie unverändert gegenüber dem Wildtyp (Daten sind nicht gezeigt).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Verminderung der Enzymaktivität gegenüber Sinapinsäure und UDP-Glucose zu einer Abnahme von Sinapoylglucose in Samen, Keimlingen und Blättern führt. Im Samen ist die Akkumulation von Sinapin nicht beeinflusst, während in Keimlingen und Blättern die Produktion von Sinapoylmalat signifikant reduziert ist. Die Expression der *UGT 84A2* ist in Samen der KO-Linie nicht mehr nachweisbar. Dadurch wird aber keine der anderen drei UGTs in ihrer Genexpression beeinflusst. Es kommt auch nicht zu einer Akkumulation von anderen Konjugaten von Hydroxyzimtsäuren, die die Reduktion von Sinapoylglucose oder Sinapoylmalat kompensieren. Statt dessen sieht es eher so aus, als ob die Expression der *UGT 84A1*, *A3* und *A4* dazu dienen, den Sinapoylglucose-, Sinapoylmalat- und Sinapin-Spiegel in der Pflanzen so gut wie möglich aufrecht zu erhalten. Durch Kreuzung der Linie *UGT 84A2 KO* mit T-DNA-Insertionslinien der anderen UGTs könnte überprüft werden, ob durch den Ausfall von zwei UGTs der Sinapin- bzw. Sinapoylmalat-Gehalt weiter reduziert wird. Leider blieb für dieses Experiment während der vorliegenden Arbeit keine Zeit mehr, da die Linie *UGT 84A2 KO* erst gegen Ende der Arbeit vorlag. Die Kreuzung der Linie *UGT 84A2 Pro* (T-DNA Insertion im Promotorbereich der *UGT 84A2*) mit der T-DNA-Insertionslinie *UGT 84A3 KO* ergab keine Änderungen im Metaboliten-Gehalt. Dies war zu erwarten, da die Enzymaktivität der UGTs in der Linie *UGT 84A2 Pro* unverändert blieb im Vergleich zum Wildtyp (siehe Abschnitt 3.3.2).

3.3.2. T-DNA-Insertionslinien in den *UGT 84A1-4*-Genen

Zur weiteren Analyse der biologischen Bedeutung der *UGT 84A1-4* standen T-DNA-Insertionslinien zur Verfügung. Zunächst wurde die Position der T-DNA Insertion für die einzelnen Linien festgestellt, nachdem durch PCR homozygote Pflanzen isoliert werden konnten. Dazu wurden die PCR-Fragmente, die mit dem Primer der jeweiligen T-DNA-Insertion und einem Primer der entsprechenden UGT (siehe Abschnitt 2.3.11) generiert wurden, in den Vektor pGEM[®] T-Easy kloniert und anschließend sequenziert. Abbildung 3.22 zeigt die Positionen der T-DNA-Insertionen der Linien *UGT 84A1 KO*, *UGT 84A2 Pro*, *UGT 84A3 KO* und *UGT 84A4 KO*.

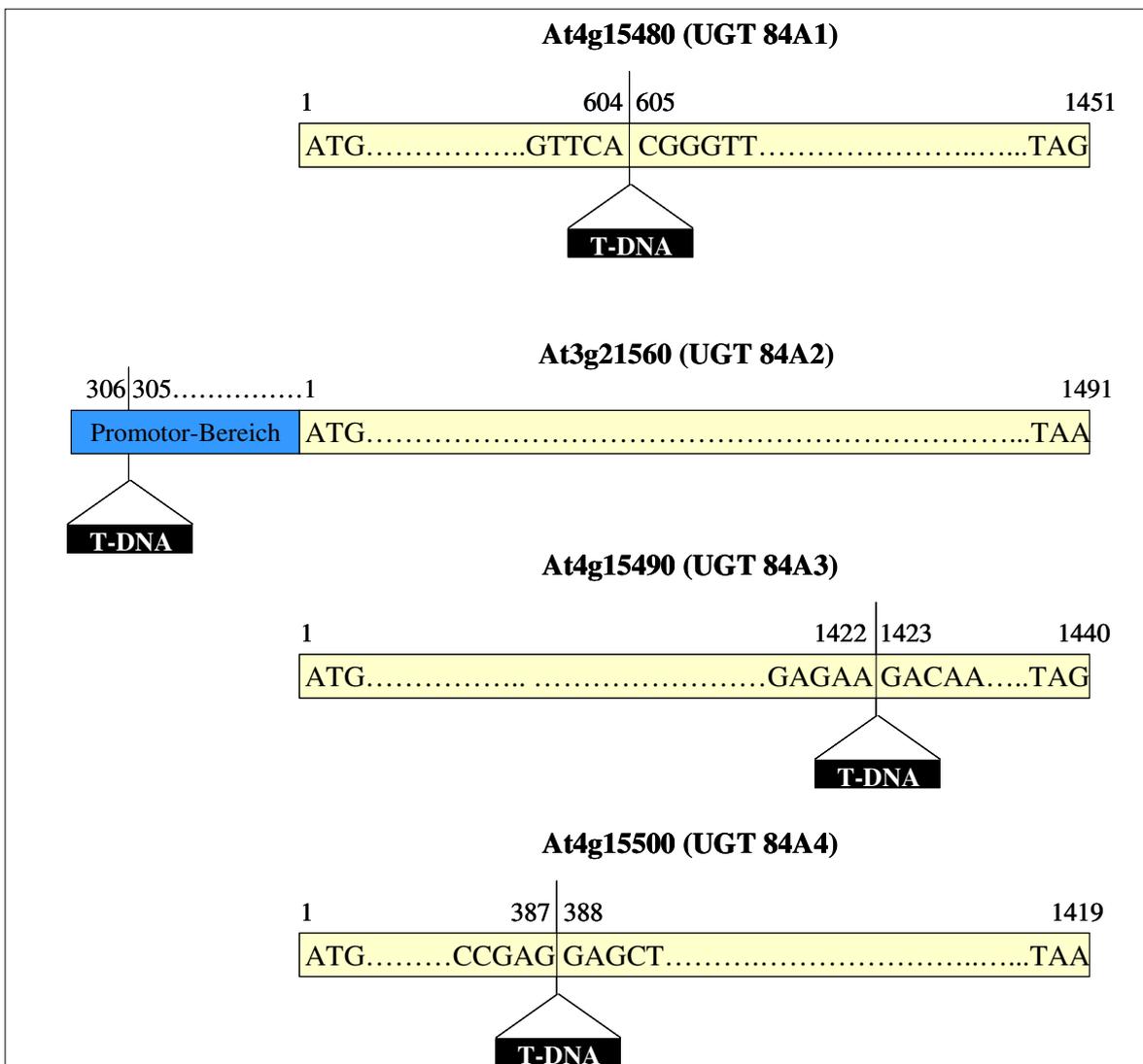


Abbildung 3.22: Position der T-DNA-Insertionen der Linien *UGT 84A1 KO*, *UGT 84A2 Pro*, *UGT 84A3 KO* und *UGT 84A4 KO*. Die Sequenzierungen aus der T-DNA heraus ergaben die genauen Positionen der T-DNA-Insertionen.

Der Einfluss dieser T-DNA-Insertionen auf die Genexpression der *UGT 84A1-4* wurde mit Hilfe von semiquantitativen RT-PCRs von RNA aus Rosettenblättern überprüft (siehe Abbildung 3.23).

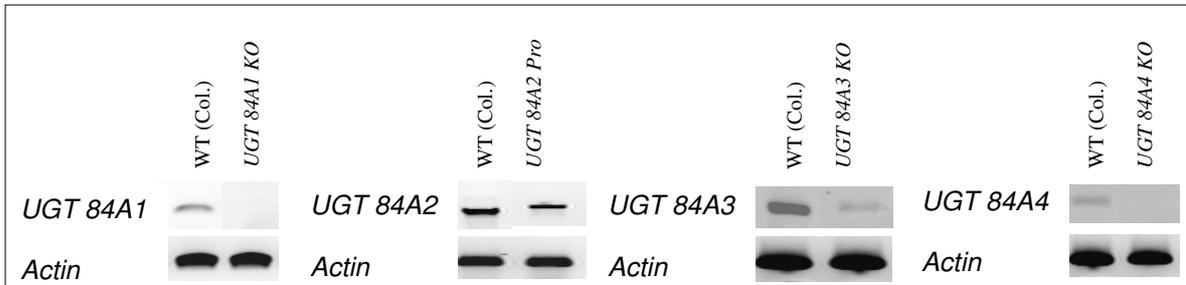


Abbildung 3.23: Semiquantitative RT-PCR (30 Zyklen) mit *UGT 84A1-4* 200er und Actin Primern (siehe Anhang Tabelle 7.1). 1 µg RNA aus Rosettenblättern (Samen bei der Linie *UGT 84A2 Pro*) vom Wildtyp (Col.) und verschiedenen T-DNA Insertionslinien wurde in cDNA umgeschrieben. Actin diente als konstitutiv exprimiertes Gen.

Für die Linien *UGT 84A1 KO* und *UGT 84A4 KO* konnte kein Transkript mehr mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR in Rosettenblättern nachgewiesen werden. In der Linie *UGT 84A2 Pro* und *UGT 84A3 KO* kommt es zu einer Reduzierung der Transkriptmenge im Vergleich zum Wildtyp.

Für alle vier T-DNA-Insertionslinien konnten jedoch keine Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp (Col.) im Bezug auf die UGT-Aktivitäten gegenüber Cumar-, Kaffee-, Ferula- und Sinapinsäure festgestellt werden.

Ebenso konnten durch HPLC-Analysen von Samen, Keimlingen und Blätter in den löslichen Fraktionen keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und KO-Linien aufgezeigt werden. Auch die Analyse der Zellwände ergab keine Unterschiede im Gehalt an Cumar-, Ferula- oder Sinapinsäure. Nur in der Linie *UGT 84A3 KO* wurden unterschiedliche Gehalte an Hydroxyzimtsäuren in den Zellwänden gefunden.

Wie in Abbildung 3.24 zu sehen ist, ist der Gehalt an Cumarsäure signifikant reduziert. Auch der Gehalt an Ferulasäure in der T-DNA-Insertionslinie ist leicht reduziert gegenüber dem Wildtyp, während der Sinapinsäure-Gehalt auf etwa gleichem Niveau bleibt.

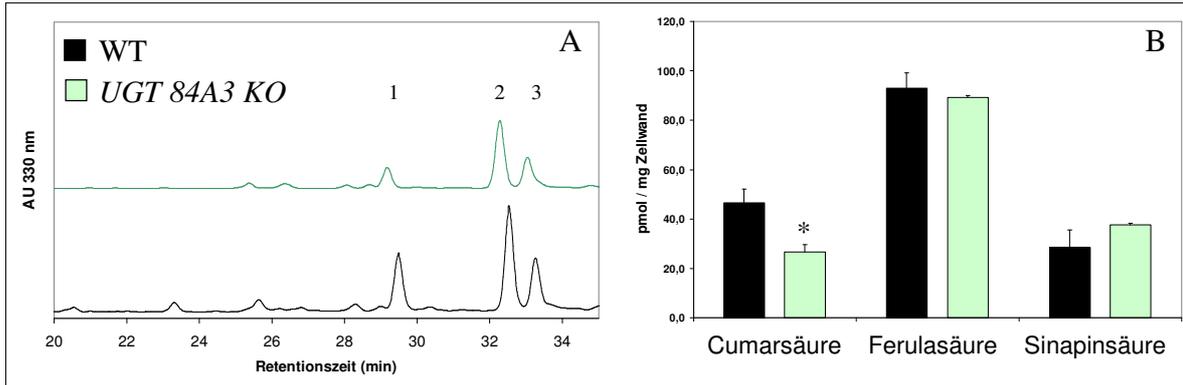


Abbildung 3.24: HPLC-Analysen der Zellwände von Rosettenblättern. Die Linie *UGT 84A3 KO* wurde mit dem WT (Col.) verglichen. (A) Chromatogramm der Zellwand-Analyse; Peak 1=Cumarsäure; Peak 2=Ferulasäure; Peak 3=Sinapinsäure. (B) Quantitative Auswertung der HPLC-Analysen mit einer Probenanzahl von n=6. Ein * bedeutet, dass ein signifikanter Unterschied zwischen WT und T-DNA-Insertionslinie vorlag ($p < 0,05$; T-Test).

Da die *UGT 84A4* in den Wurzeln vergleichsweise stark exprimiert wird, wurde auch der Metaboliten-Gehalt dieses Organs mit Hilfe der HPLC analysiert. Im HPLC-Chromatogramm zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen dem Wildtyp (Col.) und der KO-Linie (Abbildung 3.25: Pfeile). Die Peaks sind jedoch unbekannt. Einige zeigen allerdings UV-Spektren, die auf HCA-Konjugate hinweisen. Eine LC-MS Analyse von Wurzelextrakten der Linie *UGT 84A4 KO* im Vergleich zum Wildtyp ergab ebenfalls Unterschiede im Metaboliten-Gehalt, aber auch hier konnten die Substanzen noch nicht identifiziert werden.

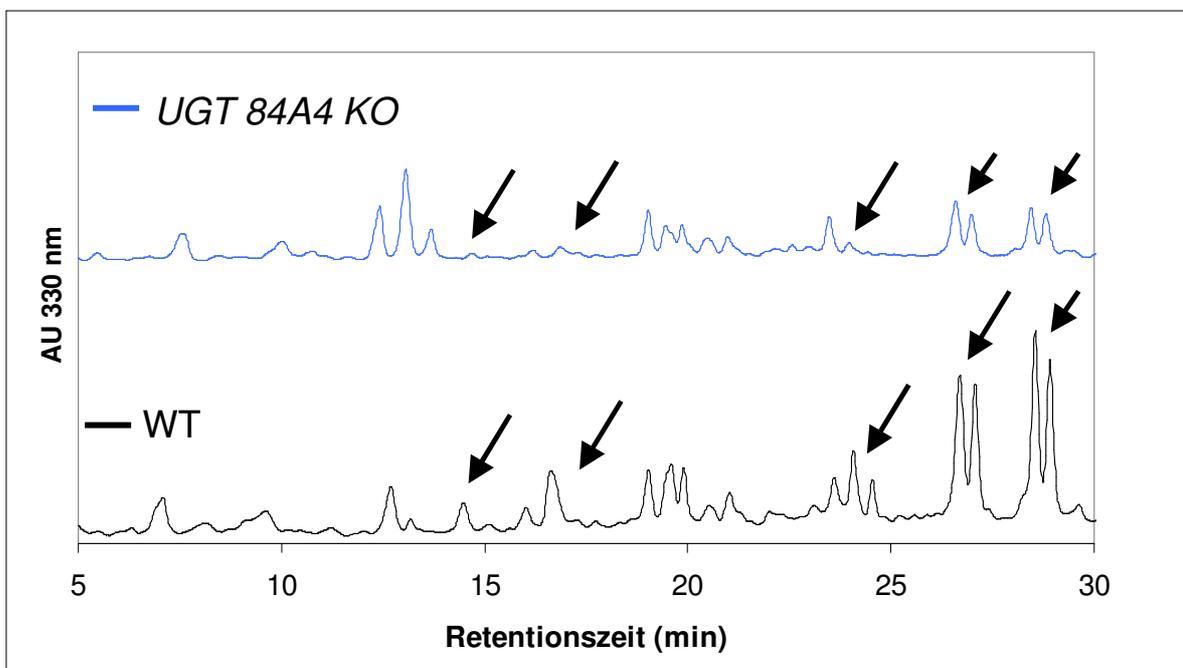


Abbildung 3.25: HPLC-Chromatogramm bei 330 nm der Wurzel der Linie *UGT 84A4 KO* im Vergleich zum WT (Col.). Die Pfeile bezeichnen Peaks, die in der KO-Linie fehlen.

3.4. Überexpression der vier *UGT 84A1-4*-Gene

3.4.1. Genexpression in den *Arabidopsis*-Transformanden

Die Glucosyltransferasen *UGT 84A1-4* zeigen die höchste Aktivität in der Samen- und Keimlingsentwicklung. Ansonsten scheint eine geringe Aktivität in späteren Stadien auszureichen, um die Synthese der Sinapatester aufrecht zu erhalten. Es stellte sich nun die Frage, ob es zu Veränderungen im HCA-Stoffwechsel kommt, wenn die vier Glucosyltransferasen überexprimiert werden.

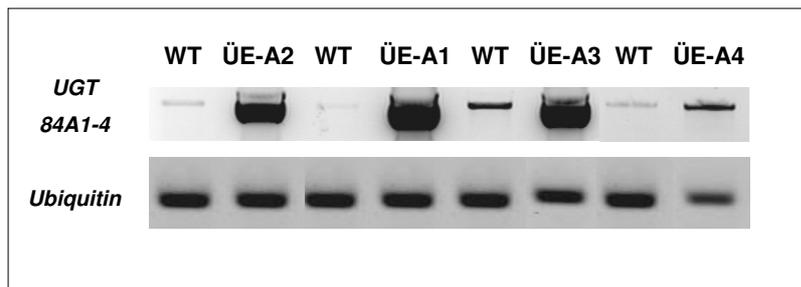


Abbildung 3.26: RT-PCR der Überexpressionslinien (ÜE) von *Arabidopsis thaliana*. Es wurde je 1 µg RNA aus Rosettenblättern in cDNA umgeschrieben und für die PCR mit 30 Zyklen verwendet. Als Primer wurden die *UGT 84A1-4* 400er verwendet (siehe Tabelle 7.1 im Anhang). Die Banden der jeweiligen Wildtyp-Proben wurden mit den gleichen Primern wie die darauffolgenden ÜE-Linien generiert. Als konstitutives Gen diente Ubiquitin.

Abbildung 3.26 zeigt das Agarosegel der semiquantitativen RT-PCR (30 Zyklen) von cDNA aus Rosettenblättern von *Arabidopsis thaliana*. Dabei ist die Überexpression der vier Glucosyltransferasen deutlich zu erkennen. Zur Bestätigung wurde mit cDNA aus weiteren Rosettenblättern noch eine RT qPCR durchgeführt. Auch hier ist die Überexpression der einzelnen Glucosyltransferasen klar zu erkennen (Daten sind nicht gezeigt). *UGT 84A1* ist dabei am stärksten überexprimiert, gefolgt von *UGT 84A3* und *UGT 84A2*. Das Gen der *UGT 84A4* ist im Vergleich zu den anderen Genen geringer überexprimiert.

3.4.2. UGT-Aktivitätstests der Überexpressionslinien

Die Auswirkungen der verstärkten Genexpression auf die HCA-GT-Aktivität gegenüber Hydroxyzimtsäuren und UDP-Glucose wurden getestet. Im Wildtyp war der Umsatz von Hydroxyzimtsäuren zu HCA-Estern in Rosettenblättern gering. Deshalb sollte sich hier die Überexpression stärker auswirken als in Geweben, in denen die vier Glucosyltransferasen ohnehin eine erhöhte Aktivität aufweisen (z.B. in den Keimlingen). Abbildung 3.27 gibt die UGT-Aktivitäten der Überexpressionslinien im Vergleich zum Wildtyp wieder. Neben den Hydroxyzimtsäuren wurde auch Zimtsäure als Substrat verwendet. Dieses Substrat konnte in keiner der untersuchten Pflanzenlinien mit Glucose verestert werden.

Die Proteinrohextrakte aus Pflanzen mit dem überexprimierten Gen der *UGT 84A1* zeigen gegenüber allen Hydroxyzimtsäuren im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte Aktivität an (siehe Abbildung 3.27 A). Eine signifikante Steigerung der Aktivität ist gegenüber Cumarsäure und Ferulasäure zu erkennen. Gegenüber diesen Substraten hat die UGT 84A1 auch *in vitro* die größte spezifische Aktivität (Lim et al, 2001).

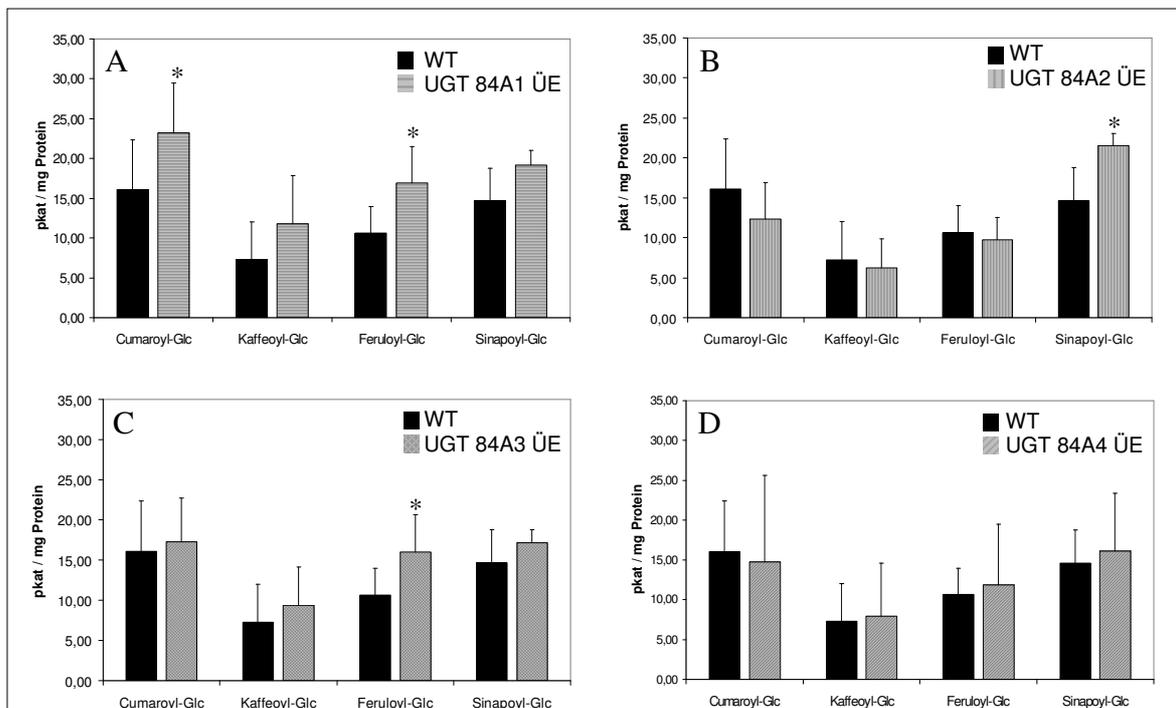


Abbildung 3.27: HCA-GT-Aktivität der Überexpressionslinien (ÜE) in Rosettenblättern von *Arabidopsis thaliana*. Es wurden je $n = 6$ unabhängige Proben vermessen. Ein * bedeutet, dass ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp (WT) und Überexpressionslinien (ÜE) vorlag ($p < 0,05$; T-Test).

Bei Pflanzen mit der überexprimierten *UGT 84A2* (siehe Abbildung 3.27 B) zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Aktivität gegenüber Sinapinsäure. Gegenüber Cumar-, Kaffee- und Ferulasäure konnte kein Unterschied zwischen Wildtyp und überexprimierten Linien festgestellt werden. Dies steht im Einklang mit der *in vitro* gemessenen Substratspezifität der UGT 84A2 (Lim et al, 2001).

Die Proteinrohextrakte von Pflanzen, in der die *UGT 84A3* überexprimiert war, zeigten eine höhere Aktivität gegenüber Cumar-, Kaffee-, Ferula- und Sinapinsäure, so wie es auch bei der Überexpressionslinie der *UGT 84A1* der Fall war (siehe Abbildung 3.27 A und C). Allerdings ist hier eine signifikante Erhöhung der Enzymaktivität nur gegenüber Ferulasäure zu beobachten. In den *in-vitro*-Untersuchungen von Lim (2001) ist die spezifische Aktivität der UGT 84A3 ebenfalls gegenüber Ferulasäure am höchsten.

Die Überexpressionslinien der *UGT 84A4* wiesen keine Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp (Col.) auf (siehe Abbildung 3.27 D). *In-vitro*-Studien konnten jedoch belegen,

dass die UGT 84A4 ebenfalls Cumar-, Kaffee-, Ferula- und Sinapinsäure mit UDP-Glucose verestern kann (Milkowski et al, 2000b). Die Überexpression der *UGT 84A4* war im Vergleich zu den anderen drei UGTs schwächer ausgeprägt (siehe Abbildung 3.26). Möglicherweise ist eine stärkere Überexpression dieses Gens nötig, um eine erhöhte Enzymaktivität zu erreichen.

3.4.3. Die löslichen HCA-Metabolite

Im folgendem wurde untersucht, ob die Überexpression der einzelnen UGTs einen Einfluss auf die Zusammensetzung der Metabolite in verschiedenen Organen von Arabidopsis hat. Dazu wurden methanolische Extrakte aus Samen, Keimlingen und Rosettenblättern der Überexpressionslinien analysiert. Abbildung 3.28 zeigt die Ergebnisse der HPLC-Analysen.

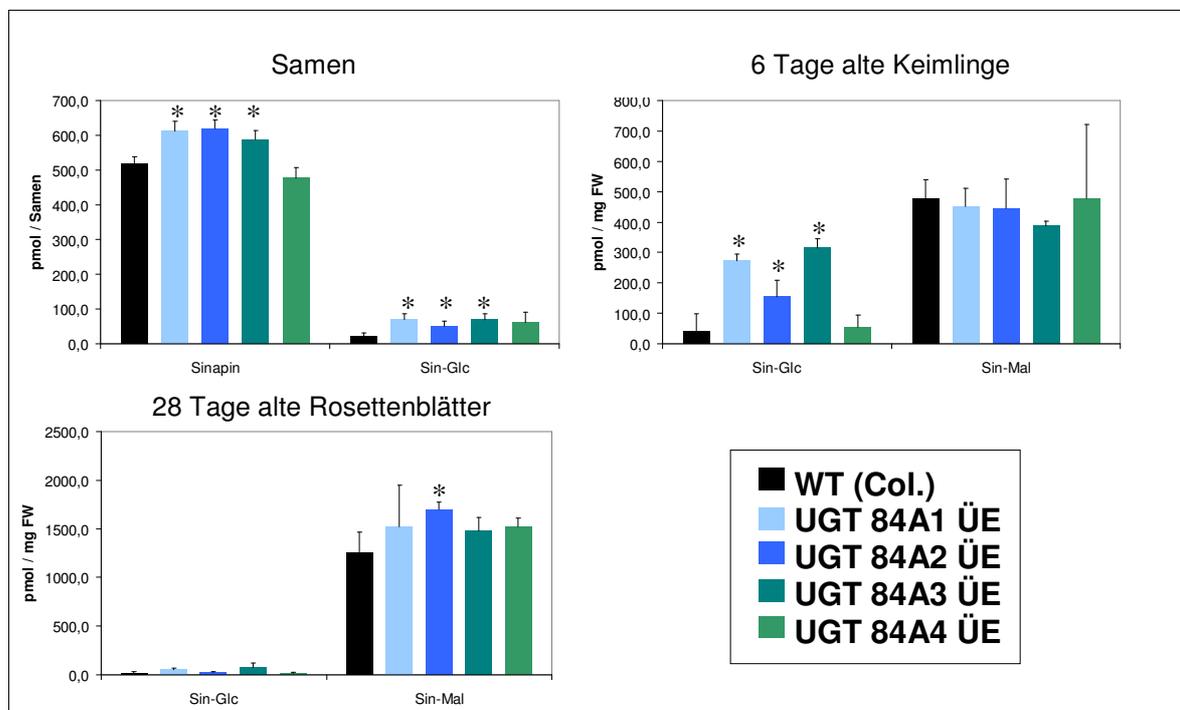


Abbildung 3.28: HPLC-Analysen der Überexpressionslinien (ÜE) *UGT 84A1-4* im Vergleich zum Wildtyp in verschiedenen Organen. Für die Analyse der Samen bezieht sich der Gehalt in pmol auf einen Samen, während sich der Gehalt in 6 Tage alten Keimlingen und den Rosettenblättern auf mg FW bezieht. Ein * bedeutet, dass ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und überexprimierter Linie vorlag ($p < 0,05$; T-Test). Es konnten $n = 6$ unabhängige Proben gemessen werden.

Der Sinapoylglucose-Gehalt ist in den Linien mit den überexprimierten Glucosyltransferasen *UGT 84A1*, *A2* und *A3* im Samen und in 6 Tage alten Keimlingen signifikant erhöht. Die Linie mit der überexprimierten *UGT 84A4* zeigt gegenüber dem Wildtyp keinen signifikanten Unterschied im Gehalt an Sinapoylglucose in den hier untersuchten drei Stadien. In den Rosettenblättern der Überexpressionslinien *UGT 84A1*, *A2* und *A3* kam es zu einem leichten Anstieg im Sinapoylglucose-Gehalt gegenüber dem Wildtyp. Aufgrund der Standardabweichungen war dieser Anstieg aber nicht signifikant.

Der Sinapin-Gehalt ist ebenfalls nur in den Linien der überexprimierten *UGT 84A1*, *A2* und *A3* signifikant erhöht, während sich in der Linie der *UGT 84A4* kein Unterschied zum Wildtyp (Col.) belegen läßt. In 6 Tage alten Keimlingen und in Rosettenblättern konnte kein Sinapin detektiert werden.

Der Sinapoylmalat-Gehalt ist in 6 Tage alten Keimlingen nicht erhöht im Vergleich zum Wildtyp in allen Überexpressionslinien. Erst in Rosettenblättern kann ein Anstieg des Sinapoylmalat-Gehalts belegt werden. Dieser ist aber nur in der Überexpressionslinie *UGT 84A2* signifikant.

Trotz der starken Erhöhung der Transkriptmenge in den Überexpressionslinien können mit Hilfe der HPLC nur schwache Effekte beobachtet werden. Der Sinapoylglucose-Gehalt wird zwar teilweise gesteigert, der Einfluss auf die Folgeprodukte bleibt aber gering, obwohl es zum Teil zu signifikanten Anstiegen kommt (z. B. Sinapin-Gehalt in Samen). Möglicherweise ist dabei das Vorhandensein der entsprechenden Substrate in den Zellen der Pflanzen der limitierende Faktor. Zusätzliche HCA-Glucose-Ester konnten in den Überexpressionslinien durch HPLC-Analysen nicht detektiert werden.

3.4.4. Die Zellwand-gebundenen HCAs

Durch die Analyse der Überexpressionslinien sollte der Einfluss der Glucosyltransferasen UGT 84A1-4 auf die Zusammensetzung des Hydroxyzimtsäure-Pools in Zellwänden überprüft werden (Abbildung 3.29 A und B).

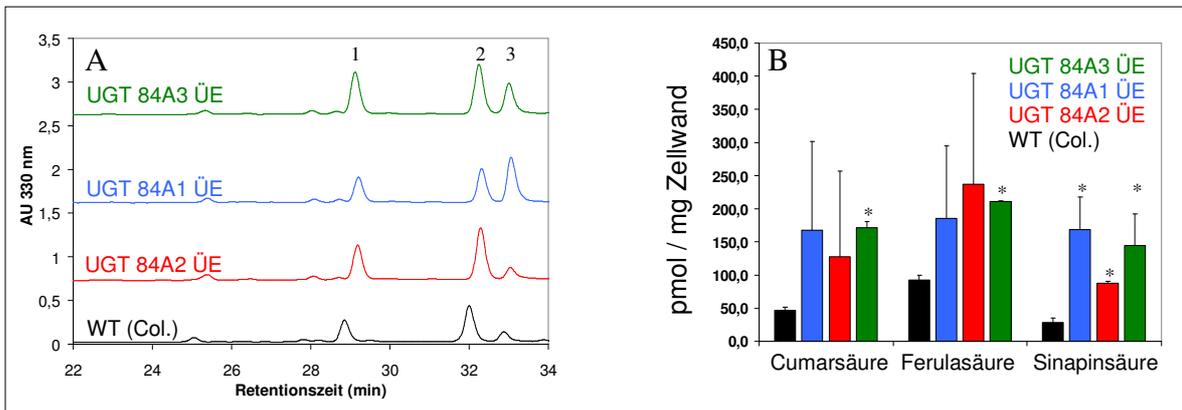


Abbildung 3.29: HPLC-Analyse der Zellwände der Überexpressionslinien (ÜE) im Vergleich mit dem Wildtyp. (A) Chromatogramm der Zellwand-Analyse (Peak 1 = Cumarsäure, Peak2 = Ferulasäure und Peak 3 = Sinapinsäure). (B) Quantitative Auswertung der Zellwandanalyse mit $n = 6$ Proben. Die Identifizierung der Peaks erfolgte mit Hilfe von Standardsubstanzen.

Der Gehalt an Sinapinsäure ist in den überexprimierten Linien der *UGT 84A1*, *A2* und *A3* signifikant gegenüber dem Wildtyp (Col.) erhöht. Cumarsäure und Ferulasäure zeigen in der Linie der *UGT 84A3* ebenfalls signifikant größere Werte. Diese beiden Hydroxyzimtsäuren sind zwar in der Überexpressionslinie *UGT 84A1* und *UGT 84A2* ebenso vermehrt in die Zellwand eingebaut worden, allerdings sind hier die Standardabweichungen sehr hoch, so dass keine Signifikanz gegeben war. Die Überexpressionslinie der *UGT 84A4* zeigte keine Unterschiede gegenüber dem Wildtyp.

Prinzipiell kann durch die Überexpression der *UGT 84A1*, *A2* und *A3* die Zusammensetzung der Zellwand verändert werden, während in den löslichen Fraktionen nur der Gehalt an Sinapinsäure-Konjugaten beeinflusst wird (siehe Abbildung 3.28).

3.5. LC-MS-Analysen von Samen mit modulierter UGT-Aktivität

In diesem Experiment wurden die Samen der Überexpressionslinien (*UGT 84A1-4*) und von vier KO-Linien (*UGT 84A1-4 KO*) mittels Kapillar HPLC/ESI-QTOF-MS im Rahmen eines ungerichteten Metabolitenprofilings untersucht (von Roepenack-Lahaye et al., 2004). Ziel dieser Untersuchung war es, Unterschiede im Metaboliten-Gehalt zwischen dem Wildtyp und den genetisch veränderten Linien zu finden, die mit Hilfe der HPLC nicht zu detektieren waren. Dazu wurden im ersten Schritt der Analyse differentielle Signale zwischen Wildtyp und den transgenen Linien identifiziert. Es wurden nur solche Signale als differentiell angesehen, welche sich um mindestens den Faktor 2 unterschieden (mit $p < 0,01$). In Tabelle 3.4 ist die Anzahl der erhaltenen alignierbaren und differentiellen Signale aus paarweisen Vergleichen von Wildtyp und transgenen Linien aufgeführt. Zur Ableitung von Strukturhypothesen wurden stossinduzierte Tandem-Massenspektren generiert und nach Berechnung der Elementzusammensetzungen der Fragmentationen und des Mutterions interpretiert.

Tabelle 3.4: Anzahl der erhaltenen Signale der LC-MS-Analyse von Arabidopsis-Samen

Alignment		Anzahl der alignierbaren Signale ¹		Anzahl der differentiellen Signale ²	
Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 1 > Gruppe 2	Gruppe 2 > Gruppe 1
<i>UGT84A1 KO</i>	Col-0	820	804	3	15
<i>UGT84A1 ÜE</i>	Col-0	799	727	5	3
<i>UGT84A2 KO</i>	No-0	1043	913	46	50
<i>UGT84A2 ÜE</i>	Col-0	899	1123	13	55
<i>UGT84A3 KO</i> ³	Col-0	1342	1010	74	51
<i>UGT84A3 ÜE</i>	Col-0	912	991	21	22
<i>UGT84A4 KO</i>	Col-0	982	920	29	4
<i>UGT84A4 ÜE</i>	Col-0	900	927	10	42

¹ S/N ≥ 3 , detektierbar und alignierbar in allen biologischen und technischen Replikaten der entsprechenden Gruppe

² Intensitätsverhältnis > 2.0 , $p < 0.01$, mittlere Intensität > 1000 counts

³ Daten von nur vier Replikaten verwendet

Die Veränderung der Genexpression der *UGT 84A1* hatte nur geringfügige Auswirkungen auf das Metabolitenprofil in Samen. In Linien mit veränderter Genexpression der *UGT 84A2*, *A3* und *A4* kommt es zu deutlicheren Unterschieden (siehe Tabelle 3.4). Für die *UGT 84A2 KO* konnten verschiedene Cholin-Ester identifiziert werden, die im Vergleich zum Wildtyp vermehrt oder reduziert vorlagen. Abbildung 3.30 gibt die Veränderungen schematisch wieder. Die Tabellen 3.5 und 3.6 geben die Identität der Cholin-Ester an, die in der KO-Linie vermehrt oder reduziert im Vergleich zum Wildtyp vorliegen. Für eine vollständige massenspektrometrische Charakterisierung der identifizierten Verbindungen siehe MS-MS-Spektren im Anhang.

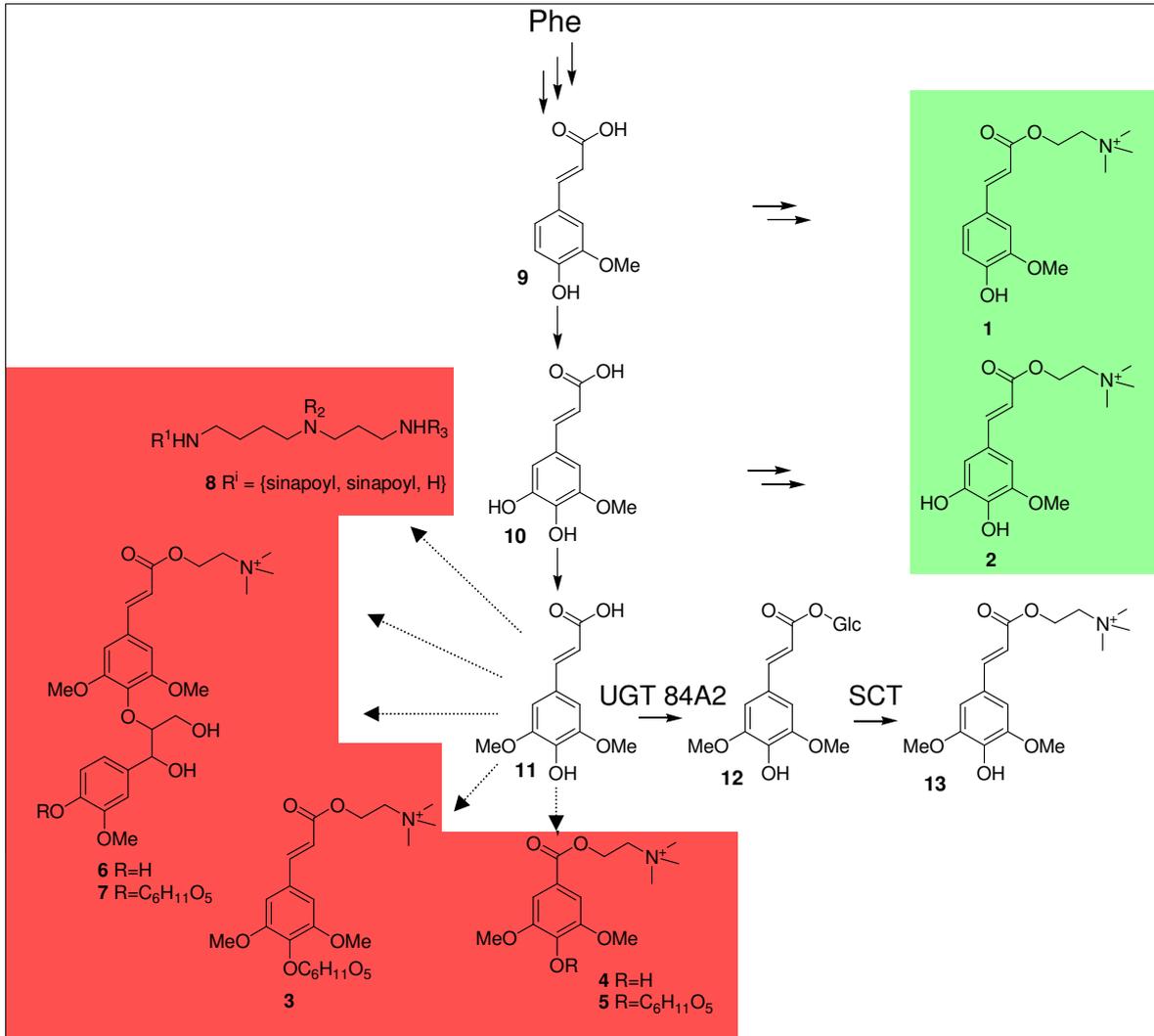


Abbildung 3.30: Veränderungen im Hydroxyzimtsäure-Stoffwechsel von Samen der Insertionsmutante *UGT 84A2 KO*. Farbig hinterlegt sind die Strukturen von Hydroxyzimtsäure-Konjugaten, die im Vergleich zum Wildtyp reduziert (grün) bzw. vermehrt (rot) vorliegen. Phe=L-Phenylalanin. SCT=1-*O*-Sinapoyl- β -D-glucose:Cholin-Sinapoyltransferase (EC 2.3.1.91), 9=Ferulasäure, 10=5-Hydroxyferulasäure, 11=Sinapinsäure, 12=Sinapoylglucose, 13=Sinapoylcholin (Sinapin). Substanzen 1-8 siehe Tabelle 3.5 und 3.6.

Tabelle 3.5: HCA-Ester, welche im Samen von *UGT 84A2 KO* gegenüber der Wildtyp Linie erniedrigt sind

No.	Name	t_r [min]	ESI(+)-TOF-MS Quantifier Ion (m/z)	fold change	p
1	FC	19.7	280.15 [M] ⁺	5.0	3.5×10^{-8}
2	5-OH-FC	21.5	296.15 [M] ⁺	7.9	2.8×10^{-8}

FC = Feruloylcholin

Tabelle 3.6: HCA-Ester, welche im Samen von *UGT 84A2 KO* gegenüber der Wildtyp Linie erhöht sind

No.	Name	t_r [min]	ESI(+)-TOF-MS Quantifier Ion (m/z)	fold change	p
3	SC 4- <i>O</i> -Hexosid	17.5	472.22 [M] ⁺	16.9	1.1×10^{-7}
4	SyC	18.7	284.15 [M] ⁺	12.4	1.7×10^{-5}
5	SyC 4- <i>O</i> -Hexosid	10.2	446.20 [M] ⁺	9.5	6.4×10^{-4}
6	SC(4- <i>O</i> - β)G	25.4	506.24 [M] ⁺	2.4	4.2×10^{-7}
7	SC(4- <i>O</i> - β)G 4'- <i>O</i> -Hexosid	21.6	668.29 [M] ⁺	7.2	3.1×10^{-5}
8	<i>N,N'</i> -Bis(sinapoyl)spermidin	27.2	558.28 [M+H] ⁺	2.4	2.2×10^{-5}

SC = Sinapoylcholin, FC = Feruloylcholin, SyC = Syringoylcholin, G=Guaiacyl

Durch den Ausfall der *UGT 84A2* kommt es zu einer verminderten Synthese von Sinapoylglucose (siehe HPLC-Analyse der Linie *UGT 84A2 KO*, Abbildung 3.18). Der Gehalt an Sinapin wird jedoch nicht reduziert und erfüllt daher nicht die in der LC-MS-Analyse angelegten Kriterien für differentielle Signale. Trotzdem scheint der Fluß von Sinapinsäure zu Sinapoylglucose in der *KO*-Linie vermindert zu sein. Dadurch wird möglicherweise Sinapinsäure auch in andere Stoffwechselwege kanalisiert, und es entstehen vermehrt andere Cholin-Ester, wie z. B. Syringoylcholin (siehe Tabelle 3.6).

Der Ausfall des Gens *UGT 84A2* in Samen verursacht Veränderungen im Metaboliten-Gehalt, die teilweise nur mit sehr sensitiven Methoden detektiert werden können. Quantitative Veränderungen im Metabolitenprofil ergeben sich nicht nur beim Produkt der *UGT 84A2* (Sinapoylglucose), sondern auch von anderen HCA-Konjugaten, die durch Umleitung der HCAs in vorhandene Stoffwechselwege entstehen.

3.6. Regulation des Sinapin-Stoffwechsels im Samen

Sinapin ist ein samenspezifischer Metabolit. Da die Akkumulation von Sinapin nur im Samen stattfindet, muss eine samenspezifische Regulation dieses Stoffwechsels vorliegen. Die Mutante *fus3* weist verringerte Gehalte an Sinapin im Samen auf. Das *FUS3*-Gen ist ein Transkriptionsfaktor und könnte daher bei der Regulation dieses Stoffwechsels eine Rolle spielen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde der Metaboliten-Gehalt im Samen und die Genexpression relevanter Gene dieser Mutante im Vergleich zum Wildtyp untersucht.

Zunächst wurde der Metaboliten-Gehalt in Samen von *Arabidopsis* und verschiedenen Mutanten analysiert. Abbildung 3.31 zeigt die HPLC-Chromatogramme (A) und die quantitative Auswertung der Daten (B). Während die *fus3-3*-Mutante eine Punktmutation im *FUS3*-Gen trägt, besitzt die *fus3-T*-Mutante eine T-DNA-Insertion im offenen *FUS3*-Leserahmen.

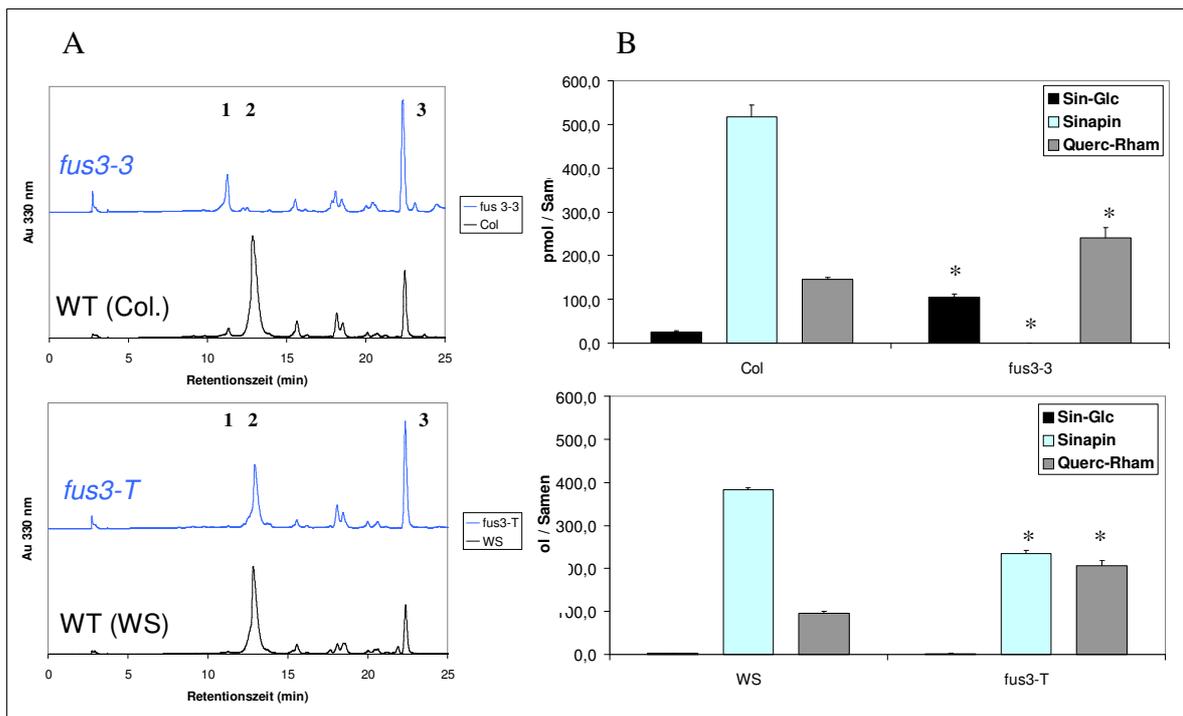


Abbildung 3.31: HPLC-Analyse von Extrakten aus Samen der Ökotypen WS und Col., sowie von *fus3-T* und *fus3-3*. (A) HPLC-Chromatogramme; Peak1=Sinapoylglucose; Peak2=Sinapin; Peak3=Quercetin-Rhamnosid. (B) Quantitative Auswertung. Es wurden n=3 unabhängige Messungen vorgenommen. Ein * bedeutet, dass ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und Mutanten vorlag (p < 0,05; T-Test).

In der Mutante *fus3-3* nimmt der Sinapoylglucose-Gehalt signifikant zu. Dies ist möglicherweise dadurch zu erklären, dass Sinapoylglucose nicht zu Sinapin umgesetzt werden kann und dadurch akkumuliert. Sinapin konnte in dieser Mutante nicht detektiert werden. Interessanterweise nimmt der Gehalt an Quercetin-Rhamnosid signifikant zu in

der *fus3-3*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp (Col.). Im WS-Hintergrund konnte keine Sinapoylglucose detektiert werden. Möglicherweise wird diese direkt zu Sinapin umgesetzt. Der Sinapin-Gehalt ist in der *fus3-T*-Mutante signifikant reduziert gegenüber dem Wildtyp (WS). Im Vergleich zur *fus3-3*-Mutante ist Sinapin hier aber immer noch deutlich detektierbar. Der Gehalt an Quercetin-Rhamnosid nimmt wie oben in der *fus3-T*-Mutante signifikant zu im Vergleich zum Wildtyp (WS).

Ob die unterschiedlichen Metaboliten-Gehalte auf eine veränderte Genexpression der *UGT 84A1-4* und der *SCT* zurückzuführen sind, wurde mit einer semiquantitativen RT-PCR untersucht.

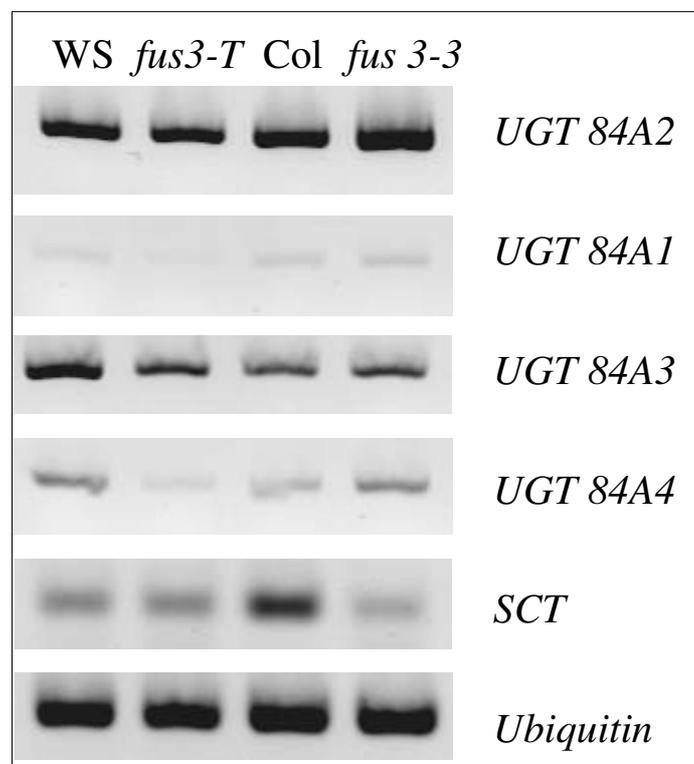


Abbildung 3.32: Semiquantitative RT-PCR (30 Zyklen) von Arabidopsis Samen. Als Primer wurden die *UGT 84A1-4* 400er und die *SCT* 200er verwendet (siehe Tabelle 7.1). Als konstitutives Gen wurde Ubiquitin eingesetzt.

Wie in Abbildung 3.32 zu sehen, ist die Genexpression der *UGT 84A1-A4* in den Mutanten im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp-Hintergrund nahezu unverändert. RT qPCR-Analysen ergaben ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression der Glucosyltransferasen (Daten nicht gezeigt). Die *SCT*-Expression ist jedoch in der *fus3-3*-Mutante reduziert gegenüber dem Wildtyp (Col.), während sie in der *fus3-T*-Mutante gleich bleibt im Vergleich zum WS-Ökotyp. Mit Hilfe der RT qPCR konnte dies bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

3.7. Der Einfluss von UV-Strahlung auf den HCA-Stoffwechsel

In der Literatur ist die Bedeutung von Hydroxyzimtsäure-Konjugaten für den Schutz gegenüber UV-Strahlung beschrieben (siehe Einleitung Abschnitt 1.3.). In diesem Zusammenhang sollte die Rolle der Glucosyltransferasen UGT 84A1-4 mit der Analyse der Genexpression, der UGT-Enzymaktivität von Blattextrakten und der Metabolitenzusammensetzung im Zytoplasma und in der Zellwand unter UV-Strahlung untersucht werden. Außerdem wurde der Frage nachgegangen, ob unter UV-Belastung die Pflanzen eher Sinapatester oder Flavonoide zum Schutz bilden.

3.7.1. Die Expression von Genen des HCA-Stoffwechsels unter UV-B-Strahlung

Mit Hilfe einer Datenbankanalyse aus dem Kapitel „Meta-Analyse“ von Genevestigator² konnte die Genexpression der vier Glucosyltransferasen *UGT 84A1-4* und weiterer wichtiger Gene des Phenylpropanstoffwechsels wie *PAL*, *SMT* und *CHS* unter Stressbedingungen analysiert werden (Abbildung 3.33).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
At3g53260 (PAL)	1.205	1.329	1.476	1.171		1.314	1.203	0.340	3.038	3.968	2.597	1.205	0.576	0.087					
At4g15500 (UGT 84A4)	1.257	1.293		1.181			1.257	0.696	1.733	0.690	0.755		0.845	0.371	0.718	0.768		1.605	
At4g15490 (UGT 84A3)				0.865	0.774				2.891	0.788	1.484	1.275	1.163	1.430	1.496	4.134	1.357	2.792	
At3g21560 (UGT 84A2)	3.278	5.281	7.326	2.073	2.607	5.614	3.278	0.634	2.817	5.286	1.851		0.667		0.552				0.793
At4g15480 (UGT 84A1)		3.353	3.340	0.831		30.135		350		4.264	4.084	3.25	0.686	0.563	0.601	0.355	1.617	0.452	0.546
At5g13930 (CHS)	8.590	15.527	32.215	3.178	2.069	24.504	8.590	0.773		11.305	2.179		0.753	1.628	0.411		0.808	0.680	0.830
At2g22990 (SMT)	1.27	1.170	1.291	1.246			1.27	106.644	4.795	0.143	0.305		0.851	0.716	0.775	0.422	0.808	0.590	

Abbildung 3.33: Genexpressionsanalyse mit Hilfe der Datenbank Genevestigator. Rot zeigt eine induzierte und grün eine reduzierte Genexpression im Vergleich zu Kontrollen ohne den Stressor an. Schwarz bedeutet eine unveränderte Genexpression im Vergleich zu Kontrollen. 1=erhöhte Lichtintensität; 2=blaue Lichtstrahlung; 3=langwellige Rotstrahlung; 4=Rotstrahlung; 5=UV-A-Strahlung; 6=UV-AB-Strahlung; 7=Weißlicht; 8=Seneszenz; 9=Kältestress 1; 10= Kältestress 2; 11=Kältestress 3; 12=Trockenstress; 13=Hitzestress 1; 14=Hitzestress 2; 15=Hypoxie; 16=osmotischer Stress; 17=oxidativer Stress; 18=Salzstress; 19=Verwundung.

UV-A-Strahlung bewirkt die verstärkte Genexpression der *UGT 84A2* und der *CHS* (siehe Spalte 5 in Abbildung 3.33). Unter UV-AB-Strahlung wird die Transkriptmenge weiter erhöht und weitere Gene werden induziert (z. B. *UGT 84A1*; siehe Spalte 6 in Abbildung 3.33). Dies läßt auf einen stärkeren Einfluss von UV-B-Strahlung auf die Expression der Glucosyltransferasen schließen. Sinapatester absorbieren zudem im UV-B-Wellenbereich (Sheahan, 1996). Zur genaueren Untersuchung der Genexpression der oben betrachteten Gene wurden deshalb Pflanzen zunächst 10 h erhöhter UV-B-Strahlung unter genau

² im Internet unter <https://www.genevestigator.ethz.ch>

definierten Bedingungen ausgesetzt, um den kurzzeitigen Einfluss von UV-B-Stress zu analysieren.

Abbildung 3.34 zeigt das Agarosegel einer semiquantitativen RT-PCR von Rosettenblättern unter UV-B-Bestrahlung im Vergleich zu Pflanzen ohne erhöhten UV-B-Anteil im Lichtspektrum (V693; siehe Tabelle 2.11).

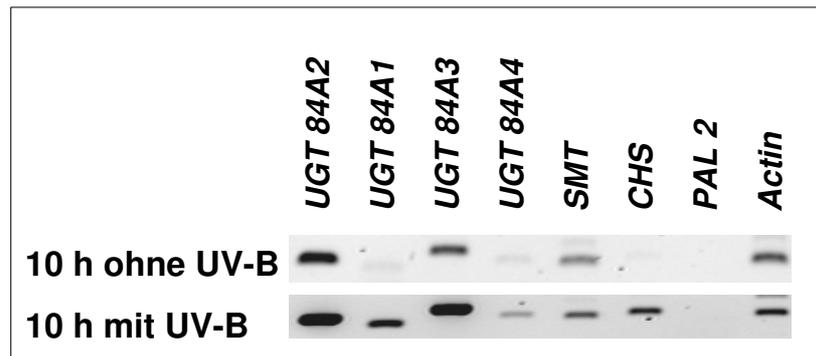


Abbildung 3.34: Semiquantitative RT-PCR von cDNA aus Rosettenblättern mit und ohne UV-B-Behandlung. Es wurden Rosettenblätter nach 10 h Behandlung geerntet (V693; siehe Tabelle 2.13) und mit Kontrollen ohne UV-B-Bestrahlung verglichen. Die RT-PCR konnte dreimal mit RNA aus verschiedenen Pflanzen wiederholt und das Ergebnis, wie hier gezeigt, reproduziert werden. Es wurden die 200er Primer verwendet (siehe Anhang, Tabelle 7.1). Actin wurde als konstitutive Kontrolle verwendet.

Die Genexpression von Pflanzen zum Zeitpunkt t_0 , d.h. zu Beginn der UV-B-Behandlung, unterschied sich nicht von den Kontrollen nach 10 h ohne UV-B-Stress. Die *UGT 84A1*, *A2*, *A3*, *A4* und *CHS* werden deutlich durch UV-B-Behandlung nach 10 h im Vergleich zu den Kontrollen induziert (Abbildung 3.34). RT qPCR-Analysen bestätigten die Zunahme der Genexpression dieser 5 Gene nach UV-B-Behandlung (nicht gezeigt). Die *SMT* ist nach den Daten von Genevestigator nicht durch UV-B-Strahlung induziert. Und auch die semiquantitative RT-PCR (Abbildung 3.34), sowie RT qPCR-Experimente (nicht gezeigt) ergaben, dass die Expression der *SMT* nach 10 h UV-B-Bestrahlung nicht induziert wird. Die Genexpression der *PAL 2* (At3g53260) konnte mit Hilfe der semiquantitative RT-PCR nicht detektiert werden. Selbst mit einer RT qPCR konnte kaum Transkript nachgewiesen werden.

Um den Effekt einer verlängerten UV-B-Exposition zu testen, wurden in einem weiteren Versuch (V695; siehe Tabelle 2.11) Pflanzen 6 d UV-B-Strahlung ausgesetzt. Abbildung 3.35 gibt die semiquantitative RT-PCR nach 6 d mit und ohne UV-B-Exposition wieder.

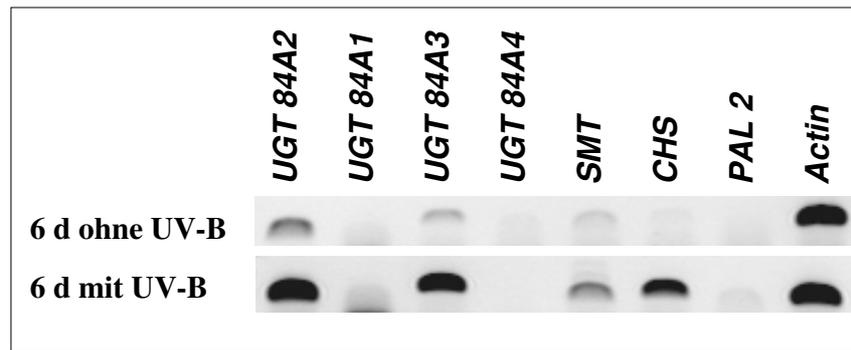


Abbildung 3.35: Semiquantitative RT-PCR von cDNA aus Rosettenblättern mit und ohne UV-B-Behandlung. Es wurden Rosettenblätter nach 6 d Behandlung geerntet (V695; siehe Tabelle 2.13) und mit Kontrollen ohne UV-B-Bestrahlung verglichen. Die RT-PCR konnte dreimal mit RNA aus verschiedenen Pflanzen wiederholt und das Ergebnis, wie hier gezeigt, reproduziert werden. Es wurden die 200er Primer verwendet (siehe Anhang, Tabelle 7.1). Actin wurde als konstitutive Kontrolle verwendet.

In der oben gezeigten RT-PCR ist zu erkennen, dass die Genexpression der *UGT 84A2* und *A3* durch UV-B nach 6 d induziert sind, während die Expression der *UGT 84A1* und *A4* nicht detektiert werden konnte. Nach 6 d UV-B-Bestrahlung konnte keine Expression für die *UGT 84A1* und *A4* nachgewiesen werden. Auch durch RT qPCR-Analysen war kaum Transkript der *UGT 84A1*, *A4* und der *PAL 2* nachzuweisen (nicht gezeigt). Die *CHS* ist nach 6 d deutlich UV-B induziert. Die *SMT* ist nach 6 d UV-B-Bestrahlung etwas stärker exprimiert als ohne UV-B-Exposition.

3.7.2. Der Einfluss von UV-B-Strahlung auf die UGT-Aktivität

Im folgenden sollte der Einfluss von UV-B-Strahlung auf die Enzymaktivität der UGT 84A1-4, sowie der SMT untersucht werden.

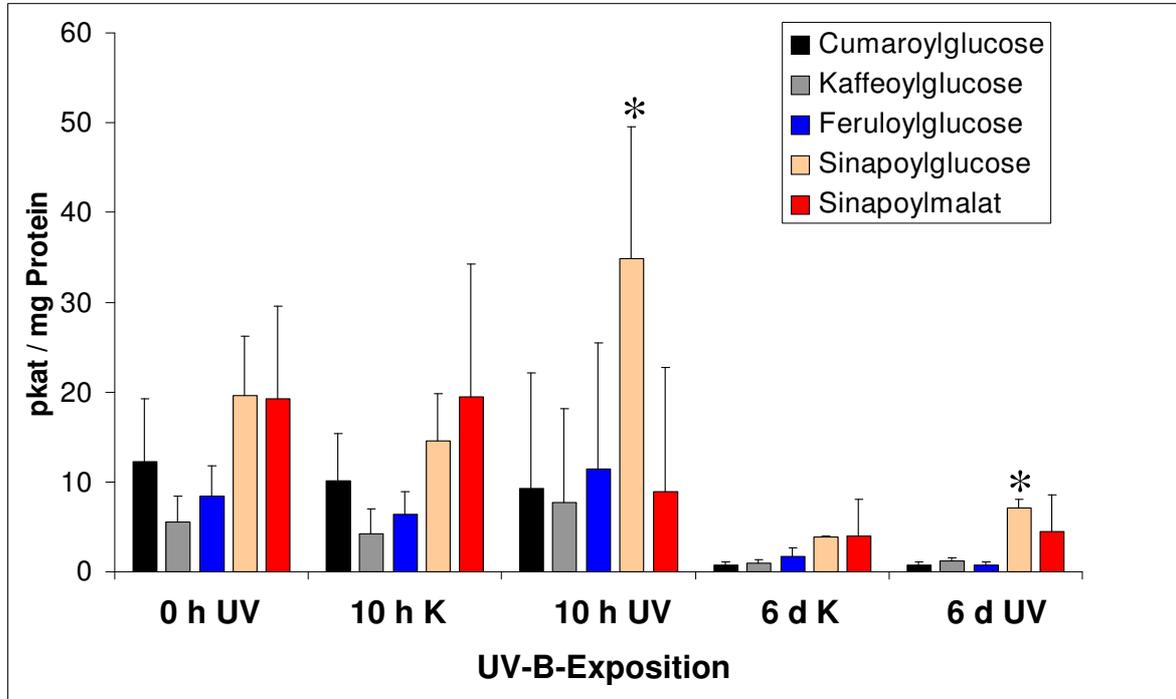


Abbildung 3.36: UGT-Aktivität von *Arabidopsis thaliana* (Col.) Rosettenblättern nach 10 h und 6 d UV-B-Bestrahlung (V693 und V695; siehe Tabelle 2.11). Es wurden n=6 unabhängige Proben vermessen; quantifiziert wurde die Produktbildung der HCA-Glucose-Ester. K=Kontrollen ohne UV-B-Behandlung. Ein * bedeutet, dass ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollen und UV-B behandelten Pflanzen vorlag ($p < 0,05$; T-Test).

Die Ergebnisse der Enzymaktivitätstest sind in Abbildung 3.36 zusammengefasst. Die Produktion von Sinapoylglucose ist dabei nach 10 h und 6 d signifikant erhöht im Vergleich zu Pflanzen, die ohne UV-B-Strahlung kultiviert wurden. Die Produktion der anderen HCA-Glucose-Ester wird nicht deutlich erhöht durch UV-B-Exposition. Die Aktivität der SMT ist nach 10 h UV-B-Exposition sogar herabgesetzt gegenüber den entsprechenden Kontrollen.

Interessanterweise ist die UGT-Enzymaktivität nach 10 h, also nach nur kurzzeitiger UV-B-Einwirkung stark erhöht, während nach 6 d UV-B-Stress die Aktivität sehr viel geringer ist. Aber auch hier ist die UGT-Aktivität gegenüber Sinapinsäure in Pflanzen nach UV-B-Behandlung signifikant verstärkt. Dies spricht für die Funktion der Ester-bildenden HCA-UGTs bei der Adaptation an UV-B-Stress, wobei sie offensichtlich eine wichtige Rolle in der Kurzzeit-Adaptation spielen.

3.7.3. Analyse der Metaboliten unter UV-B-Strahlung

Mit Hilfe der HPLC wurde der Einfluss von UV-B-Strahlung auf die Zusammensetzung der phenolischen Blatt-Metabolite untersucht. Nachdem die Analysen von Expression und Enzymaktivität eine Induktion der UGT 84A2 belegt haben, ist in Abbildung 3.37 ein signifikanter Anstieg des Sinapoylglucose- und Sinapoylmalat-Gehalts nach 10 h UV-B-Stress zu erkennen. Bei der Messung der Flavonoide wurden alle Quercetin- bzw. Kaempferol-Derivate zusammengefasst, da hier der Einfluss von UV-B-Strahlung auf den gesamten Flavonoid-Gehalt untersucht werden sollte. Nach 10 h und 6 d UV-B-Stress kommt es zu einem deutlichen Anstieg von Kaempferol- und Quercetin-Derivaten im Vergleich zu Kontrollen, wobei vor allem der Gehalt an Quercetin in den UV-B behandelten Proben stark ansteigt (siehe Abbildung 3.37). Interessanterweise ist nach 6 d UV-B-Stress der Gehalt an Sinapoylmalat geringer als in Kontrollpflanzen. Zwar ist der Sinapoylglucose-Gehalt noch signifikant erhöht, aber der Anstieg im Gehalt an Flavonoiden ist nach 6 d deutlich stärker als der von Sinapatestern. Die HPLC-Analysen bestätigen demnach die Hypothese, dass Sinapatester nach kurzzeitiger UV-B-Einwirkung verstärkt gebildet werden, bei längerfristiger UV-B-Strahlung werden aber vor allem vermehrt Flavonoide synthetisiert.

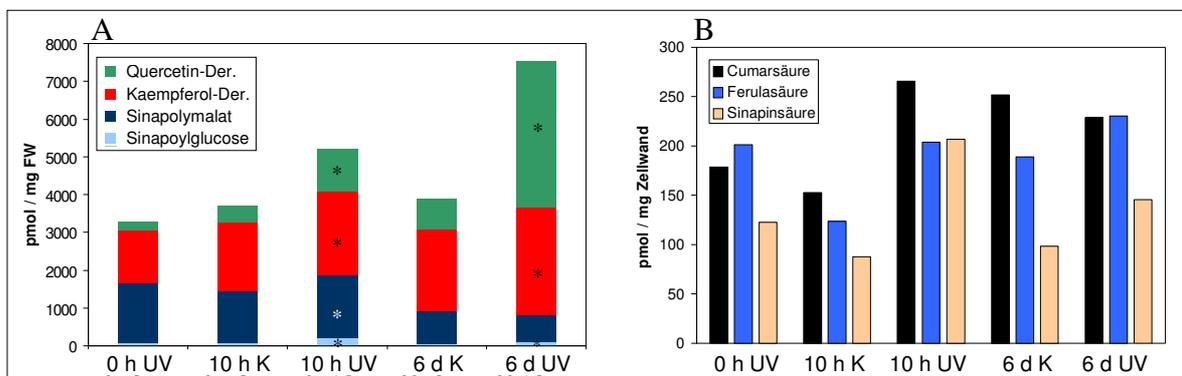


Abbildung 3.37: (A) und (B) HPLC-Analysen der Metaboliten von Rosettenblättern (WT Col.) nach 10 h und 6 d UV-B-Behandlung (V693 und V695). Es wurden n=6 unabhängige Proben vermessen. Es sind jeweils die Mittelwerte von je 6 Proben angegeben. Die Standardabweichung betrug maximal 10%. Alle Derivate von Kaempferol oder Quercetin wurden zusammengefasst. Bei der Zellwand-Analyse (B) wurde eine Einfachbestimmung vorgenommen. K=Proben ohne UV-B-Behandlung. Ein * bedeutet, dass ein signifikanter Unterschied zwischen UV-B behandelten und unbehandelten Proben vorlag ($p < 0,05$; T-Test).

Um die Auswirkungen des UV-B-Stresses auf den HCA-Gehalt der Zellwände zu untersuchen, wurden im Versuch V 695 (siehe Tabelle 2.11) auch die unlöslichen Rückstände analysiert. Da das Material limitierend war, wurde nur eine Einfachbestimmung durchgeführt. Wie in Abbildung 3.37 B zu sehen ist, wird der Sinapinsäure-Gehalt in der Zellwand nach 10 h und 6 d UV-B-Behandlung erhöht gegenüber Proben ohne den Einfluss von UV-B-Strahlung. Das gleiche gilt für Ferulasäure. Cumarsäure ist nur nach 10 UV-B-Behandlung deutlich erhöht. Zur Absicherung dieser Tendenz sollten jedoch noch weitere Proben untersucht werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass vor allem die Synthese von Sinapoylglucose bei UV-B-Stress gesteigert wird. Dies scheint vor allem auf eine erhöhte Genexpression der *UGT 84A2* zurückzuführen zu sein. Wahrscheinlich wird auch in den Zellwänden unter erhöhter UV-B-Strahlung mehr Sinapinsäure eingelagert. Auch die *UGT 84A3* zeigt eine verstärkte Genexpression. Da dieses Enzym vor allem Ferulasäure umsetzt, ist eine Erhöhung der UGT-Aktivität gegenüber Ferulasäure und der vermehrte Einbau von Ferulasäure in die Zellwand vermutlich auf die *UGT 84A3* zurückzuführen. Zudem konnte belegt werden, dass die UGT-Aktivität (A2 und A3) und die Bildung von Sinapatestern vor allem nach kurzzeitiger UV-B-Einwirkung zunimmt, während Flavonoide nach längerfristigem UV-B-Stress stark akkumulieren.

3.7.4. Untersuchung der Linie *UGT 84A2 KO* unter UV-B-Stress

Für den Versuch V695 (siehe Tabelle 2.11) stand die Linie *UGT 84A2 KO* zur Verfügung. Die Frage lautete nun, wie die Pflanze auf UV-B-Stress reagiert, wenn die Aktivität der *UGT 84A2* reduziert ist.

Zur Überprüfung wurde die Enzymaktivität der *UGT 84A2* unter UV-B-Stress untersucht. Hier kommt es, wie schon in Abschnitt 3.3.1 (siehe Abbildung 3.17) gezeigt, zu einer starken Reduktion der UGT-Aktivität gegenüber Sinapinsäure (siehe Abbildung 3.38) in der Linie *UGT 84A2 KO* gegenüber dem Wildtyp (No-0).

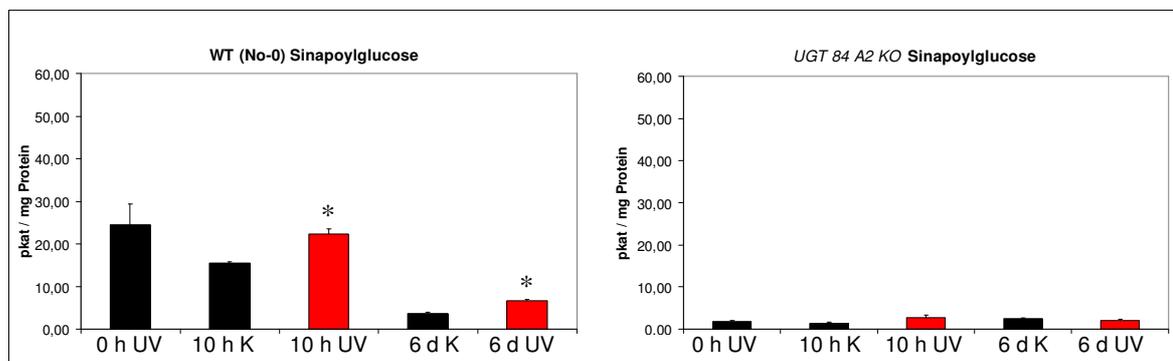


Abbildung 3.38: UGT-Aktivitätstest von Rosettenblättern der *UGT 84A2 KO* Linie im Vergleich zum Wildtyp (No-0) mit und ohne UV-B-Bestrahlung. Es wurden n=3 unabhängige Messungen vorgenommen. Ein * bedeutet, dass ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und UV-B behandelten Proben vorlag ($p < 0,05$; T-Test). K=Kontrollen ohne UV-B-Bestrahlung (schwarze Balken); mit UV-B-Bestrahlung (rote Balken; V695; siehe Tabelle 2.11).

Der Einfluss auf den Metaboliten-Gehalt wurde mit Hilfe von HPLC-Analysen untersucht. In Abbildung 3.39 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen abgebildet. Sowohl der Sinapoylglucose-Gehalt, der unter UV-B-Stress signifikant erhöht wird, als auch die Akkumulation von Sinapoylmalat unterscheidet sich nicht wesentlich vom Wildtyp (siehe Abbildung 3.37; zwischen den Ökotypen Col. und No-0 konnten keine wesentlichen

Unterschiede bei den HPLC-Analysen in Rosettenblättern in Versuch V695 gefunden werden). Quercetin- und Kaempferol-Derivate akkumulieren in der Linie *UGT 84A2 KO* ebenfalls nach 10 h und 6 d UV-B-Bestrahlung gegenüber unbehandelten Proben.

Die Zellwand-Analyse der Linie *UGT 84A2 KO* ergab einen verringerten Gehalt an Sinapinsäure im Vergleich zum Wildtyp (siehe Abbildung 3.37). Nach 10 h UV-B-Exposition ist aber in den Zellwänden gestresster Blätter mehr Sinapinsäure enthalten als in ungestressten, während nach 6 d UV-B-Bestrahlung keine Unterschiede mehr zu sehen sind. Allerdings handelt es sich um eine Einfachbestimmung, da auch hier nicht ausreichend Material zur Verfügung stand.

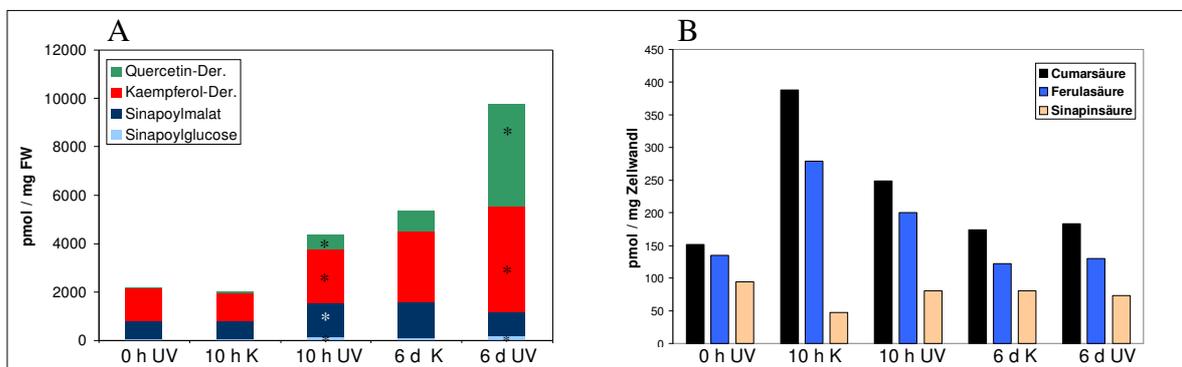


Abbildung 3.39: (A) und (B) HPLC-Analysen der Metaboliten von Rosettenblättern (*UGT 84A2 KO*) nach 10 h und 6 d UV-B-Behandlung (V695). Es wurden $n=6$ unabhängige Proben vermessen. Es sind jeweils die Mittelwerte von je 6 Proben angegeben. Die Standardabweichung betrug maximal 10%. Alle Derivate von Kaempferol oder Quercetin wurden zusammengefasst. (B) Bei der Zellwand-Analyse wurde eine Einfachbestimmung vorgenommen. K=Proben ohne UV-B-Behandlung. Ein * bedeutet, dass ein signifikanter Unterschied zwischen UV-B behandelten und unbehandelten Proben vorlag ($p < 0,05$; T-Test).

Zusammenfassend kann zu der Untersuchung der Linie *UGT 84A2 KO* gesagt werden, dass die starke Reduktion der UGT-Aktivität gegenüber Sinapinsäure nicht ausreicht, um die Zusammensetzung der Metaboliten unter UV-B-Stress zu verändern. Die Reduktion der UGT 84A2-Aktivität wird auch nicht durch die Erhöhung der Genexpression einer anderen UGT (84A1, 84A3 oder 84A4) oder Enzymaktivität kompensiert. In der Linie *UGT 84A2 KO* war die Genexpression der *UGT 84A1*, *A3*, *A4*, *SMT*, *CHS* und *PAL2* wie im Wildtyp und auch die Synthese der anderen HCA-Ester blieb unverändert.

Erste Analysen der Metabolite in den KO-Linien der UGT 84A1, A3 und A4 mit und ohne UV-B-Bestrahlung deuteten an, dass auch hier keine signifikanten Unterschiede gegenüber dem Wildtyp vorliegen.

3.7.5. Sinapatester und Flavonoide als UV-Schutzpigmente im Vergleich

In der Literatur wird entweder die Bedeutung der Flavonoide oder die der Sinapatester für den Schutz gegenüber UV-Strahlung hervorgehoben (Li et al., 1993; Sheahan, 1996). Im Versuch V693 (siehe Tabelle 2.11) standen Mutanten zur Verfügung, mit denen der Anteil dieser beiden Substanzklassen am UV-Schutz abgeschätzt werden sollte. So wurde zum einen die *tt4*- Mutante untersucht, die keine Flavonoide mehr produziert. Zum anderen stand die *sng1*- Mutante zur Verfügung, die kein Sinapoylmalat mehr synthetisiert.

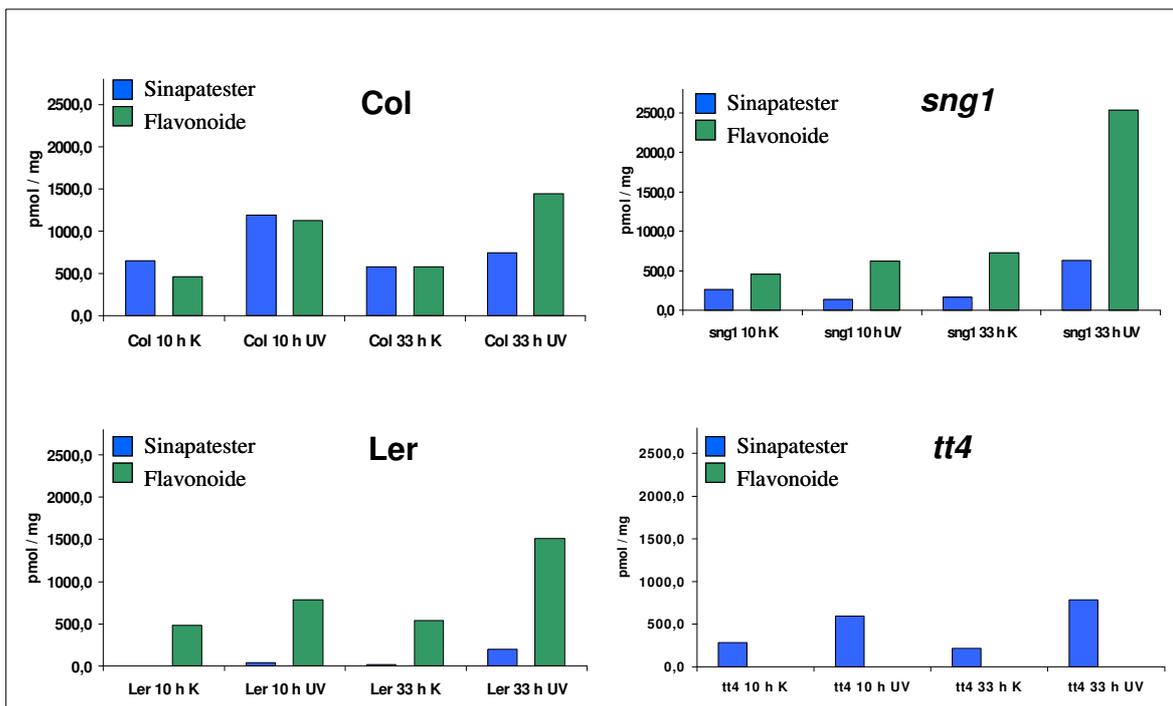


Abbildung 3.40: HPLC-Analysen von Rosettenblättern unter UV-B-Stress. Es wurde die *sng1*-Mutante mit dem Col-0-Hintergrund und die *tt4*-Mutante mit dem entsprechenden Ler-Hintergrund verglichen. Von je drei Proben wurde der Gesamtgehalt an Flavonoiden und an Sinapatestern (Sinapoylglucose und Sinapoylmalat) bestimmt und die Mittelwerte davon im Diagramm angegeben. Die Standardabweichung betrug maximal 10%. K=Kontrollen ohne UV-B-Behandlung.

Wie in Abbildung 3.40 zu sehen ist, reagiert der Wildtyp (Col.) nach 10 h UV-B-Stress mit vermehrter Produktion von Sinapatestern und Flavonoiden. Nach 33 h UV-B-Behandlung wird der Flavonoid-Gehalt weiter gesteigert, während der Gehalt an Sinapatestern wieder leicht abnimmt. Nach 6 Tagen (nicht gezeigt) setzt sich dieser Trend fort. Flavonoide akkumulieren nach 6 Tagen UV-B-Stress weiter gegenüber 33 h UV-B, während Sinapatester auf dem Niveau der Werte nach 33 h UV-B bleiben. Fehlt Sinapoylmalat in den Pflanzen, wie in der *sng1*-Mutante, kann nach 10 h UV-B-Stress der Gesamt-Sinapatester-Gehalt nicht wie im Wildtyp (Col.) gesteigert werden. Aber auch die Flavonoide nehmen nicht so stark zu. Erst nach 33 h kann Sinapoylglucose den Ausfall von Sinapoylmalat ausgleichen, wobei zu diesem Zeitpunkt eine stark gesteigerte

Flavonoid-Synthese zu beobachten ist. Es sieht demnach so aus, als ob die Pflanze auf den Ausfall von Sinapoylmalat mit einer gesteigerten Synthese von Flavonoiden reagiert. Aber nach 10 h UV-B-Stress konnte noch keine Kompensation durch Flavonoide in der *sng1*-Mutante beobachtet werden. Flavonoide sind folglich eher Langzeit-UV-induziert. Interessanterweise reagiert der Ökotyp Ler gänzlich anders als Col-0. Hier ist eine sehr geringe Produktion an Sinapatestern zu beobachten. Erst nach 33 h UV-B-Stress kann eine vermehrte Synthese gemessen werden, die aber unter der Produktion des nicht gestressten Columbia Ökotyps bleibt. In der *tt4*-Mutante, die keine Flavonoide mehr synthetisieren kann, werden dagegen vermehrt Sinapatester unter UV-B-Stress gebildet. Der Ausfall der Flavonoide scheint demnach durch die vermehrte Synthese von Sinapatestern partiell kompensiert zu werden, wenn die Mutante mit dem entsprechenden Ler Hintergrund verglichen wird. Wird die *tt4*-Mutante allerdings mit dem Columbia Wildtyp verglichen, kann keine vermehrte Produktion von Sinapatestern gemessen werden. Auf Transkript-Ebene konnten zwischen den beiden Ökotypen Col-0 und Ler Unterschiede beobachtet werden (Abbildung 3.41). Nach 10 h UV-B-Stress ist die Genexpression der *UGT 84A1-4* im Ler-Hintergrund geringer als bei Columbia. Die *CHS* und die *PAL* scheinen dagegen beim Ökotyp Ler stärker exprimiert zu sein. Auffallend ist, dass die *UGT 84A1* im Ler-Hintergrund scheinbar gar nicht exprimiert wird. Die geringere Expression der UGTs (84A1-4) könnte den geringeren Gehalt an Sinapatestern im Ler- Hintergrund erklären. Die Mutanten *tt4* und *sng1* unterschieden sich dagegen nicht im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp (nicht dargestellt).

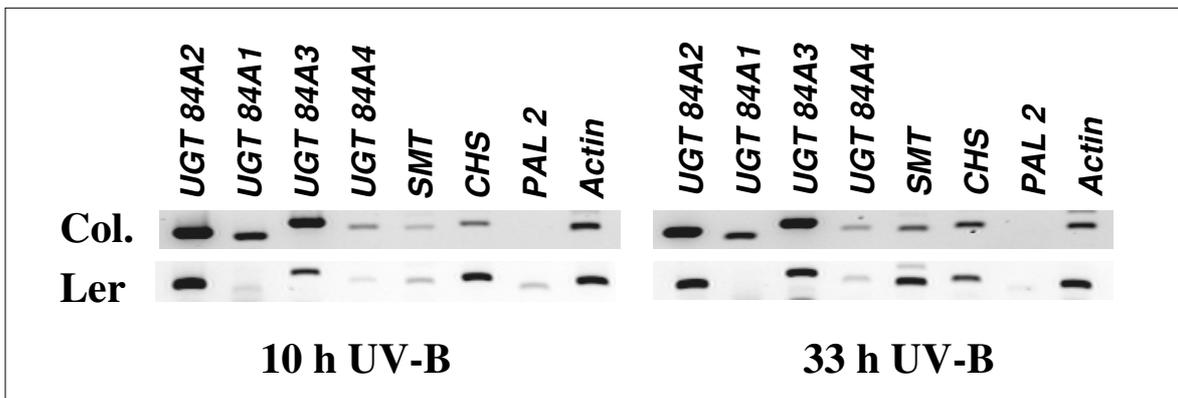


Abbildung 3.41: Semiquantitative RT-PCR nach 10 h und 33 h UV-B-Behandlung von cDNA aus Rosettenblättern von den *Arabidopsis thaliana* Ökotypen Col-0 und Ler (V693; siehe Tabelle 2.13). Als konstitutives Gen wurde Actin verwendet. Es wurden die jeweiligen 200er Primer benutzt (siehe Anhang, Tabelle 7.1).

Zur Quantifizierung der Metabolitenflüsse unter UV-B-Stress in die unterschiedlichen Biosynthesewege des Phenylpropanstoffwechsels, laufen Versuche mit radioaktiv markiertem Phenylalanin an der GSF in München (erste Markierung in Versuch V701) in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Phenylpropanstoffwechsel am IPB. Bei Abgabe dieser Arbeit lagen noch keine gesicherten Ergebnisse vor.

3.7.6. Der Einfluss von UV-B-Strahlung auf *Brassica napus*

In *Brassica napus*-Samen konnte der Sinapin-Gehalt durch RNAi-Suppression der *BnSGT* (homolog zur Arabidopsis *UGT 84A2*) stark reduziert werden (Hüsken et al., 2005). In frühen Keimlings-Stadien (bis zu 10 Tage nach Aussaat) von Raps-Pflanzen wird diese Suppression aufrechterhalten. Es ergab sich die Möglichkeit, die Stressreaktion unter den Bedingungen weitgehender Blockierung der Sinapatester-Biosynthese zu untersuchen. Im Versuch V695 (siehe Tabelle 2.11) konnten *Brassica napus*-Pflanzen unter UV-B-Stress analysiert werden. Abbildung 3.42 zeigt eine Raps Pflanze nach 6 d UV-B-Behandlung im Vergleich zu einer unbehandelten Pflanze.

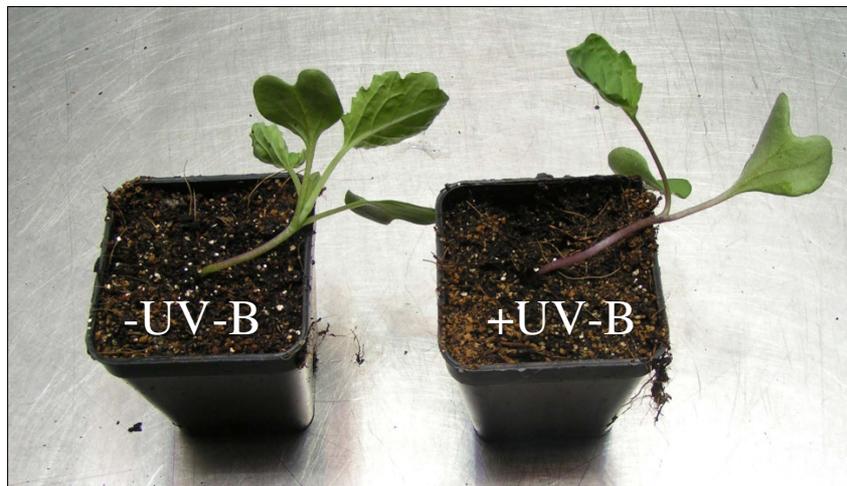


Abbildung 3.42: *Brassica napus* (WT) nach 6 d UV-B-Bestrahlung im Vergleich zu einer unbehandelten Pflanze.

In der Abbildung 3.42 sind deutliche Unterschiede zwischen UV-B gestressten und nicht-gestressten Pflanzen zu erkennen. Wildtyp und RNAi-Pflanzen sahen dagegen gleich aus und zeigten denselben Effekt ohne und mit UV-B-Behandlung. Der Stängel von UV-B gestressten Pflanzen weist eine deutliche rote Färbung auf, die auf einen erhöhten Gehalt an Anthocyanen schließen lässt. HPLC-Analysen sollten Unterschiede im Metaboliten-Gehalt aufzeigen. Dazu wurden die Keimblätter nach 10 h und 6 d UV-B-Behandlung untersucht. Abbildung 3.43 gibt das Muster von Hydroxyzimtsäure-Konjugaten wieder.

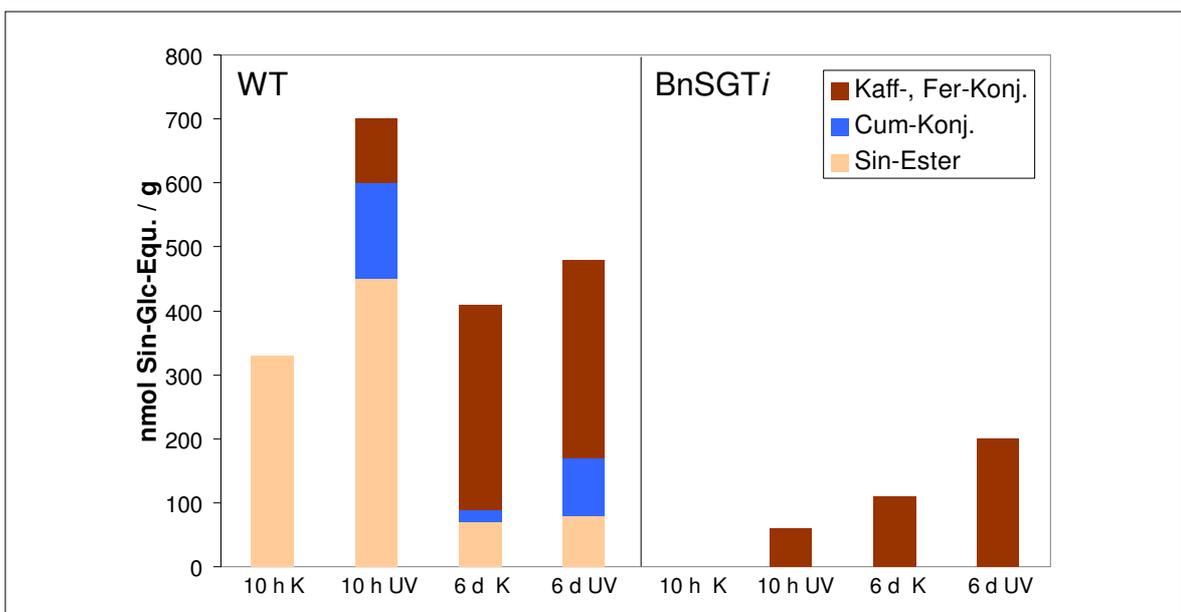


Abbildung 3.43: HPLC-Analysen von Extrakten der Raps-Keimlingen nach 10 h und 6 d UV-B-Behandlung. Der Wildtyp wurde dabei mit BnSGTi-Pflanzen verglichen. In der Abbildung sind nur die Hydroxyzimtsäure-Konjugate gezeigt. Anhand von Spektren und der Retentionszeit konnten die Peaks Substanzgruppen zugeordnet werden, aber nicht genau identifiziert werden; Sin-Ester=Sinapatester, Cum-Konj=Cumarsäure-Konjugate, Kaff-, Fer-Konj=Kaffee-, Ferulasäure-Konjugate. Es wurden jeweils die Mittelwerte von n=3 Proben angegeben; die Standardabweichung betrug maximal 10%. K=Kontrollen ohne UV-B-Behandlung.

Nach 10 h UV-B-Behandlung kommt es zu einem starken Anstieg von Sinapatestern und Konjugaten der Cumar-, Kaffee- und Ferulasäure. Nach 6 Tagen dagegen ist kein großer Unterschied mehr zwischen UV-B gestressten und nicht-gestressten Pflanzen zu erkennen. In den BnSGTi-Pflanzen konnten keine Sinapatester mehr detektiert werden. Und auch die Konjugate der Hydroxyzimtsäuren waren weniger vorhanden als im Wildtyp. Die Pflanze zeigte aber keine Wachstumsstörungen oder sonstige Schäden. Der reduzierte Gehalt an Hydroxyzimtsäure-Konjugaten kann mit einer Verminderung der Expression der *BnSGT* (homolog zur Arabidopsis *UGT 84A2*) erklärt werden.

Die Zunahme von Sinapoylmalat ist im Wildtyp und in der BnSGTi-Linie nach 10 h UV-B-Stress nur schwach, während der Gehalt nach 6 Tagen sogar wieder abnimmt. Dies konnte auch in Arabidopsis gezeigt werden (siehe Abbildung 3.37). Der Gesamt-Gehalt an Kaempferol-Derivaten nimmt nach 10 h UV-B-Behandlung leicht zu, während er nach 6 Tagen stark ansteigt (siehe Abbildung 3.44). Die BnSGTi-Pflanzen zeigen hier nur einen leicht verringerten Kaempferol-Gehalt, was aber möglicherweise eher durch biologische Varianz als durch den RNAi-Effekt zu erklären ist.

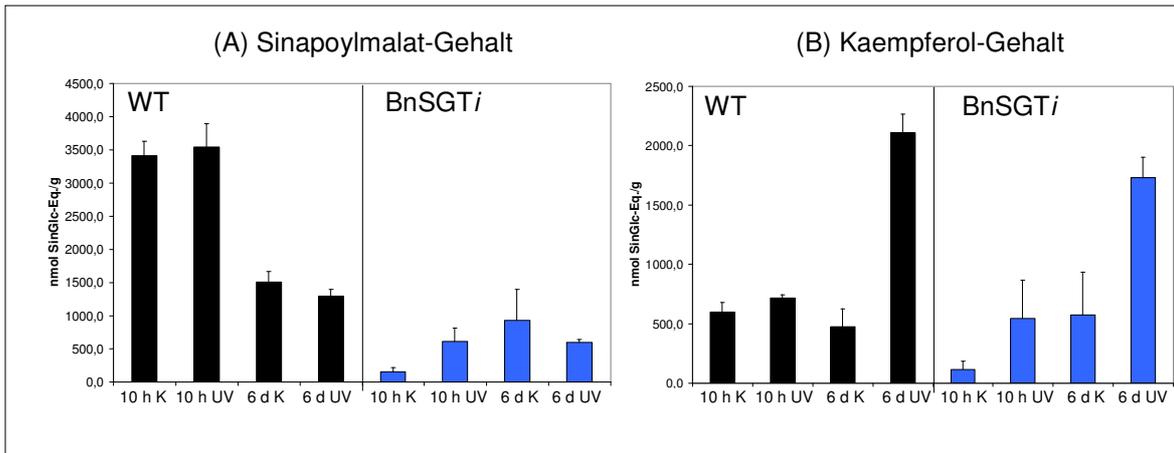


Abbildung 3.44: HPLC-Analysen von Extrakten der Raps-Keimlingen nach 10 h und 6 d UV-B-Behandlung. Der Wildtyp wurde dabei mit BnSGT1-Pflanzen verglichen. (A) Sinapoylmalat-Gehalt; (B) Kaempferol-Gehalt; die Mittelwerte aus n=3 Proben sind angegeben. Beim den Kaempferol-Gehalten sind die Mengen aller detektierten Derivate zusammengefasst; K=Kontrollen ohne UV-B-Behandlung.

Wie in Arabidopsis scheint nach 10 h UV-B-Behandlung die Pflanze mit der Produktion von Hydroxyzimtsäure-Konjugaten zu reagieren, während nach 6 Tagen die vermehrte Flavonoid-Produktion dominiert.

4. Diskussion

4.1. Die Bedeutung der UGT 84A1-4 im Wildtyp

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung von vier Ester-bildenden HCA-Glucosyltransferasen im Stoffwechsel von *Arabidopsis* untersucht. Dabei sollte analysiert werden, ob die vier Enzyme spezifische oder redundante Funktionen ausüben und welche Auswirkung die Modulation der Genexpression auf den Metaboliten-Gehalt hat.

Für viele pflanzliche UGTs des Sekundärstoffwechsels ist die Aufklärung der biologischen Bedeutung durch eine breite Substratspezifität erschwert. Während viele Daten von *in vitro*-Analysen verfügbar sind, gibt es kaum Untersuchungen zur biologischen Bedeutung der UGTs im Stoffwechsel der Pflanzen. Die Regulation der Versorgung der Gewebe mit Indol-3-essigsäure (IAA) wird über den Abbau des nicht benötigten Hormons bewerkstelligt. Dazu werden bestimmte IAA-Abbauprodukte nach Konjugation mit Glucose in Vakuolen gespeichert und so vom Wirkort entfernt. In Mais ist die Konjugation von IAA über 1-*O*-Indol-3-ylacetyl- β -glucose zu Inositol der erste Schritt zur Regulation der Hormonkonzentration während des Wachstums von vegetativem Gewebe (Kesy und Bandurski, 1990; Kowalczyk und Bandurski, 1991; Szerszen et al., 1994). Ein weiteres Beispiel für die biologische Bedeutung von Glucosyltransferasen sind die Analysen der UGT 74B1 (Grubb et al., 2004) und UGT 73C3 (Poppenberger et al., 2005). Hier konnten Untersuchungen belegen, dass die Glucosylierung eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Auxin- und Brassinosteroid-Homöostase spielt. Für das Enzym der UGT 72E3 wurde die Bedeutung der Glucosylierung bei der Bildung von Monolignolen in Wurzeln von *Arabidopsis* gezeigt (Lanot et al., 2006).

Hydroxyzimtsäuren sind als Inhaltsstoffe in den meisten Pflanzen zu finden (Heimann et al., 1971). Sie werden in die Zellwände zur Stabilisierung eingebaut (Watzl und Rechkemmer, 2001) oder treten häufig als Zwischenprodukte im Phenylpropanstoffwechsel von Pflanzen auf. Ein typisches Zwischenprodukt des HCA-Stoffwechsels ist Sinapoylglucose, das in Brassicaceen durch die Enzyme UGT 84A1-4 *in vitro* synthetisiert werden kann (Milkowski et al., 2000b). Lösliche Konjugate der Hydroxyzimtsäuren können aber auch als Endprodukte akkumulieren (Mock und Strack, 1993), wie z.B. Sinapoylmalat in den subepidermalen Zellen von Rosettenblättern oder Sinapin in Samen. Diese beiden HCA-Stoffwechselprodukte werden durch die Acyltransferasen SMT und SCT von Sinapoylglucose ausgehend synthetisiert. Daher wurde zunächst das Vorkommen von Sinapoylglucose, Sinapoylmalat und Sinapin über einen Entwicklungszyklus von *Arabidopsis* untersucht.

Sinapoylglucose erreicht den höchsten Gehalt in vier Tage alten Keimlingen. Danach nimmt der Gehalt wieder ab und ist in adulten Blättern nur schwer zu detektieren. Sinapoylmalat beginnt in der jungen Keimphase ab dem 3. Tag nach der Aussaat zu akkumulieren und erreicht in Rosettenblättern der adulten Pflanze ein konstantes Niveau, während der Sinapin-Gehalt während der Samenentwicklung und anschließend nur noch in drei Tage alten Keimlingen gemessen werden kann. Dieses Verteilungsmuster der Sinapinsäure-Konjugate ist für *Arabidopsis* gut belegt (Lorenzen et al., 1996; Shirley et al., 2001; Sinlapadech et al., 2007). Aber auch in *Brassica napus* ist ein ähnliches Verteilungsmuster zu finden (Milkowski et al., 2004). Während Sinapoylglucose in Samen und Keimlingen mit Hilfe der HPLC gut detektierbar ist, können die anderen Glucose-Ester der Hydroxyzimtsäuren nicht gefunden werden. Ein Grund dafür ist, dass diese HCA-Glucose-Ester, z.B. als Intermediate im Stoffwechsel der Pflanze, direkt weiterverarbeitet werden und so nur die Folgeprodukte gemessen werden können. Aus Zellwänden von Rosettenblättern konnten Cumar- und Ferulasäure, aber auch Sinapinsäure, durch alkalische Hydrolyse isoliert werden. Hydroxyzimtsäuren könnten demnach über eine Ester-Zwischenstufe in die pflanzliche Zellwand integriert werden (Bokern et al., 1991). Allerdings ist der Einbau über den CoA-Thioester energetisch ebenfalls möglich (Yamamoto et al., 1989; Iiyama et al., 1994a). Experimentell belegt ist lediglich das Vorkommen von HCAs innerhalb der Zellwand, in der sie mit verschiedenen Polysacchariden verestert sind (Fry, 1986; Iiyama et al., 1994a; Watzl und Rechkemmer, 2001).

Die Genexpression der *UGT 84A1-4*-Gene wurde in der vorliegenden Arbeit mit semiquantitativen RT-PCR- und RT qPCR-Experimenten untersucht und mit einer auf Array-Analysen beruhenden Datenbank (Genevestigator) verglichen. Mit allen Analyseverfahren konnte gezeigt werden, dass die *UGT 84A2* am stärksten exprimiert wird. Die *UGT 84A3* erreicht ebenfalls vergleichsweise deutliche Transkriptmengen. Dagegen werden die *UGT 84A1* und *A4* sehr schwach exprimiert. Mit Hilfe der sensitiven RT qPCR konnten für diese beiden Gene aber verstärkte Expressionen in Samen und Keimlingen im Vergleich zu Rosettenblättern nachgewiesen werden. Durch die Verwendung mehrerer Methoden für die Transkriptanalyse konnte ein relativ gutes Bild über die Genexpression der vier Glucosyltransferasen erhalten werden. Der Vergleich der experimentell ermittelten Daten mit der Expressionsdatenbank Genevestigator zeigt, dass Datenbanken erste Anhaltspunkte liefern, aber nicht die experimentelle Analyse der Genexpression ersetzen kann. So gibt die Datenbank von Genevestigator für die Expression der *UGT 84A2* in Samen die höchsten Transkriptmengen wieder. Die Analysen der semiquantitativen RT-PCR und der RT qPCR zeigten aber deutlich, dass die Genexpression der *UGT 84A2* in drei Tage alten Keimlingen am höchsten ist, während sie danach wieder abnimmt. Die Keimlinge für die Array-Analysen von Genevestigator waren

bis zu sechs Tagen alt. Die niedrigere Genexpression in älteren Keimlingen drückt so die Durchschnittsexpression in diesem Gewebe nach unten. Deshalb erscheint die Genexpression der *UGT 84A2* im Keimlingsstadium geringer als in Samen.

Generell war die Genexpression der Glucosyltransferasen *UGT 84A1-4* in der Samen- und Keimlingsentwicklung deutlich stärker als in Rosettenblättern. Dies steht im Einklang mit der in dieser Arbeit gefundenen Enzymaktivität und der Akkumulation von Sinapatesteren in diesen Stadien. In einer kürzlich erschienenen Untersuchung wurde ebenfalls die Expression der *UGT 84A1-4* analysiert (Sinlapadech et al., 2007). In dieser Analyse wurde in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit belegt, dass in verschiedenen alten Keimlingen vor allem die Gene der *UGT 84A2* und *A3* exprimiert werden und dass die *UGT 84A2* am stärksten in drei und vier Tage alten Keimlingen im Vergleich zu anderen Geweben exprimiert wird. In der Expressions-Analyse von Sinlapadech et al. (2007) konnte im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit keine Genexpression der *UGT 84A1* nachgewiesen werden. Diese unterschiedlichen Ergebnisse der RT-PCR können auf die Verwendung verschiedener Primer mit unterschiedlicher Affinität zurückgeführt werden. Allerdings konnte in dieser Arbeit erst nach UV-B-Behandlung deutliche Transkriptmengen der *UGT 84A1* mit Hilfe der semiquantitative RT-PCR detektiert werden. Für die Analyse von sehr schwach exprimierten Genen ist daher die RT qPCR, als eine sehr sensitive Methode, der RT-PCR vorzuziehen. Dies belegt eine weitere, kürzlich erschienene Arbeit, in der in *Arabidopsis*-Wurzeln die Expression der *UGT 84A1* mit der RT qPCR nachgewiesen werden konnte (Stracke et al., 2007). Werden alle verfügbaren Expressionsdaten zusammengefasst, wird ersichtlich, dass in allen Geweben mehrere Glucosyltransferasen exprimiert werden. Dadurch ist eine redundante Funktion dieser Glucosyltransferasen möglich.

Während mit Hilfe von RT-PCR Experimenten die mRNA-Abundanz quantifiziert werden konnte, sollte die Analyse der Promotoraktivitäten in transkriptionaler Fusion mit dem GUS-Reportergen Aufschluß darüber geben, in welchen Geweben die Glucosyltransferasen transkribiert werden können. Dabei konnte nur für die *UGT 84A2* Promotoraktivität nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis reflektiert die schwache Promotoraktivität der vier Glucosyltransferasen. Der Promotor der *UGT 84A2* wies Aktivität im Hypokotyl drei Tage alter Keimlinge und im Leitgewebe von Rosettenblättern sowie in den Trichomen auf. Die Promotoraktivität der *UGT 84A2* in drei Tage alten Keimlingen bestätigt die in diesem Stadium gefundenen deutlichen Transkriptions- und Enzymaktivitäten, sowie die verstärkte Akkumulation von HCA-Konjugaten (siehe Abschnitt 3.1.1-3.1.3). Überraschenderweise war die Promotoraktivität der *UGT 84A2* im Hypokotyl detektierbar und nicht, wie man erwartet hätte, in den Kotyledonen. In letzteren findet die Synthese von Sinapoylmalat statt (Strack, 1982). Möglicherweise kommt es zum

Transport des UGT 84A2-Proteins vom Hypokotyl in die Cotyledonen. Allerdings konnte kürzlich in einer anderen Analyse ebenfalls Aktivität des *UGT 84A2*-Promotors in Keimlingen (sowie im Leitgewebe und in Trichomen von Rosettenblättern) gefunden werden (Sinlapadech et al., 2007). Hier lag nur in den Wurzeln von drei Tage alten Keimlingen Promotoraktivität vor, während ältere Keimlinge in den Cotyledonen GUS-Färbung aufwiesen. Daher ist ein Transportmechanismus eher unwahrscheinlich, da in Cotyledonen GUS-Aktivität nachgewiesen werden konnte. In der GUS-Analyse von Sinlapadech hatte das klonierte Promotor-Fragment des *UGT 84A2*-Gens eine Größe von 1.300 bp, während in der vorliegenden Arbeit nur 1.000 bp für das Promotor-GUS-Konstrukt verwendet wurde (siehe Abschnitt 2.4.3). Es wäre demnach möglich, dass wichtige *cis*-Elemente auf dem 1.000 bp großem Fragment gefehlt haben, um die Initiation der GUS-Transkription unter dem *UGT 84A2*-Promotor in Cotyledonen zu gewährleisten.

Für die *UGT 84A1*, *A3* und *A4* wurde in dieser Arbeit keine Promotoraktivität in der vorliegenden Arbeit gefunden. Methodisch ist bei der Untersuchung mit dem GUS-Reportergen aber nicht auszuschließen, dass die klonierten Promotorfragmente von 1 kb nicht alle für die Promotoraktivität erforderlichen *cis*-Elemente besessen haben. Gestützt wird diese Vermutung durch weiterführende Experimente. So wurden Pflanzen unter UV-B-Stress angezogen. Dies führte zu einer verstärkten Expression der vier untersuchten Glucosyltransferasen in Rosettenblättern nach 10 h UV-B-Behandlung (siehe Abschnitt 3.7). Der Promotor ist wichtig für die Initiation der Transkription und deshalb müsste unter diesen Bedingungen die Aktivität entsprechend zunehmen. In diesen Experimenten konnte aber mit Hilfe der GUS-Fusionen keine Promotoraktivität der *UGT 84A1*, *A3* und *A4* detektiert werden.

Neben den oben beschriebenen Ebenen der Metaboliten und der Transkripte wurden auch die Enzymaktivitäten der HCA-UGTs untersucht. Diese deckte sich sehr gut mit den gefundenen Expressionsmustern und mit der Akkumulation von HCA-Derivaten. Die UGT-Enzymaktivität in *Arabidopsis* war ebenfalls während der Samen- und Keimlingsentwicklung am höchsten. Für *Brassica napus* konnte gezeigt werden, dass die Enzymaktivität der BnSGT1, des homologen Enzyms zur UGT 84A2 von *Arabidopsis*, zwei Aktivitätsmaxima besitzt. Das erste Maximum ist während der Samenentwicklung und das Zweite in 4 Tage alten Raps-Keimlingen (Milkowski et al., 2004). Die Enzymaktivitäten der UGT 84A1, A2, A3 und A4 in Rosettenblättern von *Arabidopsis* war dagegen im Vergleich zur Samen- und Keimlingsentwicklung gegenüber Cumar-, Kaffee-, Ferula- und Sinapinsäure auf sehr niedrigem Niveau. Auch dieser Befund steht im Einklang mit der schwachen Genexpression der *UGT 84A1-4* und der kaum mit Hilfe der HPLC zu detektierenden Glucose-Ester in diesem Gewebe.

Im Arabidopsis-Wildtyp (Col.) zeigte sich, dass Genexpression und Enzymaktivität der UGT 84A1-4, sowie die Akkumulation von Sinapoylglucose vor allem während der Samen- und Keimlingsentwicklung verstärkt ablaufen. Die vermehrte Aktivität gegenüber Cumar-, Kaffee- und Ferulasäure in diesen beiden Entwicklungsstadien resultierte nicht in einer Verschiebung des Metabolitenspektrums. Vermutlich werden die gebildeten Glucose-Ester im Stoffwechsel weiter verarbeitet und können deshalb nicht detektiert werden, oder die als Substrate verwendeten HCAs sind in der Pflanze limitierend.

4.2. Modulation der Genexpression von *UGT 84A1-4*

Die durch Suppression und Überexpression der Glucosyltransferasen UGT 84A1-4 hervorgerufenen Unterschiede im Metaboliten-Gehalt sollten Hinweise auf die Bedeutung der vier Glucosyltransferasen im Stoffwechsel der Pflanze geben. Außerdem sollte geprüft werden, ob der Metaboliten-Gehalt durch veränderte Genexpression gezielt manipuliert werden kann. Die so erhaltenen Erkenntnisse können in der Kulturpflanze Raps zur Anwendung kommen. Im folgenden sollen die Ergebnisse der Überexpressionslinien und der T-DNA- bzw. Transposon-Insertionslinien der einzelnen Glucosyltransferasen diskutiert werden.

4.2.1. Insertions- und Überexpressionslinien

UGT 84A2

Im Wildtyp wird die *UGT 84A2* im Vergleich zu den anderen drei UGTs stark exprimiert. In *Brassica napus* konnte belegt werden, dass die Suppression der *BnSGT1* (homolog zur *UGT 84A2*) zu einer deutlichen Reduktion der Sinapatester in Samen führt (Hüsken et al., 2005). Daher wurden in Arabidopsis bei veränderter Genexpression der *UGT 84A2* ebenfalls deutliche Effekte erwartet.

In der KO-Linie hatte der Ausfall der Expression von *UGT 84A2* signifikante Auswirkung auf die UGT-Aktivität des Blattextrakts gegenüber Sinapinsäure. In der Linie *UGT 84A2 KO* wurde nur noch eine Restaktivität von ca. 10% der Aktivität des Wildtyps gemessen. Ein ähnlicher Wert wurde für die UGT 84A2-Mutante *brt1* beschrieben (Sinlapadech et al., 2007). Diese Restaktivität in der Pflanze deutet darauf hin, dass die Glucosyltransferasen UGT 84A1, A3 und/oder A4 den Ausfall der UGT 84A2 in begrenztem Maße kompensieren können. Alle drei UGTs können *in vitro* Sinapinsäure mit Glucose verestern (Milkowski et al., 2000a; Lim et al., 2001). Dafür spricht auch, dass in allen überexprimierten Linien der UGT 84A1, A3 und A4 die Enzymaktivität gegenüber Sinapinsäure und UDP-Glucose im Vergleich zum Wildtyp anstieg (siehe Abbildung 3.27). Die drei anderen Glucosyltransferasen sind demnach *in vivo* in der Lage, die Veresterung

von Sinapinsäure zu gewährleisten. Die UGT 84A2 scheint aber das dominante Enzym zu sein, da nur in der Linie, in der die UGT 84A2 überexprimiert war, der Anstieg der UGT-Aktivität gegenüber Sinapinsäure signifikant war. Außerdem kam es in dieser Linie zu einer signifikanten Erhöhung von Sinapoylglucose in Samen und sechs Tage alten Keimlingen, sowie zu einem erhöhten Gehalt an den Folgeprodukten Sinapin in Samen und Sinapoylmalat in Rosettenblättern. Auch in die Zellwände wurde signifikant mehr Sinapinsäure eingebaut. Demnach ist es möglich, durch Erhöhung der Aktivität der UGT 84A2, den Sinapatester-Gehalt in der Pflanze sowohl im löslichen Metaboliten-Pool, als auch in der Zellwand zu erhöhen.

Die dominante Rolle der UGT 84A2, aber auch das Potential der anderen drei Glucosyltransferasen den Ausfall der UGT 84A2 bis zu einem gewissen Grad zu kompensieren, konnte ebenfalls in den Untersuchungen der *UGT 84A2 KO* belegt werden. In dieser Linie konnte so gut wie keine Sinapoylglucose mehr detektiert werden. Trotzdem wurde im Samen ein Sinapin-Gehalt auf Wildtyp Niveau festgestellt. Die Aktivität der übrigen UGTs reicht demzufolge aus, um genügend Sinapoylglucose für die Aufrechterhaltung des Sinapin-Pools zu synthetisieren. Durch die geringe Enzymaktivität (10% der Wildtyp Aktivität) kann aber keine Sinapoylglucose mehr akkumulieren, und dadurch können nur noch die Folgeprodukte detektiert werden. Dies ergab ebenfalls die Untersuchung in sechs Tage alten Keimlingen und Rosettenblättern der Linie *UGT 84A2 KO*. In diesen Geweben konnte zwar keine Sinapoylglucose, aber Sinapoylmalat gefunden werden. In der Synthese von Sinapoylmalat scheint sich aber die Suppression der *UGT 84A2* bemerkbar zu machen, da in der *KO*-Linie signifikant weniger Sinapoylmalat synthetisiert wurde als im Wildtyp. Trotzdem können die anderen drei UGTs diesen Ausfall bis zu einem gewissen Grad kompensieren, da sonst kein Sinapoylmalat mehr detektiert werden dürfte.

Der Ausfall der UGT 84A2 bewirkte durch die verminderte Synthese von Sinapoylglucose im Stoffwechsel von Samen zusätzliche Änderungen im Metaboliten-Gehalt. Dies belegte die Untersuchung von Samen der Insertionsmutante *UGT 84A2 KO* mit LC-MS-Analysen. Verschiedenen Cholin-Ester akkumulieren vermehrt in der Insertionsmutante, während der Gehalt an Feruloylcholin und 5-Hydroxyferuloylcholin verringert ist. Die Synthese von Sinapin findet zwar weiter statt, ist aber dennoch vermindert durch den Ausfall der UGT 84A2. Eine mögliche Akkumulation von Sinapinsäure könnte durch metabolische Rückkopplung die Synthese der Hydroxyzimtsäuren hemmen, was die Verringerung von Feruloylcholin und 5-Hydroxyferuloylcholin durch Substrat-Limitation bewirken würde. Zudem kann überschüssige Sinapinsäure in vorhandene Stoffwechselwege geleitet werden, was zur Akkumulation von verschiedenen Cholin-Estern führt (wie z. B. Syringoyl-

cholin). Der Weg zu diesen Cholin-Estern könnte dabei ebenfalls über die Glucose-Ester-Zwischenstufen führen, die so als Acyl-Donatoren fungieren würden.

Fällt im Stoffwechsel der Pflanze ein Enzym aus, kann sich dies an anderer Stelle bemerkbar machen. Hierfür gibt es gerade im HCA-Stoffwechsel mehrere Beispiele. Die CCoAOMT (Kaffeoyl CoA 3-*O*-Methyltransferase) und die COMT (Kaffeensäure/5-Hydroxyferulasäure *O*-Methyltransferase) spielen bei der Methylierung des phenolischen Rings von HCA-Konjugaten eine wichtige Rolle. Doppelmutanten in diesen beiden Enzymen können kein Sinapoylmalat mehr synthetisieren (Do et al., 2007), weil die Synthese von Sinapinsäure nicht mehr stattfinden kann, da nach der Sichtweise des Synthesewegs der HCAs (siehe Abbildung 1.2) durch Ausfall der CCoAOMT und COMT kein Sinapaldehyd mehr gebildet wird und dadurch das Enzym SALDH (Nair et al., 2004) kein Substrat für die Sinapinsäure-Synthese hat. Daraus kann gefolgert werden, dass Substrat für die UGT 84A2 und die SMT fehlt und so kein Sinapoylmalat synthetisiert werden kann. Ein anderes Beispiel belegt die Akkumulation von Sinapoylmalat durch den Ausfall des Transkriptionsfaktors *AtMYB4*. Dieser reguliert die Expression der Cinnamat-4-Hydroxylase (*C4H*). Ein Ausfall des *AtMYB4*-Gens führt zur erhöhten Transkription der *C4H* (Jin et al., 2000) und dadurch zur vermehrten Synthese von Sinapoylmalat. Auch hier wird die Akkumulation eines Endprodukts im Stoffwechsel durch eine Veränderung der Genexpression an anderer Stelle des Biosynthese-Wegs der HCAs begünstigt.

UGT 84A1, A3 und A4

Die Modulation der Genexpression von *UGT 84A1* und *UGT 84A3* führte zu einer verstärkten Enzymaktivität in Rosettenblättern (siehe Abbildung 3.27), während die Überexpression der *UGT 84A4* keine erhöhte UGT-Aktivität aufwies. Signifikante Erhöhungen ergaben sich für das Enzym der *UGT 84A1* gegenüber 4-Cumar- und Ferulasäure und für die *UGT 84A3* nur gegenüber Ferulasäure. Dies spiegelt genau die *in vitro*-Substratpräferenzen wider (Milkowski et al., 2000a; Lim et al., 2001). In den KO-Linien konnte dagegen keine Veränderung der UGT-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Dies hängt wahrscheinlich damit zusammen, dass sich die Substratpräferenzen der *UGT 84A1*, *A3* und *A4* überschneiden (Milkowski et al., 2000a; Lim et al., 2001). Fällt ein Enzym aus, kann ein anderes diesen Ausfall kompensieren. Dies ist ein Hinweis auf funktionale Redundanz der Glucosyltransferasen in der Pflanze. Ein weiterer Beleg für Redundanz ist, dass in den *UGT 84A1*- und *A3*-überexprimierten Linien der Gehalt an Sinapoylglucose zunimmt. Aufgrund des erhöhten Angebots an Sinapoylglucose kam es wahrscheinlich zu der vermehrten Bildung von Sinapin in Samen und Sinapoylmalat in Rosettenblättern. Die Überexpression von der *UGT 84A1* und *A3* resultierte demnach vor allem in einer verstärkten Synthese von Sinapoylglucose, während

mögliche andere löslichen Glucose-Ester mit Hilfe der HPLC nicht detektiert werden konnten. Dieser Befund weist darauf hin, dass bei einem Ausfall der *UGT 84A2* der Sinapatostoffwechsel durch Expression der *UGT 84A1* und *A3* aufrecht erhalten werden kann. Hierfür spricht auch, dass die drei Gene in denselben Geweben exprimiert werden. Die *UGT 84A3* ist nach der *UGT 84A2* das am stärksten exprimierte Gen unter den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Glucosyltransferasen und erreicht in Keimlingen die höchste Transkriptmenge. Dies konnte kürzlich auch durch Sinlapadach et al. (2007) bestätigt werden, wobei dort noch starke Expression der *UGT 84A3* in seneszenten Blättern gefunden wurde. Die leichte Reduzierung der UGT-Aktivität gegenüber Sinapinsäure in der Linie *UGT 84A3 KO* deutet darauf hin, dass die *UGT 84A3* für die Restaktivität von ca. 10% in der Linie *UGT 84A2 KO* von Bedeutung ist. Dies könnte durch die Kreuzung der Linien *UGT 84A2 KO* und *UGT 84A3 KO* überprüft werden. Leider stand die Linie *UGT 84A2 KO* erst am Ende der vorliegenden Arbeit zur Verfügung.

Die Analyse der Zellwände in *UGT 84A1*- und *A3*-überexprimierten Linien ergab, dass hier Cumar-, Ferula- und Sinapinsäure verstärkt eingebaut werden. Möglicherweise ist dies ein Grund dafür, dass keine weiteren löslichen Glucose-Ester gefunden werden konnten, da HCAs in die Zellwände integriert werden (Fry, 1982; Iiyama et al., 1994a) und dadurch keine Ester-Zwischenstufen akkumulieren können. In der *UGT 84A1 KO* Linie konnten dagegen im Vergleich zum Wildtyp keine Änderungen im Gehalt an Zellwand-gebundenen HCAs gefunden werden. Die Zellwand-Analysen der *UGT 84A3 KO* Linie zeigten dagegen einen signifikant reduzierten Gehalt an Cumarsäure und einen leicht verringerten an Ferulasäure. Die *UGT 84A3* scheint demnach einen wesentlichen Teil zum Einbau von Cumar- und Ferulasäure in die Zellwand beizutragen. Auf den löslichen Metaboliten-Gehalt hatte die Suppression der *UGT 84A1*- und *A3*-Gene keinen Einfluss. Lediglich die sensitivere LC-MS-Analyse ergab geringfügige Unterschiede in noch nicht identifizierten Substanzen. Die gefundenen Resultate weisen darauf hin, dass die *UGT 84A1* keine spezifische Funktion innerhalb der Pflanze hat, sondern als redundantes Enzym die gleiche Funktion wie die *UGT 84A2* übernimmt. Dasselbe gilt für die *UGT 84A3*, wobei hier Hinweise gefunden werden konnten, die eine spezifische Funktion dieses Enzyms beim Einbau von Cumar- und Ferulasäure in die Zellwand vermuten lässt.

Die Modulation der Expression des *UGT 84A4*-Gens zeigte keine Auswirkungen auf den pflanzlichen Stoffwechsel. Dieses Gen hat von den vier UGTs die stärkste Transkription in Wurzeln (Sinlapadach et al., 2007), während sonst nur eine sehr schwache Expression in Samen, Keimlingen und Rosettenblättern vorliegt. Möglicherweise hat die *UGT 84A4* keine redundante Funktion zur Aufrechterhaltung des Sinapatester-Stoffwechsels, sondern eine spezifische Funktion in Wurzeln. Deshalb wurden mit Hilfe der HPLC Wurzelextrakte der Linie *UGT 84A4 KO* untersucht. Die Analyse ergab deutliche Unterschiede im HPLC-

Chromatogramm im Vergleich zum Wildtyp. Anhand der Spektren einiger Peaks kann vermutet werden, dass die Veränderungen im Metaboliten-Gehalt den HCA-Stoffwechsel in Wurzeln betreffen.

4.2.2. Suppression der *UGT 84A1-4* Gene durch RNA-Interferenz

Die Genexpression der Glucosyltransferasen *UGT 84A1-A4* sollte mit Hilfe von verschiedenen RNAi-Konstrukten in Samen, Keimlingen und Rosettenblättern supprimiert werden, um die Auswirkungen auf den Metaboliten-Gehalt zu untersuchen.

Die HPLC Analysen von RNAi-Pflanzen zeigten dabei sehr unterschiedliche Mengen im Gehalt von Sinapatestern. Dabei reichte die Bandbreite einzelner RNAi-Konstrukte von kompletter Suppression bis hin zu keinem Effekt. Ein Grund dafür könnte sein, dass die RNAi-Konstrukte mehrfach ins Arabidopsis Genom integriert wurden. Eine mehrfach Insertion der RNAi-Konstrukte ins Arabidopsis Genom konnte mit der Segregation des Selektionsmarkers belegt werden. Die T2-Generationen der RNAi-Linien waren komplett Basta[®]-resistent. Bei einer Einzelkopie-Insertion wäre hier eine 3:1 Verteilung von resistenten zu nicht-resistenten Pflanzen zu erwarten gewesen. So kommt es zu einer wechselnden Anzahl von Kopien der RNAi-Konstrukte in den folgenden Generationen, was zu den sehr unterschiedlichen Ausprägungen des RNAi-Effekts geführt haben könnte. In einer Studie über die Effektivität von RNA-Interferenz in Arabidopsis wurde gezeigt, dass lediglich die Einzelkopie-Insertion einen stabilen und reproduzierbaren RNAi-Effekt hervorruft, während die Effekte von Mehrfachkopien-Insertionen sehr variable waren und nie die Effektivität der Einzelkopie-Insertion erreichte (Kerschen et al., 2004). Die Analyse des Doppelkonstrukts zur simultanen Suppression der *UGT 84A2* und *SCT* im Samen zeigte sehr deutlich, dass der Effekt einer einzelnen RNAi-Linie (in diesem Fall Linie 24; siehe Abschnitt 3.3.4.) in der T2-Generation in der darauffolgenden T3-Generation nicht reproduziert werden konnte. Stattdessen wiesen die Nachkommen dieser Linie ein sehr breites Spektrum im Gehalt an Sinapin oder Sinapoylglucose auf. Dies spricht sehr stark für eine Mehrfachkopien-Insertion der RNAi-Konstrukte. Allerdings wurde kürzlich beschrieben, dass Mehrfachkopien-Insertionen teilweise einen besseren Abbau der mRNA bewerkstelligen als Einzelkopie-Insertionen (Wang et al., 2005). Der Nachteil ist aber, dass dieser Effekt genetisch nicht stabil über die Generationen aus oben genannten Gründen aufrecht erhalten werden kann. Für zukünftige Arbeiten mit RNAi-Ansätzen ist zu empfehlen, homozygote Einzelkopie-Insertionen in RNAi-Linien zu finden, da der Vorteil der stabilen Weitergabe des RNAi-Effekts über die Generationen hinweg überwiegt. So kann genügend pflanzliches Gewebe von genetisch gleichen Pflanzen erhalten werden um reproduzierbare Transkript-Analysen durchzuführen. Zudem sind so wahrscheinlich die Auswirkungen auf den Metaboliten-Gehalt weniger variabel. Dieser Weg ist aber sehr

zeitintensiv und wurde aufgrund der Fragestellung dieser Doktorarbeit, nämlich in möglichst kurzer Zeit Änderungen im Metaboliten-Gehalt zu finden, nicht weiter verfolgt.

Die großen Unterschiede zwischen den einzelnen RNAi-Linien können auch mit Positionseffekten zusammenhängen. Die Chromatin-Struktur im Genom von Arabidopsis kann die Expression des Transgens beeinflussen (Nagaya et al., 2005). Wird das RNAi-Konstrukt z.B. im Bereich des Heterochromatins eingebaut, verliert es möglicherweise stark an Effektivität.

Die verwendeten Konstrukte unterschieden sich in der Wahl des Promotors (35S oder Napin) und der Spacer Sequenz (*FAD2*-Intron oder *GUS*-Insert) zwischen den sense- bzw. antisense Abschnitten. Ein RNAi-Konstrukt gegen die *UGT 84A2* konnte in Samen sowohl unter dem 35S-Promotor, als auch unter dem Napin-Promotor exprimiert werden [*35S:UGT84A2i (256)* bzw. *Nap:UGT84A2i (256)*]. Dabei zeigte sich, dass der samenspezifische Napin-Promotor eine größere Suppression des Gehalts an Sinapin und Sinapoylglucose ermöglicht im Vergleich zum konstitutiven 35S Promotor. Vor allem die RNAi-Linien *35S:UGT 84A1i-A4i* unter dem 35S-Promotor zeigten keine Suppression des Gehalts an Sinapin oder Sinapoylglucose in Samen. In den RNAi-Linien *35S:UGT 84A1i-A4i* wurde als Spacer zwischen dem Sense- und Antisense-Abschnitt das *FAD2*-Intron verwendet statt des *GUS*-Inserts, wie in den RNAi-Linien *35S:UGT84A2i (256)* und *Nap:UGT84A2i (256)*. Im Jahr 2000 konnte gezeigt werden, dass Konstrukte mit dem *FAD2*-Intron in 100 % der Fälle zu einem silencing Effekt führen im Vergleich zum *GUS*-Insert (58 %) oder einer nicht-Intron Spacer Region, die eine silencing Rate von 69 % aufwies (Singh et al., 2000; Smith et al., 2000). In den RNAi-Linien *35S:UGT 84A1i-A4i* brachte dagegen das *FAD2*-Intron scheinbar keine Verbesserung der Suppression. Allerdings wurde in diesen Linien ein anderer Sequenzabschnitt verwendet als in den RNAi-Linien *35S:UGT84A2i (256)* und *Nap:UGT84A2i (256)*. In den zuletzt genannten Linien könnte das *GUS*-Insert gegen das *FAD2*-Intron getauscht werden, um den Einfluss des *FAD2*-Introns auf die Suppression besser zu charakterisieren. Die Untersuchungen zeigten, dass die Wahl des Promotors, die Ziel-Sequenz des RNAi-Konstrukts und die Spacer-Region die Suppressionsstärke eines RNAi-Ansatzes beeinflussen können.

Der RNAi-Ansatz zur simultanen Suppression der *UGT 84A2* und der *SCT* in Samen brachte keine Verbesserung der Suppressionsstärke im Vergleich zum Konstrukt nur gegen die *UGT 84A2*. Dies könnte daran liegen, dass das Doppelkonstrukt für die RNAi-Suppression in *Brassica napus* konstruiert worden war und durch die geringere Sequenzidentität in Arabidopsis an Effektivität verloren hatte.

Mit Hilfe von HPLC-Analysen konnten in RNAi-Linien, die eine deutliche Reduktion im Sinapin-, Sinapoylglucose- oder Sinapoylmalat-Gehalt zeigten, keine neu auftauchenden Metabolite detektiert werden. Das könnte allerdings daran liegen, dass die HPLC hierfür nicht sensitiv genug war, da viele Sinapatester nur in sehr geringen Mengen in den Geweben der Pflanzen vorkommen. Ein Beleg hierfür sind die T-DNA-Insertionslinien, in denen ebenfalls mit Hilfe der HPLC kaum neue Metabolite gefunden wurden, auch wenn es zu signifikanten Reduktionen im Gehalt an Sinapin, Sinapoylglucose oder Sinapoylmalat kam. Dagegen konnte mit Hilfe einer LC-MS-Analyse im Samen von T-DNA-Insertionslinien genauer bestimmt werden, zu welchen Änderungen es im Metabolitenprofil kommen kann, wenn eine UGT supprimiert ist.

4.3. Der Einfluss von UV-B-Strahlung auf den HCA-Stoffwechsel

Mit den Versuchen an der GSF in München sollte der Einfluss von UV-B-Strahlung auf die Glucosyltransferasen UGT 84A1-4 untersucht werden. Zudem wurde der Frage nachgegangen, welche Veränderungen im Metaboliten-Gehalt nach UV-B-Behandlung beobachtet werden können. Dabei stand im Mittelpunkt des Interesses, welchen Anteil Flavonoide und Sinapatester zum UV-Schutz beitragen.

In *Arabidopsis thaliana* ist belegt, dass verstärkte UV-Strahlung zu einer erhöhten Produktion von Flavonoiden, Sinapoylglucose und Sinapoylmalat führt (Li et al., 1993). Die Rolle der Glucosyltransferasen im Prozeß der UV-Adaptation ist aber bisher noch nicht beleuchtet worden. In der vorliegenden Arbeit konnte die Induktion der Genexpression von der *UGT 84A2* und *A3* nach UV-B-Behandlung gezeigt werden. Die in Rosettenblättern schwach exprimierten *UGT 84A1* und *A4* werden unter UV-B-Stress lediglich nach 10 h Exposition etwas stärker transkribiert. Die UGT-Aktivität des Blattextrakts wird vor allem gegenüber Sinapinsäure unter UV-B-Einfluss erhöht. Die Synthese von Feruloyl- und Kaffeoylglucose wird nur leicht gesteigert, während Cumaroylglucose nicht vermehrt produziert wird. Dieses Aktivitätsprofil weist darauf hin, dass unter UV-B-Stress hauptsächlich UGT-Aktivität gegenüber Sinapinsäure induziert wird. Dadurch kann nach 10 h und 6 d UV-B-Exposition ein signifikant erhöhter Sinapoylglucose-Gehalt gemessen werden. Dieser korreliert aber nur nach 10 h UV-B-Behandlung mit einem signifikant gesteigertem Sinapoylmalat-Gehalt gegenüber UV-B-unbehandelten Proben. Nach 6 d ist der Sinapoylmalat-Gehalt in UV-B gestressten Blättern geringer als in denen ohne UV-B-Behandlung. Nach 10 h UV-B-Stress bewirkt die erhöhte Genexpression der *UGT 84A2* sowohl einen erhöhten Sinapoylglucose-Gehalt, als auch einen Anstieg im Sinapoylmalat-Gehalt. Die Genexpression der *SMT* ist zu diesem Zeitpunkt nicht erhöht. Die Enzymaktivität der *SMT* ist ebenfalls nicht verstärkt, sondern

eher geringer nach UV-B-Exposition. Die SMT-Aktivität ist demnach nicht der limitierende Faktor der Synthese von Sinapoylmalat nach 10 h UV-B-Exposition.

Die verstärkte Expression von der *UGT 84A2* und *A3* unter UV-B-Stress scheint auch auf die Einlagerung von Hydroxyzimtsäuren in den Zellwände Einfluss zu haben. Sowohl Sinapin-, als auch Ferulasäure werden nach 10 h und 6 d UV-B-Behandlung vermehrt in der Zellwand eingelagert. Allerdings sind diese Daten statistisch nicht abgesichert, da sie nur in einer Einfachbestimmung erhoben werden konnten aufgrund von fehlendem Material. Für *Deschampsia antarctica* konnte gezeigt werden, dass unter erhöhter UV-B-Strahlung mehr Hydroxyzimtsäuren in den unlöslichen Fraktionen zu finden waren. (Ruhland et al., 2005). Unter UV-B-Stress wurden hier größere Gehalte an Cumar-, Kaffee- und Ferulasäure gefunden. UV-B-Strahlung könnte demnach die verstärkte Synthese von Hydroxyzimtsäuren anregen, die in die Zellwandmatrix von epidermalen Zellen eingelagert werden (Liu et al., 1995). Dies könnte dazu führen, dass die epidermale Elongation von Zellen und damit die Größe der Blättfläche durch Verknüpfung der Hydroxyzimtsäuren mit Pektinen und/oder Extensinen eingeschränkt wird (Fry, 1986; Ruhland et al., 2005). In *Deschampsia antarctica* wurde unter UV-B-Stress neben dem vermehrten Einbau von Ferulasäure in die Zellwände die Verkürzung von epidermalen Zellen in Blättern belegt (Ruhland und Day, 2000). Möglicherweise gibt es zwischen verschiedenen Taxa Unterschiede darin, welche Hydroxyzimtsäuren in die Zellwände eingebaut werden. In *Deschampsia* scheinen dies Cumar-, Kaffee und Ferulasäure zu sein, während in *Arabidopsis* statt Kaffeesäure Sinapinsäure in die Zellwand eingelagert wird.

Das Verhalten der Linie *UGT 84A2 KO* unter UV-B-Stress weist auf die redundanten Funktionen der UGTs 84A1-4 hin. Die Transkriptmenge der *UGT 84A2* in der KO-Linie war nach 10 h UV-B-Behandlung nur leicht abgesenkt gegenüber dem Wildtyp. Allerdings war erneut die UGT-Aktivität des Blattextrakts gegenüber Sinapinsäure deutlich reduziert. Dies gilt für UV-B gestresste und nicht-gestresste Pflanzen. Das Metabolitenprofil änderte sich dagegen kaum in der Linie *UGT 84A2 KO* gegenüber dem Wildtyp. Sinapoylglucose akkumulierte in der KO-Linie ebenfalls vermehrt unter UV-B-Stress im Vergleich zu unbehandelten Proben. Im WT verringerte sich der Sinapoylglucose-Gehalt nach 6 d etwas gegenüber 10 h UV-B-Stress, während in der KO-Linie nach 6 d mehr Sinapoylglucose produziert wurde. In beiden Fällen wurde aber nach UV-B-Behandlung mehr Sinapoylglucose produziert. Möglicherweise kann dies mit biologischer Varianz erklärt werden. Die Akkumulation von Sinapoylmalat unterschied sich nicht im WT und in der KO-Linie. Diese Daten sprechen dafür, dass die Restaktivität von der UGT 84A1, A3 und A4 gegenüber Sinapinsäure ausreicht, um bei Ausfall von der UGT 84A2 genügend Sinapoylglucose zu synthetisieren. Werden die Transkriptionsanalysen zugrunde gelegt, ist wahrscheinlich die UGT 84A3 hauptverantwortlich für die Aufrechterhaltung des Gehalts

an Sinapoylglucose, da die UGT 84A1 und A4 in Rosettenblättern nur sehr schwach exprimiert werden. Während demnach in Arabidopsis der Ausfall der UGT 84A2 kompensiert werden kann, scheint dies in *Brassica napus* nicht der Fall zu sein. Hier zeigte sich in RNAi-Linien gegen die *BnSGT1*, dem homologen Gen der UGT 84A2 in Raps, dass eine Suppression der Genexpression zu einem deutlich verminderten Gehalt an Sinapatester einschließlich Sinapoylmalat führt. In *Brassica napus* wurde in Rosettenblättern lediglich die Expression des homologen Gens der UGT 84A2 nachgewiesen (Mittasch et al., 2007). Hier gibt es keine Überlappung der Genexpressionsmuster von Ester-bildenden Glucosyltransferasen wie in Arabidopsis. Dadurch läßt sich der deutliche Unterschied im Metabolitenprofil zwischen supprimierten Raps- und Arabidopsis-Linien unter UV-B-Stress erklären.

UV-B-Strahlung erhöht die Synthese von Flavonoiden und Sinapatester (Li et al., 1993; Shirley et al., 1995; Sheahan, 1996), weshalb sie als potentielle UV-Schutzpigmente angesehen werden. Beide Substanzklassen haben Absorptionsmaxima im UV-Bereich (Sheahan, 1996) und sind in der Epidermis sowie im subepidermalen Blattgewebe lokalisiert (Li et al., 1993; Hause et al., 2002). Arabidopsis-Mutanten wie *fah1*, denen die Sinapatester fehlen, reagieren am sensitivsten gegenüber UV-B-Strahlung (Landry et al., 1995). Allerdings ist in der *fah1*-Mutante der Gehalt an Flavonoiden ebenfalls reduziert. Der *tt5*-Mutante fehlt wie der *tt4* das komplette Flavonoid Spektrum. Trotzdem reagiert die *tt5* sensitiver gegenüber UV-B-Stress als die *tt4*-Mutante, da sie auch einen verringerten Gehalt von Sinapatester besitzt (Li et al., 1993). Die Sensitivität der Mutanten gegenüber UV-Strahlung läßt sich demnach in folgende Reihenfolge bringen: *fah1* > *tt5* > *tt4*. Je mehr Verbindungen aus beiden Substanzklassen fehlen, desto sensitiver reagieren die Pflanzen gegenüber UV-Exposition. Beide Substanzklassen tragen daher offensichtlich einen Teil zum Schutz gegenüber UV-B-Strahlung bei. Für die *tt4*-Mutante konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Ausfall von Flavonoiden durch eine erhöhte Produktion von Sinapatester kompensiert wird. Allerdings scheint der Arabidopsis Ökotyp Ler prinzipiell weniger Sinapatester zu synthetisieren als Col-0. Möglicherweise unterscheiden sich beide Ökotypen genetisch voneinander, was zur unterschiedlichen Synthese von Sinapatester führt. Die *sng1*-Mutante zeigte nach 33 h UV-B-Stress eine vermehrte Flavonoid-Synthese gegenüber dem WT (Col.), möglicherweise um den Ausfall von Sinapoylmalat zu kompensieren, was allerdings auch durch die Akkumulation von Sinapoylglucose nach 33 h UV-B-Stress gewährleistet wird. Wahrscheinlich werden in der Pflanze beide Biosynthesewege induziert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Sinapatester für die Kurzzeit-Adaptation an erhöhte UV-B-Strahlung von Bedeutung sind, während bei längerem Einwirken der schädlichen Strahlung die Flavonoide den Schutz gewährleisten. Sowohl in Raps, als auch

in Arabidopsis konnte gezeigt werden, dass vermehrt Sinapatester nach 10 h UV-B-Stress gebildet werden, deren Akkumulation nach 6 d aber wieder zurückging. Flavonoide akkumulieren zwar auch bereits nach 10 h UV-B-Stress, nach 6 d nimmt dieser Anteil gegenüber nicht-gestressten Pflanzen aber weiter zu. In welchen Weg der Phenylpropanstoffwechsel gelenkt wird ausgehend von L-Phenylalanin sollen Versuche unter UV-B-Stress mit radioaktiv markiertem Phenylalanin zeigen.

4.4. Regulation der *UGT 84A1-4* im Samen

Beim Samen handelt es sich um ein komplexes Organ mit unterschiedlichen Genotypen: der diploide Embryo, das triploide Endosperm und die Samenschale (Testa), die den mütterlichen Genotyp besitzt (Ohto et al., 2007). Schon daraus wird ersichtlich, dass es sich bei der Samenentwicklung um einen sehr komplexen Vorgang handelt, an dessen Regulation viele Faktoren beteiligt sind. Mutierte Allele des *FUS3*-Gens, das einen Transkriptionsfaktor der B3-Familie codiert (Luerksen et al., 1998), spielten eine wichtige Rolle für die Analyse der transkriptionellen Regulation während der Samenentwicklung. Da Sinapin in Brassicaceen samenspezifisch synthetisiert wird (Regenbrecht und Strack, 1985), können unterschiedliche Konzentrationen dieses Metaboliten auf eine veränderte Regulation des Samenstoffwechsels hinweisen. In *fus3*-Mutanten konnte ein verminderter Sinapin-Gehalt nachgewiesen werden (Tiedemann et al., 2007). Die Hypothese, dass das *FUS3*-Gen möglicherweise die samenspezifische Synthese von Sinapin reguliert, lag nahe und sollte überprüft werden. Dazu standen zwei *fus3*-Mutanten zur Verfügung. Die *fus3-3*-Mutante ist durch chemische Mutagenese entstanden und wurde durch phänotypische Selektion (dunkle Samenfarbe, erhöhter Anthocyanin-Gehalt) detektiert (Müller, 1963). Die Mutante *fus3-T* wurde durch ausschließliche Selektion auf eine T-DNA-Insertion im *FUS3*-Gen erhalten, unabhängig von phänotypischen Merkmalen. Während die Samen von beiden Mutanten keine Dormanz zeigen, einen reduzierten Gehalt an Speicherproteinen aufweisen und behaarte Keimblätter besitzen, gibt es auch deutliche Unterschiede. So kommt es in der *fus3-T*-Mutante nicht zu einer Akkumulation von Anthocyaninen. Die Zellen von reifenden *fus3-T*-Embryos können sich in typische Speicherzellen differenzieren, während embryonale *fus3-3*-Zellen einen blattähnlichen Differenzierungsgrad aufweisen (Tiedemann et al., 2007). Daneben gibt es aber auch intermediäre Unterschiede zwischen den beiden Mutanten. Der Gehalt an freien Aminosäuren ist in der *fus3-T*-Mutante geringer als in der *fus3-3*-Mutante. Die Zusammensetzung der Kohlenhydrate ist in beiden Mutanten verändert, aber auch hier ist *fus3-T* dem Wildtyp ähnlicher als *fus3-3*. Das *fus3-T*-Allel scheint demnach etwas schwächer als das *fus3-3*-Allel zu sein. In der *fus3-T*-Mutante konnte kein Transkript mehr nachgewiesen werden. Es handelt sich um eine echte „loss of function“ Mutante. In der *fus3-3*-Mutante gibt es dagegen noch ein

aberrantes Transkript. Dieses Transkript wird in ein neomorphes Protein translatiert. Daher zeigt die *fus3-3* Mutante einen komplexen Phänotyp der einerseits auf den Verlust der Fus3 Funktion zurückgeht, aber auch auf die pleiotropen Effekte des neomorphen Proteins hinweist, das nachweislich über Bindekapazität mit DNA verfügt, aber in einer schwächeren und unspezifischeren Form als das intakte Fus3-Protein an die DNA bindet. In der *fus3-3*-Mutante differenzieren sich die Zellen von reifenden Embryos direkt zu blattähnlichen Zellen. Dies zeigt sich in der Bildung von Zentralvakuolen, in die Anthocyane eingelagert werden. Die Anthocyanin Bildung geht wahrscheinlich auf Trockenstress zurück. In der *fus3-T*-Mutante differenzieren sich die Zellen ähnlich wie im Wildtyp zu typischen Speicherzellen. Deshalb ist diese Mutante nicht lethal und zeigt keine Anthocyanin Akkumulation (Tiedemann et al., 2007). Demnach scheint es ein sekundärer Effekt der *fus3-3*-Mutante zu sein, dass kein Sinapin detektiert werden kann, da die Zellen einen anderen Differenzierungszustand besitzen als Samen und so andere Regulationsmechanismen die Sinapinsynthese erst gar nicht aktivieren. In der Mutante *fus3-T* ist die Differenzierung der Zellen nicht in dem Maße gestört wie in der *fus3-3*-Mutante. Hier kann Sinapin detektiert werden, in der Mutante allerdings signifikant weniger als im Wildtyp. Möglicherweise handelt es sich hier um einen intermediären Effekt und die Reduzierung des Sinapin-Gehalts läßt sich nicht auf einen direkten Einfluss des *FUS3*-Gens zurückführen. Hierfür spricht auch, dass die Genexpression der *UGT 84A2* und der *SCT* im Wildtyp (WS) und der *fus3-T*-Mutante gleich ist und so die Reduktion des Sinapin-Gehalts andere Gründe haben muss als eine direkte Interaktion des Fus3-Proteins mit dem Promotor der *UGT 84A2* oder der *SCT*.

Wahrscheinlich wird der Sinapinstoffwechsel im Samen auf transkriptioneller Ebene durch andere Faktoren als *FUS3* reguliert. Eine mögliche Gruppe von Transkriptionsfaktoren sind die *myb*-Faktoren. Diese spielen bei der Regulation des Phenylpropanstoffwechsels in *Arabidopsis* eine wichtige Rolle (Stracke et al., 2001). In Mutanten verschiedener *myb*-Gene konnte die Reduzierung der Genexpression von der *UGT 84A1* in Wurzeln belegt werden (Stracke et al., 2007). Es wäre demnach interessant in Samen dieser Mutanten den Sinapin-Gehalt zu untersuchen, um einen möglichen Einfluss der *myb*-Faktoren auf die Sinapinsynthese zu belegen.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Doktorarbeit beschäftigte sich mit der zentralen Frage, welche Funktionen die Ester-bildenden Glucosyltransferasen UGT 84A1, A2, A3 und A4 im komplexen Phenylpropanstoffwechsel von *Arabidopsis thaliana* ausüben und ob die einzelnen Enzyme *in vivo* redundante oder spezifische Aufgaben haben.

In *Brassica napus* konnte durch Suppression des UGT 84A2-homologen Gens (*BnSGT1*) der Sinapin-Gehalt in Samen deutlich reduziert werden. In *Arabidopsis* zeigte sich, dass der Sinapin-Stoffwechsel durch die Einzel-Suppression von *UGT 84A2* oder der anderen UGTs nicht so effizient beeinflusst werden kann, da in *Arabidopsis* in allen Geweben und Entwicklungsphasen mehrere Gene aus der UGT 84A4-Subfamilie exprimiert werden. Dies bildet die Grundlage für funktionale Redundanz. Diese Redundanz wurde durch Modulation der Genexpression von vier UGTs in Samen, Keimlingen und Rosettenblättern belegt. Mit Hilfe von Insertions- und Überexpressionslinien konnte gezeigt werden, dass vor allem die Veresterung von Sinapinsäure zu Sinapoylglucose von der UGT 84A4-Subfamilie katalysiert wird, während andere lösliche Glucose-Ester mit Hilfe der HPLC nicht detektiert werden konnten.

Allerdings konnte die HCA-Zusammensetzung der Zellwand durch Modulation der Expression der *UGT 84A1*, *A2* und *A3* verändert werden. Vor allem in den *UGT 84A3*-überexprimierten Linien kommt es zu einem einen signifikanten Anstieg im Gehalt an Cumar- und Ferulasäure, während diese HCAs in der Insertionslinie reduziert sind.

Für die UGT 84A4 konnten Hinweise auf eine spezifische Funktion in der Wurzel gefunden werden. HPLC-Analysen der Wurzeln zeigten in der Insertionslinie ein verändertes Peak-Muster im Vergleich zum Wildtyp mit UV-Spektren von HCA-Konjugaten.

Durch UV-B-Strahlung kann die Expression der *UGT 84A4*-Gene induziert werden. Dabei wurde deutlich, dass Sinapatester vor allem für den kurzzeitigen Schutz von Bedeutung sind, während Flavonoide gegenüber längerfristigem Einwirken von UV-B-Strahlung als Schutz fungieren.

Weiterführende Arbeiten

Aufgrund der nachgewiesenen funktionalen Redundanz von UGT 84A1-4 ist eine Erzeugung von Mehrfach-Mutanten notwendig, um deutlichere Änderungen im Sinapatester-Stoffwechsel zu erzielen. Zur Bestätigung der Redundanz der UGT 84A4-Subfamilie kann die Insertionsmutante der *UGT 84A2* mit den jeweiligen T-DNA-Insertionslinien der drei anderen UGTs gekreuzt werden. Da die UGT 84A1-, A3- und A4-Gene tandemartig gekoppelt auf Chromosom III vorliegen, können die KO-Linien dieser Gene nicht gekreuzt werden. Möglicherweise kann durch Kreuzung der Linien *UGT 84A2 KO* und *UGT 84A3 KO* der Sinapin- bzw. Sinapoylmalat-Gehalt in der Pflanzen weiter reduziert werden im Vergleich zur Insertionsmutante der UGT 84A2. Damit würde z. B. bestätigt werden, dass die UGT 84A3 eine bedeutende Rolle bei der restlichen UGT-Aktivität von ca. 10% gegenüber Sinapinsäure in der Insertionsmutante *UGT 84A2 KO* spielt.

Da sich neben den Änderungen im löslichen Pool der HCA-Derivate auch die Zusammensetzung der Zellwände ändert, sollten umfangreichere Analysen der Zellwände vorgenommen werden. Durch radioaktiv markiertes L-Phenylalanin könnte der Biosyntheseweg von Hydroxyzimtsäuren und der Weg in die Zellwand verfolgt werden. Diese Untersuchungen könnten zur Charakterisierung der Einbau-Vorgänge von HCAs in die Zellwände führen.

Über die Regulation des Phenylpropanstoffwechsels in Wurzeln ist bisher wenig bekannt. Da HPLC-Analysen der Wurzeln zeigten, dass sich das Profil an Metaboliten zwischen Wiltyp und T-DNA-Insertionslinie unterschied, kann die verstärkte Untersuchung der Linie *UGT 84A4 KO* im Bezug auf den Wurzel-Metabolismus Aufschlüsse über die spezifische Funktion der UGT 84A4 in Wurzeln geben.

Zum Schutz gegenüber erhöhter UV-B-Strahlung schützt sich die Pflanzen mit der vermehrten Synthese von Flavonoiden und Sinapatestern. Zur genaueren Untersuchung der Frage, welcher Stoffwechselweg bevorzugt eingeschlagen wird unter UV-B-Stress, wurde an der GSF in München ein Versuch mit radioaktiv markiertem L-Phenylalanin gestartet. Unter UV-B-Exposition soll der Biosyntheseweg anhand von radioaktiv markiertem Kohlenstoff von L-Phenylalanin verfolgt werden. Dadurch sollte man zeigen können, ob mehr radioaktiv markierter Kohlenstoff in den Flavonoid- oder Sinapatester-Stoffwechsel fließt und welcher Biosyntheseweg unter UV-Stress bevorzugt induziert wird.

6. Literaturverzeichnis

- Alonso, J.M., et al. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**, 653-657.
- Bäumlein, H., Wobus, U., Pustell, J., and Kafatos, F.C. (1986). The legumin gene family: structure of a B type gene of *Vicia faba* and a possible legumin gene specific regulatory element. *Nucleic Acids Res* **14**, 2707-2720.
- Bäumlein, H., Nagy, I., Villarroel, R., Inze, D., and Wobus, U. (1992). Cis-analysis of a seed protein gene promoter: the conservative RY repeat CATGCATG within the legumin box is essential for tissue-specific expression of a legumin gene. *Plant J* **2**, 233-239.
- Bäumlein H., et al. (1994). The *FUS3* gene of *Arabidopsis thaliana* is a regulator of gene expression during late embryogenesis. *The Plant Journal* **6**, 379-387.
- Bharti, A.K., and Khurana, J.P. (1997). Mutants of *Arabidopsis* as tools to understand the regulation of phenylpropanoid pathway and UVB protection mechanisms. *Photochem Photobiol* **65**, 765-776.
- Bieza, K., and Lois, R. (2001). An *Arabidopsis* mutant tolerant to lethal ultraviolet-B levels shows constitutively elevated accumulation of flavonoids and other phenolics. *Plant Physiol* **126**, 1105-1115.
- Boerjan, W., Ralph, J., and Baucher, M. (2003). Lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* **54**, 519-546.
- Bokern, M., Wray, V., and Strack, D. (1991). Accumulation of phenolic acid conjugates and betacyanins, and changes in the activities of enzymes involved in feruloylglucose metabolism in cell-suspension cultures of *Chenopodium rubrum L.* *Planta* **184**, 261-270.
- Booij-James, I.S., Dube, S.K., Jansen, M.A., Edelman, M., and Mattoo, A.K. (2000). Ultraviolet-B radiation impacts light-mediated turnover of the photosystem II reaction center heterodimer in *Arabidopsis* mutants altered in phenolic metabolism. *Plant Physiol* **124**, 1275-1284.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Brandl, W., Herrmann, K., and Grothjahn, L. (1984). Hydroxycinnamoyl esters of malic acid in small radish (*Raphanus sativus L. var. sativus*). *Z für Naturforschung* **39c**, 515-520.
- Buchanan, B.B., Gruissem, W., and Jones, R.L. (2000). *Biochemistry and molecular biology of plants*, American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland.
- Caldwell, M.M. (1971). Solar ultraviolet radiation and the growth and development of higher plants. *Photophysiology* **6**, 131-177.
- Chapple, C.C., Vogt, T., Ellis, B.E., and Somerville, C.R. (1992). An *Arabidopsis* mutant defective in the general phenylpropanoid pathway. *Plant Cell* **4**, 1413-1424.
- Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**, 735-743.
- Do, C.T., et al. (2007). Both caffeoyl Coenzyme A 3-O-methyltransferase 1 and caffeic acid O-methyltransferase 1 are involved in redundant functions for lignin, flavonoids and sinapoyl malate biosynthesis in *Arabidopsis*. *Planta* **226**, 1117-1129.
- Döhring, T., Köfferlein, M., Thiel, S., and Seidlitz, H.K. (1996). Spectral shaping of artificial UV-B irradiation for vegetation stress research. *J Plant Physiol* **148**, 115-119.

- Franke, R., et al.** (2002a). Changes in secondary metabolism and deposition of an unusual lignin in the *ref8* mutant of *Arabidopsis*. *Plant J* **30**, 47-59.
- Franke, R., et al.** (2002b). The *Arabidopsis REF8* gene encodes the 3-hydroxylase of phenylpropanoid metabolism. *Plant J* **30**, 33-45.
- Fry, S.C.** (1982). Phenolic components of the primary cell wall. Feruloylated disaccharides of D-galactose and L-arabinose from spinach polysaccharide. *Biochem J* **203**, 493-504.
- Fry, S.C.** (1986). Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annu. rev. Plant Physiol.* **37**, 165-186.
- Gachon, C.M., Langlois-Meurinne, M., and Saindrenan, P.** (2005). Plant secondary metabolism glycosyltransferases: the emerging functional analysis. *Trends Plant Sci* **10**, 542-549.
- Giraudat, J., et al.** (1992). Isolation of the *Arabidopsis ABI3* gene by positional cloning. *Plant Cell* **4**, 1251-1261.
- Goujon, T., et al.** (2003). A new *Arabidopsis thaliana* mutant deficient in the expression of O-methyltransferase impacts lignins and sinapoyl esters. *Plant Mol Biol* **51**, 973-989.
- Grand, C.** (1984). Ferulic acid 5-hydroxylase: a new cytochrome P₄₅₀-dependent enzyme from higher plant microsomes involved in lignin synthesis. *FEBS Lett* **169**, 7-11.
- Grubb, C.D., et al.** (2004). *Arabidopsis* glucosyltransferase UGT74B1 functions in glucosinolate biosynthesis and auxin homeostasis. *Plant J* **40**, 893-908.
- Hahlbrock, K., and Scheel, D.** (1989). Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**, 347-369.
- Hamberger, B., and Hahlbrock, K.** (2004). The 4-coumarate:CoA ligase gene family in *Arabidopsis thaliana* comprises one rare, sinapate-activating and three commonly occurring isoenzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2209-2214.
- Hartley, R.D., and Ford, C.W.** (1989). Phenolic constituents of plant cell walls and wall biodegradability. *Plant Cell Wall Polymers, Biogenesis and Biodegradation*, Am. Chem. Soc. ACS Symp. **399**, 137-149.
- Hartmann, T.** (1996). Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **80**, 177-188.
- Hartmann, T., and Ober, D.** (2002). Der pflanzliche Sekundärstoffwechsel: Biologische Notwendigkeit und pharmazeutischer Nutzen. *Carolo-Wilhelmina: Forschungsmagazin der Technischen Universität Braunschweig* **38**, 26-32.
- Hause, B., Meyer, K., Viitanen, P.V., Chapple, C., and Strack, D.** (2002). Immunolocalization of 1-O-sinapoylglucose:malate sinapoyltransferase in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **215**, 26-32.
- Hausmann, L., and Töpfer, R.** (1999). Entwicklung von Plasmid-Vektoren. *BioEngineering für Rapsorten nach Maß. Vorträge für Pflanzenzüchtung*, 155-173.
- Heimann, W., Herrmann, K., and Feucht, G.** (1971). Über das Vorkommen von Hydroxyzimtsäuren in Gemüse. *Z. für Lebensmittel-Untersuch. u. Forschung* **145**, 199-205.
- Hellens, R.P., Edwards, E.A., Leyland, N.R., Bean, S., and Mullineaux, P.M.** (2000). pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol* **42**, 819-832.
- Heller, W., and Kuhn, T.** (1985). Elicitor induction of a microsomal 5-O-(4-coumaroyl)shikimate 3'-hydroxylase in parsley cell suspension cultures. *Arch Biochem Biophys* **241**, 453-460.

- Hoffmann, L., Maury, S., Martz, F., Geoffroy, P., and Legrand, M.** (2003). Purification, cloning, and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinate ester intermediates in phenylpropanoid metabolism. *J Biol Chem* **278**, 95-103.
- Hood, E.E., Gelvin, S.B., Melchers, L.S., and Hoekema, A.** (1993). New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Res* **2**, 208-218.
- Hughes, J., and Hughes, M.A.** (1994). Multiple secondary plant product UDP-glucose glucosyltransferase genes expressed in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cotyledons. *DNA Seq* **5**, 41-49.
- Humphreys, J.M., and Chapple, C.** (2002). Rewriting the lignin roadmap. *Curr Opin Plant Biol* **5**, 224-229.
- Humphreys, J.M., Hemm, M.R., and Chapple, C.** (1999). New routes for lignin biosynthesis defined by biochemical characterization of recombinant ferulate 5-hydroxylase, a multifunctional cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10045-10050.
- Hundle, B.S., O'Brien, D.A., Alberti, M., Beyer, P., and Hearst, J.E.** (1992). Functional expression of zeaxanthin glucosyltransferase from *Erwinia herbicola* and a proposed uridine diphosphate binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 9321-9325.
- Hüsken, A., et al.** (2005). Reduction of sinapate ester content in transgenic oilseed rape (*Brassica napus*) by dsRNAi-based suppression of *BNSGT1* gene expression. *Molecular Breeding* **16**, 127-138.
- Hutzler, P., et al.** (1996). Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. *Journal of Experimental Botany* **49**, 953-965.
- Iiyama, K., Lam, T., and Stone, B.A.** (1994a). Covalent Cross-Links in the Cell Wall. *Plant Physiol* **104**, 315-320.
- Iiyama, K., Lam, T.B.T., Kasuya, N., and Stone, B.A.** (1994b). Rapid and simple determination of O-acetyl groups bound to plant cell walls by acid hydrolysis and ¹H-nmr measurement. *Phytochemistry* **35**, 959-961.
- Ishii, T.** (1997). Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Science* **127**, 111-127.
- Jin, H., et al.** (2000). Transcriptional repression by AtMYB4 controls production of UV-protecting sunscreens in *Arabidopsis*. *Embo J* **19**, 6150-6161.
- Jones, P., and Vogt, T.** (2001). Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta* **213**, 164-174.
- Kerschen, A., Napoli, C.A., Jorgensen, R.A., and Muller, A.E.** (2004). Effectiveness of RNA interference in transgenic plants. *FEBS Lett* **566**, 223-228.
- Kesy, J.M., and Bandurski, R.S.** (1990). Partial purification and characterization of indol-3-ylacetylglucose:myo-inositol indol-3-ylacetyltransferase (indoleacetic acid-inositol synthase). *Plant Physiol* **94**, 1598-1604.
- Klempnauer, K.H., Gonda, T.J., and Bishop, J.M.** (1982). Nucleotide sequence of the retroviral leukemia gene v-myb and its cellular progenitor c-myb: the architecture of a transduced oncogene. *Cell* **31**, 453-463.
- Koncz, C., and Schell, J.** (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Gen Genet* **204**, 383-396.
- Koornneef, M., and Karsen, C.M.** (1994). Seed dormancy and germination. *Arabidopsis*, E. M. Meyerowitz and C. R. Somerville, eds., Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Press.

- Kowalczyk, S., and Bandurski, R.S.** (1991). Enzymic synthesis of 1-O-(indol-3-ylacetyl)-beta-D-glucose. Purification of the enzyme from *Zea mays*, and preparation of antibodies to the enzyme. *Biochem J* **279** (Pt 2), 509-514.
- Kuromori, T., et al.** (2004). A collection of 11 800 single-copy Ds transposon insertion lines in *Arabidopsis*. *Plant J* **37**, 897-905.
- Landry, L.G., Chapple, C.C., and Last, R.L.** (1995). *Arabidopsis* mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. *Plant Physiol* **109**, 1159-1166.
- Lanot, A., et al.** (2006). The glucosyltransferase UGT72E2 is responsible for monolignol 4-O-glucoside production in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **48**, 286-295.
- Lehfeldt, C., et al.** (2000). Cloning of the *SNG1* gene of *Arabidopsis* reveals a role for a serine carboxypeptidase-like protein as an acyltransferase in secondary metabolism. *Plant Cell* **12**, 1295-1306.
- Li, J., Ou-Lee, T.M., Raba, R., Amundson, R.G., and Last, R.L.** (1993). *Arabidopsis* Flavonoid Mutants Are Hypersensitive to UV-B Irradiation. *Plant Cell* **5**, 171-179.
- Li, Y., Baldauf, S., Lim, E.K., and Bowles, D.J.** (2001). Phylogenetic analysis of the UDP-glycosyltransferase multigene family of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **276**, 4338-4343.
- Lim, E.K., and Bowles, D.J.** (2004). A class of plant glycosyltransferases involved in cellular homeostasis. *Embo J* **23**, 2915-2922.
- Lim, E.K., et al.** (2001). Identification of glucosyltransferase genes involved in sinapate metabolism and lignin synthesis in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **276**, 4344-4349.
- Liu, L., Gitz, D.C., and McClure, J.W.** (1995). Effects of UV-B on flavonoids, ferulic acid, growth and photosynthesis in barley primary leaves. *Physiol Plant* **93**, 725-733.
- Lorenzen, M., Racicot, V., Strack, D., and Chapple, C.** (1996). Sinapic acid ester metabolism in wild type and a sinapoylglucose-accumulating mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **112**, 1625-1630.
- Luerssen, H., Kirik, V., Herrmann, P., and Misera, S.** (1998). *FUSCA3* encodes a protein with a conserved VP1/AB13-like B3 domain which is of functional importance for the regulation of seed maturation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **15**, 755-764.
- Mackenzie, P.I., et al.** (1997). The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics* **7**, 255-269.
- Markham, K.R., and Mabry, T.J.** (1975). Mass spectrometry of flavonoids. *The Flavonoids*, London: Chapman and Hall, 78-126.
- Markham, K.R.** (1989). Flavones, Flavonols and their Glycosides. *Methods in Plant Biochemistry* Vol. 1, 197-235.
- Martin, C., and Paz-Ares, J.** (1997). MYB transcription factors in plants. *Trends Genet* **13**, 67-73.
- Mathew, S., and Abraham, T.E.** (2004). Ferulic acid: an antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications. *Crit Rev Biotechnol* **24**, 59-83.
- McCarty, D.R., et al.** (1991). The Viviparous-1 developmental gene of maize encodes a novel transcriptional activator. *Cell* **66**, 895-905.
- McGinnis, K., et al.** (2007). Assessing the efficiency of RNA interference for maize functional genomics. *Plant Physiol* **143**, 1441-1451.
- Meinke, D.W.** (1992). A homeotic mutant of *Arabidopsis thaliana* with leafy cotyledons. *Science* **258**, 1647-1650.

- Meinke, D.W., Franzmann, L.H., Nickle, T.C., and Yeung, E.C.** (1994). Leafy Cotyledon Mutants of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **6**, 1049-1064.
- Meyer, K., Cusumano, J.C., Somerville, C., and Chapple, C.C.** (1996). Ferulate-5-hydroxylase from *Arabidopsis thaliana* defines a new family of cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6869-6874.
- Milkowski, C., Baumert, A., and Strack, D.** (2000a). Identification of four *Arabidopsis* genes encoding hydroxycinnamate glucosyltransferases. *FEBS Lett* **486**, 183-184.
- Milkowski, C., Baumert, A., and Strack, D.** (2000b). Cloning and heterologous expression of a rape cDNA encoding UDP-glucose:sinapate glucosyltransferase. *Planta* **211**, 883-886.
- Milkowski, C., Baumert, A., Schmidt, D., Nehlin, L., and Strack, D.** (2004). Molecular regulation of sinapate ester metabolism in *Brassica napus*: expression of genes, properties of the encoded proteins and correlation of enzyme activities with metabolite accumulation. *Plant J* **38**, 80-92.
- Mittasch, J., Strack, D., and Milkowski, C.** (2007). Secondary product glycosyltransferases in seeds of *Brassica napus*. *Planta* **225**, 515-522.
- Mock, H.P., and Strack, D.** (1992). Sinapoylglucose:Malate Sinapoyltransferase Activity in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica rapa*. *Z. für Naturforschung* **47 c**, 680-682.
- Mock, H.P., and Strack, D.** (1993). Energetics of uridine 5' diphosphoglucose:hydroxycinnamic acid acyl-glycosyltransferase reaction. *Phytochemistry* **32**, 575-597.
- Müller, A.J.** (1963). Embryonentest zum Nachweis rezessiver Lethalfaktoren bei *Arabidopsis thaliana*. *Biologisches Zentralblatt* **82**, 133-163.
- Müller, A.J., and Heidecker, U.** (1968). Lebensfähige und letale *fusca* Mutanten bei *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis Informations Service* **5**, 54-55.
- Mullis, K., et al.** (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**, 263-273.
- Nagaya, S., et al.** (2005). Expression of randomly integrated single complete copy transgenes does not vary in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **46**, 438-444.
- Nair, R.B., Bastress, K.L., Ruegger, M.O., Denault, J.W., and Chapple, C.** (2004). The *Arabidopsis thaliana* REDUCED EPIDERMAL FLUORESCENCE1 gene encodes an aldehyde dehydrogenase involved in ferulic acid and sinapic acid biosynthesis. *Plant Cell* **16**, 544-554.
- Nielsen, J.K., Olsen, O., Pedersen, L.H., and Sørensen, H.** (1984). 2-*O*-(*p*-Coumaroyl)-L-malate, 2-*O*-caffeoyle-L-malate and 2-*O*-feruloyl-L-malate in *Raphanus sativus*. *Phytochemistry* **23**, 1741-1743.
- Nurmann, G., and Strack, D.** (1979). Sinapine esterase. I. Characterisation of sinapine esterase from cotyledons of *Raphanus sativus*. *Z für Naturforschung* **34**, 715-720.
- Nurmann, G., and Strack, D.** (1981). Formation of 1-sinapoylglucose from free sinapic acid and UDP-glucose by a cell-free system from *Raphanus sativus* seedlings. *Z für Pflanzenphysiol* **102**, 11-17.
- Ohto, M., Stone, S.L., and Harada, J.J.** (2007). aus Seed Development, Dormancy and Germination: Genetic control of seed development and seed mass. *Annual Plant Reviews* **27**, 1-24.
- Pabo, C.O., and Sauer, R.T.** (1992). Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu Rev Biochem* **61**, 1053-1095.
- Paquette, S., Moller, B.L., and Bak, S.** (2003). On the origin of family 1 plant glycosyltransferases. *Phytochemistry* **62**, 399-413.
- Peer, W.A., et al.** (2001). Flavonoid accumulation patterns of transparent testa mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **126**, 536-548.

- Phillippe, S., Tranquet, O., Utile, J.P., Saulnier, L., and Guillon, F.** (2007). Investigation of ferulate deposition in endosperm cell walls of mature and developing wheat grains by using a polyclonal antibody. *Phytochemistry* **225**, 1287-1299.
- Piber, M., and Koehler, P.** (2005). Identification of dehydro-ferulic acid-tyrosine in rye and wheat: evidence for a covalent cross-link between arabinoxylans and proteins. *J Agric Food Chem* **53**, 5276-5284.
- Poppenberger, B., et al.** (2005). The UGT73C5 of *Arabidopsis thaliana* glucosylates brassinosteroids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 15253-15258.
- Regenbrecht, J., and Strack, D.** (1985). Distribution of 1-sinapoylglucose: choline sinapoyltransferase activity in the brassicaceae. *Phytochemistry* **24**, 407-410.
- Reznik, H.** (1960). Vergleichende Biologie der Phenylpropane. *Ergebnisse der Biologie* **23**, 14-46.
- Richter, G.** (1998). Stoffwechselfysiologie der Pflanzen. Thieme Verlag, Stuttgart.
- Rohde, A., et al.** (2004). Molecular phenotyping of the *pal1* and *pal2* mutants of *Arabidopsis thaliana* reveals far-reaching consequences on phenylpropanoid, amino acid, and carbohydrate metabolism. *Plant Cell* **16**, 2749-2771.
- Romero, I., et al.** (1998). More than 80R2R3-MYB regulatory genes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **14**, 273-284.
- Rosler, J., Krekel, F., Amrhein, N., and Schmid, J.** (1997). Maize phenylalanine ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase activity. *Plant Physiol* **113**, 175-179.
- Rosso, M.G., et al.** (2003). An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Mol Biol* **53**, 247-259.
- Ruegger, M., and Chapple, C.** (2001). Mutations that reduce sinapoylmalate accumulation in *Arabidopsis thaliana* define loci with diverse roles in phenylpropanoid metabolism. *Genetics* **159**, 1741-1749.
- Ruhland, C.T., and Day, T.A.** (2000). Effects of ultraviolet-B radiation on leaf elongation, production and phenylpropanoid concentrations of *Deschampsia antarctica* and *Colobanthus quitensis* in Antarctica. *Physiol Plant* **109**, 244-251.
- Ruhland, C.T., Xiong, F.S., Clark, W.D., and Day, T.A.** (2005). The influence of ultraviolet-B radiation on growth, hydroxycinnamic acids and flavonoids of *Deschampsia antarctica* during Springtime ozone depletion in Antarctica. *Photochem Photobiol* **81**, 1086-1093.
- Russell, D.W.** (1971). The metabolism of aromatic compounds in higher plants. X. Properties of the cinnamic acid 4-hydroxylase of pea seedlings and some aspects of its metabolic and developmental control. *J Biol Chem* **246**, 3870-3878.
- Russell, D.W., and Conn, E.E.** (1967). The cinnamic acid 4-hydroxylase of pea seedlings. *Arch Biochem Biophys* **122**, 256-258.
- Sachs, J.** (1873). Lehrbuch der Botanik. W. Engelmann, Leipzig.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T.** (1989). Molecular Cloning-a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press, New York.
- Schoch, G., et al.** (2001). CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* is a 3'-hydroxylase of phenolic esters, a missing link in the phenylpropanoid pathway. *J Biol Chem* **276**, 36566-36574.
- Shao, H., et al.** (2005). Crystal structures of a multifunctional triterpene/flavonoid glycosyltransferase from *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **17**, 3141-3154.
- Sheahan, J.J.** (1996). Sinapate esters provide greater UV-B attenuation than flavonoids in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *Am J Bot* **83**, 679-686.

- Shirley, A.M., McMichael, C.M., and Chapple, C.** (2001). The *sng2* mutant of *Arabidopsis* is defective in the gene encoding the serine carboxypeptidase-like protein sinapoylglucose:choline sinapoyltransferase. *Plant J* **28**, 83-94.
- Shirley, B.W., et al.** (1995). Analysis of *Arabidopsis* mutants deficient in flavonoid biosynthesis. *Plant J* **8**, 659-671.
- Singh, S., Green, A., Stoutjesdijk, P., and Liu, Q.** (2000). Inverted-repeat DNA: a new gene-silencing tool for seed lipid modification. *Biochem Soc Trans* **28**, 925-927.
- Sinlapadech, T., Stout, J., Ruegger, M.O., Deak, M., and Chapple, C.** (2007). The hyper-fluorescent trichome phenotype of the *brt1* mutant of *Arabidopsis* is the result of a defect in a sinapic acid: UDPG glucosyltransferase. *Plant J* **49**, 655-668.
- Smith, K.C., and Wang, T.C.** (1989). recA-dependent DNA repair processes. *Bioessays* **10**, 12-16.
- Smith, N.A., et al.** (2000). Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* **407**, 319-320.
- Stapleton, A.E.** (1992). Ultraviolet Radiation and Plants: Burning Questions. *Plant Cell* **4**, 1353-1358.
- Strack, D.** (1980). Enzymatic synthesis of 1-sinapoylglucose by UDP-glucose:sinapic acid glycosyltransferase from cotyledons of *Raphanus sativus*. *Z für Naturforschung* **35**, 204-208.
- Strack, D.** (1982). Development of 1-O-sinapoyl- β -d-glucose:L-malate-sinapoyltransferase activity in cotyledons of red radish (*Raphanus sativus l. var. sativus*). *Planta* **155**, 31-36.
- Strack, D., Knogge, W., and Dahlbender, B.** (1983). Enzymatic synthesis of sinapin from 1-O-sinapoylglucose and cholin by a cell-free system from developing seeds of red radish (*Raphanus sativus l. var. sativus*). *Z für Naturforschung* **38c**, 21-27.
- Strack, D., Bokern, M., Berlin, J., and Sieg, S.** (1984). Metabolic activity of hydroxycinnamic acid glucose ester in cell suspension cultures of *Chenopodium rubrum*. *Z für Naturforschung* **39c**, 902-907.
- Strack, D., Pieroth, M., Scharf, H., and Sharma, V.** (1985). Tissue distribution of phenylpropanoid metabolism in cotyledons of *Raphanus sativus*. *Planta* **164**, 507-511.
- Stracke, R., Werber, M., and Weisshaar, B.** (2001). The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Opin Plant Biol* **4**, 447-456.
- Stracke, R., et al.** (2007). Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedling. *Plant J* **50**, 660-677.
- Szerszen, J.B., Szczyglowski, K., and Bandurski, R.S.** (1994). *iaglu*, a gene from *Zea mays* involved in conjugation of growth hormone indole-3-acetic acid. *Science* **265**, 1699-1701.
- Tan, J., et al.** (2004). Universally occurring phenylpropanoid and species-specific indolic metabolites in infected and uninfected *Arabidopsis thaliana* roots and leaves. *Phytochemistry* **65**, 691-699.
- Tan, K.S., Hoson, T., Masuda, Y., and Kamisaka, S.** (1991). Correlation between cell wall extensibility and the content of diferulic and ferulic acids in cell walls of *Oryza sativa* coleoptiles grown under water and in air. *Physiol Plant* **83**, 397-403.
- Tan, K.S., Takayuki, H., Yoshio, M., and Seiichiro, K.** (1992). Involvement of cell-wall-bound diferulic acid in light-induced decrease in growth rate and cell wall extensibility of *Oryza* coleoptiles. *Plant Cell Physiol* **33**, 103-108.
- Thiel, S., et al.** (1996). A phytotron for plant stress research: How far can artificial lighting compare to natural sunlight? *J Plant Physiol* **148**, 456-463.

- Tiedemann, J., et al.** (2007). Dissection of a complex seed phenotype: Novel insights of FUSCA3 regulated developmental processes. *Developmental Biology*, eingereicht.
- Tkocz, N., and Strack, D.** (1980). Enzymatic synthesis of sinapoyl-L-malate from 1-sinapoylglucose and L-malate by a protein preparation from *Raphanus sativus* cotyledons. *Z für Naturforschung* **35c**, 835-837.
- Tsuchiya, Y., Nambara, E., Naito, S., and McCourt, P.** (2004). The FUS3 transcription factor functions through the epidermal regulator TTG1 during embryogenesis in Arabidopsis. *Plant J* **37**, 73-81.
- van der Krol, A.R., Mur, L.A., Beld, M., Mol, J.N., and Stuitje, A.R.** (1990). Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* **2**, 291-299.
- Vaucheret, H., Beclin, C., and Fagard, M.** (2001). Post-transcriptional gene silencing in plants. *J Cell Sci* **114**, 3083-3091.
- Vicient, C.M., and Delseny, M.** (1999). Isolation of total RNA from *Arabidopsis thaliana* seeds. *Anal Biochem* **268**, 412-413.
- Vogt, T., and Jones, P.** (2000). Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterization of a supergene family. *Trends Plant Sci* **5**, 380-386.
- von Roepenack-Lahaye et al.** (2004), Profiling of Arabidopsis secondary metabolites by capillary liquid chromatography coupled to electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *Plant Physiol* **134**, 548-559.
- Wallace, G., and Fry, S.C.** (1994). Phenolic components of the plant cell wall. *Int Rev Cytol* **151**, 229-267.
- Wang, T., Iyer, L.M., Pancholy, R., Shi, X., and Hall, T.C.** (2005). Assessment of penetrance and expressivity of RNAi-mediated silencing of the Arabidopsis phytoene desaturase gene. *New Phytol* **167**, 751-760.
- Watzl, B., and Rechkemmer, G.** (2001). Phenolsäuren. *Ernährungs-Umschau* **48**, 413-416.
- Weisshaar, B., and Jenkins, G.I.** (1998). Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Curr Opin Plant Biol* **1**, 251-257.
- Wink, M.** (1999). Biochemistry of plant secondary metabolism. *Annual plant reviews*, part 2. CRC Press, London.
- Yamamoto, E., Bokelman, G.H., and Lewis, N.G.** (1989). Phenylpropanoid metabolism in cell walls. *Plant Cell Wall Polymers, Biogenesis and Biodegradation*, Am. Chem. Soc. ACS Symp. **399**, 68-88.

7. Anhang

Tabelle 7.1: Verwendete Oligonukleotide

Name des Primers	Sequenz in 5' - 3' Richtung
UGT 84A2 200 fw	GTTAGTGCCGAGGGAGGAAG
UGT 84A2 200 rev	CAGCCAAGACATGATTATGAC
UGT 84A1 200 fw	GGTAGTGCCAAGGGAGGAAGTG
UGT 84A1 200 rev	CCATTATCTTTAGTCTTCGTTACTC
UGT 84A3 200 fw	CAAGTGACTGATGCGGTGTACTTG
UGT 84A3 200 rev	TCACATGTTTCGTAACCAACTTGTC
UGT 84A4 200 fw	CGTGGAGCTTCCGATGAGAG
UGT 84A4 200 rev	CACGACATTATTAATGTTTGTCATTGTC
UGT 84A2 400 fw	AATTGCTAGCTCTGTGACGTGGCAGAAGAT
UGT 84A2 400 rev	AATTGGATCCACTTTAACGACATCATAAGC
UGT 84A1 400 fw	AATTGCTAGCGCCACGTGGCGGAAGAGTTC
UGT 84A1 400 rev	AATTGGATCCGATTTGCAAATGTCAC
UGT 84A3 400 fw	AATTGCTAGCTTCACATCCCTTCGGCTGTT
UGT 84A3 400 rev	AATTGGATCCGCTGGCTCGGATATA
UGT 84A4 400 fw	AATTGCTAGCCATCAGCTGTTCTTTGGGTC
UGT 84A4 400 rev	AATTGGATCCATGCAGTCACTATCTGGCTTGG
UGT 84A2 fw	ATGGAGCTAGAATCTTCTCC
UGT 84A2 rev	TTAAAAGCTTTTGATTGATCC
UGT 84A1 fw	ACAAACATACAAATAATTCT
UGT 84A1 rev	CAAACATGTGCCGAAGCC
UGT 84A3 fw	GATGGAAAGCACTGGAAAGG
UGT 84A3 rev	GATAAGAAGACAATACG
UGT 84A4 fw	ATGGAGATGGAATCGTCGTTACCTC
UGT 84A4 rev	TTACACGACATTATTAATGTTTGTC
UGT 84A2 50 fw	TGAAGACGACGAAGCTAGCAGA
UGT 84A2 50 rev	AGATGTGGTTCGGAGGATGGTTA
UGT 84A1 50 fw	GATGACCGGAGAGCTGATTTCT
UGT 84A1 50 rev	AACGCTCTCTAGGTGAGCAATG
UGT 84A3 50 fw	ATCTCGTTAAGAGATATAACAAGGAGCC
UGT 84A3 50 rev	CGTTGTTTATGAGACACGTCACC
UGT 84A4 50 fw	TCGGGCTAGGTTTTCTCCG
UGT 84A4 50 rev	TGTAGACAAATCCATCCTCGAAGA

Ubiquitin 50 fw	CCCAAAAAAGCCGTTAGGGT
Ubiquitin 50 rev	CGAGAGTAAAGCAAGGCGGT
UGT 84A2 UTR fw	Sinlapadech et al. 2007
UGT 84A2 UTR rev	Sinlapadech et al. 2007
UGT 84A1 UTR fw	Sinlapadech et al. 2007
UGT 84A1 UTR rev	Sinlapadech et al. 2007
UGT 84A3 UTR fw	Sinlapadech et al. 2007
UGT 84A3 UTR rev	Sinlapadech et al. 2007
UGT 84A4 UTR fw	Sinlapadech et al. 2007
UGT 84A4 UTR rev	Sinlapadech et al. 2007
Actin 200 fw	TGTATGTCGCCATCCAAGCTG
Actin 200 rev	CCGCTCTGCTGTTGTGGTG
SMT 200 fw	CTTCCTTTCGAACTTGAAACC
SMT 200 rev	CAAAGAAGGAGCACTTCCGTTG
SCT 200 fw	CCTTAGCTTCATCGTCTTATTTT
SCT 200 rev	GGTCCACCAGTGAGCCAAATC
PAL 200 fw	GGAGAGCATGAACAAAGGTACTGAC
PAL 200 rev	CTGACGAGCATGGCGGCTCTTG
CHS 200 fw	ACCATGTGCTTCAGGCGGAGTATC
CHS 200 rev	GCCTAGCTTAGGGACTTCG
pat fw	GACATCCGCCGTGCCACCGAG
pat rev	CGGTGACGGGCAGGACCGGAC
ntpII fw	GCGCGGCTATCGTGGCTGGC
ntpII rev	CAGCCCATTCGCCGCAAGC
LBb1	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT
Salk UGT 84A3 KO LP	AACGAGAGATGATGCCTGAGGT
Salk UGT 84A3 KO RP	TGACTGCATGGAATGGCTTGA
Gabi UGT 84A2 fw	GTGAATGGTCGTTGAATGTGTATC
Gabi UGT 84A1 KO fw	TGAACCTAGAAGAAGGATGGAGAA
Gabi UGT 84A4 KO fw	CTTCAAGCTCTAGAGGCAAGACAT
Gabi T-DNA rev	CCCATTTGGACGTGAATGTAGACAC
UGT 84A2 Prom fw	TTTAAGCTTGGTTCGTAGCACATCAACGAG
UGT 84A2 Prom rev	TTTGGATCCGGAGAAGATTCTAGCTCCAT
UGT 84A1 Prom fw	TTTAAGCTTGTGAACGCATTAATGTAG
UGT 84A1 Prom rev	TTTCCCGGCATGAATTGGGTTTGGAGATGG
UGT 84A3 Prom fw	TTTAAGCTTGAGTGATCTTCCAAGATTTCG
UGT 84A3 Prom rev	TTTGGATCCGCATCACATGAGTATGACGAG

UGT 84A4 Prom fw	TTTAAGCTTCAGTGGAGACATCATC
UGT 84A4 Prom rev	TTTGGATCCCATGAGGTAACGACGATTC
UGT 84A2 ÜE fw	AAACCATGGATGGAGCTAGAATCTTCTCC
UGT 84A2 ÜE rev	TTTGCGGCCGCAAAGCTTTTGATTGATCCAG
UGT 84A1 ÜE fw	AAAGGATCCATGGTGTTCGAAACTTGTCC
UGT 84A1 ÜE rev	AAAGCGGCCGCGTATCCATTATCTTTAGTCTTCG
UGT 84A3 ÜE fw	AAAGGATCCATGGACCCGTCTCGTCATACTC
UGT 84A3 ÜE rev	AAAGCGGCCGCGTGTTCCTCCGTTGTCTTC
UGT 84A4 ÜE fw	AAAGGATCCATGGAGATGGAATCGTCGTTACC
UGT 84A4 ÜE rev	AAAGCGGCCGCCACGACATTATTAATG
UGT 84A2 110 Nhe I sense fw	AATTGCTAGCAACTTAACCATCCTCCGACCACATC
UGT 84A2 110 BamHI sense rev	AATTGGATCCCCCAAGAGACGAAAGGGTTGTTG
UGT 84A1 110 NheI sense fw	AATTGCTAGCGAAGAATGGGCAGAGGATGATGACC
UGT 84A1 110 BamHI sense rev	AATTGGATCCCGCTTCCTCGTATCTTCTCACAAGC
UGT 84A3 110 NheI sense fw	AATTGCTAGCATCCGGTTTGAGTTCTTCTCTGAC
UGT 84A3 110 BamHI sense rev	AATTGGATCCGTTATATCTCTTAACGAGATTCTTG
UGT 84A4 110 NheI sense fw	AATTGCTAGCGATGGATTTGTCTACAAAGAAGACT
UGT 84A4 110 BamHI sense rev	AATTGGATCCTGCTTCTCATATTTCTTGACAAGAT
UGT 84A2 110 NcoI antisense fw	AATTCCATGGA ACTTAACCATCCTCCGACCACATC
UGT 84A2 110 SmaI antisense rev	AATTCCCGGGCCCAAGAGACGAAAGGGTTGTTG
UGT 84A1 110 NcoI antisense fw	AATTCCATGGGAAGAATGGGCAGAGGATGATGACC
UGT 84A1 110 SmaI antisense rev	AATTCCCGGGCGCTTCCTCGTATCTTCTCACAAGC
UGT 84A3 110 NcoI antisense fw	AATTCCATGGATCCGGTTTGAGTTCTTCTCTGAC
UGT 84A3 110 SmaI antisense rev	AATTCCCGGGGTTATATCTCTTAACGAGATTCTTG
UGT 84A4 110 NcoI antisense fw	AATTCCATGGGATGGATTTGTCTACAAAGAAGACT
UGT 84A4 110 SmaI antisense rev	AATTCCCGGGTGCTTCTCATATTTCTTGACAAGAT
Ubiquitin fw	AGG CCA AGA TCC AGG ACA AAG
Ubiquitin rev	CGA GCC AAA GCC ATC AAA GAC
18S rRNA fw	ATCAGCTCGCGTTGACTACGTC
18S rRNA rev	CCGGATCATTCAATCGGTAGG

MS- und MS/MS-Daten der identifizierten Verbindungen aus Samen

Feruloylcholin (1, FC). LC/ESI(+)-TOF-MS, $t_r = 19.7$ min, DP1 = 50 V, m/z (rel. int. (%)) = 280.156 (86) (calc. for $C_{15}H_{22}NO_4^+$: 280.1543), 221.081 (100) (calc. for $C_{12}H_{13}O_4^+$: 221.0808). LC/ESI(+)-CID-MS of m/z 280, DP1 = 50 V, CE = 15 eV, m/z (rel. int. (%)) = 280.152 (100) (calc. for $C_{15}H_{22}NO_4^+$: 280.1543), 221.079 (86) (calc. for $C_{12}H_{13}O_4^+$: 221.0808); CE = 40 eV, m/z (rel. int. (%)) = 221.080 (31), 206.056 (13) (calc. for $C_{11}H_{10}O_4^+$: 206.0574), 177.051 (58) (calc. for $C_{10}H_9O_3^+$: 177.0546), 149.057 (9) (calc. for $C_9H_9O_2^+$: 149.0597), 145.025 (100) (calc. for $C_9H_5O_2^+$: 145.0284), 134.033 (9) (calc. for $C_8H_6O_2^+$: 134.0362), 117.034 (30) (calc. for $C_8H_5O^+$: 117.0335).

5-Hydroxyferuloylcholin (2, 5-OH-FC). LC/ESI(+)-TOF-MS, $t_r = 21.5$ min, DP1 = 50 V, m/z (rel. int. (%)) = 296.151 (98) (calc. for $C_{15}H_{22}NO_4^+$: 296.1493), 237.078 (100) (calc. for $C_{12}H_{13}O_5^+$: 237.0758). LC/ESI(+)-CID-MS of m/z 296, DP1 = 50 V, CE = 15 eV, m/z (rel. int. (%)) = 296.150 (100) (calc. for $C_{15}H_{22}NO_5^+$: 296.1493), 237.078 (59) (calc. for $C_{12}H_{13}O_5^+$: 237.0758); CE = 40 eV, m/z (rel. int. (%)) = 237.0774 (38), 193.0524 (49) (calc. for $C_{10}H_9O_4^+$: 193.0495), 161.0268 (77) (calc. for $C_9H_5O_3^+$: 161.0233), 133.0294 (100) (calc. for $C_8H_5O_2^+$: 133.0284); CE = 55 eV, m/z (rel. int. (%)) = 161.0269 (16), 150.0329 (13) (calc. for $C_8H_6O_3^+$: 150.0312), 133.0295 (100), 122.0376 (10) (calc. for $C_7H_6O_2^+$: 122.0362), 105.0351 (29) (calc. for $C_7H_5O^+$: 105.0335).

4-Hexosyloxy-3,5-dimethoxy-cinnamoylcholin (3, SC 4-O-Hexosid). LC/ESI(+)-TOF-MS, $t_r = 17.5$ min, DP1 = 50 V, m/z (rel. int. (%)) = 472.216 (100) (calc. for $C_{22}H_{34}NO_{10}^+$: 472.2177). LC/ESI(+)-CID-MS of m/z 472, DP1 = 50 V, CE = 25 eV, m/z (rel. int. (%)) = 472.213 (40) (calc. for $C_{22}H_{34}NO_{10}^+$: 472.2177), 310.162 (5) (calc. for $C_{16}H_{24}NO_5^+$: 310.1649), 251.090 (100) (calc. for $C_{13}H_{15}O_5^+$: 251.0914); CE = 55 eV, m/z (rel. int. (%)) = 251.089 (100), 207.063 (37) (calc. for $C_{11}H_{11}O_4^+$: 207.0652), 175.036 (53) (calc. for $C_{10}H_7O_3^+$: 175.0390), 147.042 (19) (calc. for $C_9H_7O_2^+$: 147.0441).

Syringoylcholin (4, SyC). LC/ESI(+)-TOF-MS, $t_r = 18.7$ min, DP1 = 50 V, m/z (rel. int. (%)) = 284.152 (77) (calc. for $C_{14}H_{22}NO_5^+$: 284.1493), 225.077 (100) (calc. for $C_{11}H_{13}O_5^+$: 225.0758). LC/ESI(+)-CID-MS of m/z 284, DP1 = 50 V, CE = 15 eV, m/z (rel. int. (%)) = 284.1489 (100) (calc. for $C_{14}H_{22}NO_5^+$: 284.1493), 225.0782 (78) (calc. for $C_{11}H_{13}O_5^+$: 225.0758); CE = 40 eV, m/z (rel. int. (%)) = 225.0760 (20), 181.0513 (100) (calc. for $C_9H_9O_4^+$: 181.0495), 153.0559 (18) (calc. for $C_8H_9O_3^+$: 153.0546), 138.0330 (5) (calc. for $C_7H_6O_3^+$: 138.0312), 110.0357 (3) (calc. for $C_6H_6O_2^+$: 110.0362).

3,5-Dimethoxy-4-hexosyloxybenzoylcholin (5, SyC 4-O-Hexosid). LC/ESI(+)-TOF-MS, $t_r = 10.2$ min, DP1 = 50 V, m/z (rel. int. (%)) = 446.206 (100) (calc. for $C_{20}H_{32}NO_{10}^+$: 446.2021). LC/ESI(+)-CID-MS of m/z 446, DP1 = 50 V, CE = 25 eV, m/z (rel. int. (%)) = 446.200 (35) (calc. for $C_{20}H_{32}NO_{10}^+$: 446.2021), 284.148 (11) (calc. for $C_{14}H_{22}O_5^+$: 284.1493), 225.075 (100) (calc. for $C_{11}H_{13}O_5^+$: 225.0758); CE = 55 eV, m/z (rel. int. (%)) = 181.050 (100) (calc. for $C_9H_9O_4^+$: 181.0495), 153.054 (40) (calc. for $C_8H_9O_3^+$: 153.0546), 138.028 (17) (calc. for $C_7H_6O_3^+$: 138.0312).

3-{4-[2-Hydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1-hydroxymethylethoxy]-3,5-dimethoxyphenyl}acryloylcholin (SC(4-O- β)G, **6**). LC/ESI(+)-TOF-MS, $t_r = 25.4$ min, DP1 = 50 V, m/z (rel. int. (%)) = 506.241 (100) $[M]^+$ (calc. for $C_{26}H_{36}NO_9^+$: 506.2385), 447.167 (2) $[M-C_3H_9N]^+$ (calc. for $C_{23}H_{27}O_9^+$: 447.1650). LC/ESI(+)-CID-MS of m/z 506, DP1 = 50 V, CE = 25 eV, m/z (rel. int. (%)) = 506.233 (61) (calc. for $C_{26}H_{36}NO_9^+$: 506.2385), 447.162 (21) (calc. for $C_{23}H_{27}O_9^+$: 447.1650), 251.087 (100) (calc. for $C_{13}H_{15}O_5^+$: 251.0914), CE = 55 eV, m/z (rel. int. (%)) = 251.089 (100), 207.064 (40) (calc. for $C_{11}H_{11}O_4^+$: 207.0652), 175.036 (56) (calc. for $C_{10}H_7O_3^+$: 175.0390), 147.042 (18) (calc. for $C_9H_7O_2^+$: 147.0441).

3-{4-[2-Hydroxy-2-(4-hexosyloxy-3-methoxyphenyl)-1-hydroxymethylethoxy]-3,5-dimethoxyphenyl}acryloylcholin (**7**, SC(4-O- β)G 4'-O-Hexosid). LC/ESI(+)-TOF-MS, $t_r = 21.6$ min, DP1 = 50 V, m/z (rel. int. (%)) = 668.290 (100) (calc. for $C_{32}H_{46}NO_{14}^+$: 668.2913). LC/ESI(+)-CID-MS of m/z 668, DP1 = 50 V, CE = 25 eV, m/z (rel. int. (%)) = 668.2854 (100) (calc. for $C_{32}H_{46}NO_{14}^+$: 668.2913), 609.2157 (8) (calc. for $C_{29}H_{37}O_{14}^+$: 609.2178), 251.0883 (9) (calc. for $C_{13}H_{15}O_5^+$: 251.0914); CE = 55 eV, m/z (rel. int. (%)) = 251.0893 (100), 207.0649 (7) (calc. for $C_{11}H_{11}O_4^+$: 207.0652), 175.0395 (6) (calc. for $C_{10}H_7O_3^+$: 175.0390), 147.0435 (1) (calc. for $C_9H_7O_2^+$: 147.0441).

N',N'-Bis(sinapoyl)spermidin (**8**). LC/ESI(+)-TOF-MS, $t_r = 27.2$ min, DP1 = 50 V, m/z (rel. int. (%)) = 558.285 (100) $[M+H]^+$ (calc. for $C_{29}H_{40}N_3O_8^+$: 558.2810). LC/ESI(+)-CID-MS of m/z 558, DP1 = 50 V, CE = 40 eV, m/z (rel. int. (%)) = 558.281 (9) (calc. for $C_{29}H_{40}N_3O_8^+$: 558.2810), 352.216 (32) (calc. for $C_{18}H_{30}N_3O_4^+$: 352.2231), 335.200 (7) (calc. for $C_{18}H_{27}N_2O_4^+$: 335.1965), 281.150 (3) (calc. for $C_{18}H_{30}N_3O_4^+$: 281.1496), 278.128 (7) (calc. for $C_{15}H_{20}NO_4^+$: 278.1387), 264.120 (55) (calc. for $C_{14}H_{18}NO_4^+$: 264.1230), 207.065 (100) (calc. for $C_{11}H_{11}O_4^+$: 207.0652), 175.038 (23) (calc. for $C_{10}H_7O_3^+$: 175.0390), 147.0403 (4) (calc. for $C_9H_7O_2^+$: 147.0441).

Dokumentation der Versuchsbedingungen in den UV-B-Stress-Experimenten

Versuch Nr.: V693		Von: 08.07.2005	Bis: 15.07..2005	Datum: 08.07.2005
Bemerkung: UVB-Exposition von <i>Arabidopsis</i> und Raps				
EK 14		8. EK 15		
8.1.1. Akklimatisierung / UVB (8.7. – 11.7.)				
<i>Fensterglas 8mm</i>	Fensterglas 8mm	Fensterglas 8mm	Fensterglas 8mm	
Fensterglas 8mm	Fensterglas 8mm	Fensterglas 8mm	Fensterglas 8mm	
Türe		Türe		
Behandlung ab 12.07.2005				
Fensterglas 8mm	Fensterglas 8mm	Fensterglas 8mm	Fensterglas 8mm	
Tempax/Sanalux	Tempax/Sananlux	Tempax/Sananlux	Tempax/Sananlux	
Türe		Türe		
Lichtkreise (Lichtprogramm: v685.lps)				
8.2. 8.7. – 9.7.: ca. 150 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ EK14+15: 2,4; 63,66; 122 // UV 103-1 – 110,113,114 10.7.: ca. 300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ EK14: 2,4,9,10; 52,53; 63,66,71,76; 121,122 // UV 103-1 – 110,113,114 EK15: 2,4,9,10; 52,53; 63,66,73,75; 121,122 // UV 103-1 – 110,113,114 11.7. – 15.7.: ca. 500 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ EK14: 2,4,5,9,10; 52 – 54; 63,66,69,71,76,77; 121 – 123 // UV 103-1 – 110,113,114 EK15: 2,4,5,9,10; 52 – 54; 63 – 66,73,75,77; 121 – 123 // UV 103-1 – 110,113,114				
Einschaltzeit (MEZ)	Licht 6– 20 /UV 7-19Uhr		Licht 6– 20 /UV 7-19Uhr	
Klima	Max		Min	
Temperatur	24° fest (EK14)		24° fest (EK15)	
Feuchte	70% fest		70% fest	
Plattformdaten: PAR: ($\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$) // UVA: ($\text{W}/\text{m}^2$) // UVB: (MED/h)				
LS "150": 270 // 5,33 // 0,02 LS "300": 580 // 9,11 // 0,03 LS "500": 740 // 10,86 // 0,04		260 // 4,76 // 0,01 530 // 8,53 // 0,01 725 // 10,55 // 0,01		

Versuch Nr.: V695	Von: 24.04.2006	Bis: 03.05..2006	Datum: 21.04.2006
Bemerkung: UVB-Exposition von <i>Arabidopsis</i> und Raps (wie V693)			
EK 14		9. EK 15	
9.1.1. Akklimatisierung (24.04. – 27.04.2006)			
<i>Fensterglas 8mm</i>	Fensterglas 8mm	Fensterglas 8mm	Fensterglas 8mm
Fensterglas 8mm	Fensterglas 8mm	Fensterglas 8mm	Fensterglas 8mm
Türe		Türe	
Behandlung (UVB) ab 28.04.2006 (sechs Tage)			
Fensterglas 8mm	Fensterglas 8mm	Fensterglas 8mm	Fensterglas 8mm
Tempax/Sanalux (8)	Tempax/Sananlux (7)	Tempax/Sananlux (2)	Tempax/Sananlux (1)
Türe		Türe	
Lichtkreise			
9.2. <u>24.4. – 25.4.:</u> ca. 180 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ 2,4; 63,66; 122 // UV 103-1 – 108,113,114			
<u>26.4.:</u> ca. 360 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ 2,4,9,10; 53; 63,66,73; 121,122 // UV 103-1 – 108,113,114			
<u>27.4. – 3.5.:</u> ca. 520 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$ 2,4,5,9,10; 52,53; 63,64,66,73,75,77; 121 – 123 // UV 103-1 – 108,113,114			
Programm (Temp., Feuchte, Licht): V693 (Nr. 24) auf Pos. 0 mit Lichttabelle v685.lps			
Einschaltzeit (MEZ)	Licht 6– 22 /UV 7-21Uhr	Licht 6– 22 /UV 7-21Uhr	
Klima	Max	Min	
Temperatur	24° fest (EK14)	24° fest (EK15)	
Feuchte	70% fest	70% fest	
Plattformdaten: PAR: ($\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$) // UVA: ($\text{W}/\text{m}^2$) // UVB: (MED/h)			
LS "1": 323 // 3,94 // 0,02		304 // 3,68 // 0,01	
LS "3": 637 // 6,17 // 0,02		600 // 6,03 // 0,01	
LS "5": 877 // 7,85 // 0,02		836 // 7,63 // 0,01	

Versuch Nr.: V701		Von: 24.10.2006	Bis: 17.11.2006	Datum: 03.11.2006
Bemerkung: UVB-Exposition von <i>Arabidopsis</i> (u.a. C14) und Raps (wie V693, V695)				
EK 14 (2. Ebene)		10. EK 15 (1. Ebene)		
10.1.1.		Akklimatisierung		
X	X	Fensterglas 8mm	Fensterglas 8mm	
Tempax/Sanalux (8)	Tempax/Sanalux (7)	Tempax/Sanalux (2)	Tempax/Sanalux (3)	
Türe		Türe		
Behandlung (UVB)				
X	X	Fensterglas 8mm	Fensterglas 8mm	
Tempax/Sanalux (8)	Tempax/Sanalux (7)	Tempax/Sanalux (2)	Tempax/Sanalux (3)	
Türe		Türe		
Lichtkreise				
10.2. ca. 520 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$				
10.3. EK14: Schublade in 2. Ebene von oben: 2,4,5,8,9,10,15,17; 51 – 53; 63,64,66,71,72,73,75,77; 121 – 123 // kein UV				
10.4. EK15: Schublade in 1. Ebene von oben: 2,4,5,9,10; 52,53; 63,64,66,73,75,77; 121 – 123 // UV 103-1 – 108,113,114				
Programm (Temp., Feuchte, Licht): V693 (Nr. 24) auf Pos. 0 mit Lichttabelle v685.lps				
Einschaltzeit (MEZ)	Licht 6– 22 /UV 7-21Uhr		Licht 6– 22 /UV 7-21Uhr	
Klima	Max		Min	
Temperatur	24° fest (EK14)		24° fest (EK15)	
Feuchte	70% fest		70% fest	
Plattformdaten: PAR: ($\mu\text{mol}/(\text{m}^2\text{s})$) // UVA: ($\text{W}/\text{m}^2$) // UVB: (MED/h)				
1274 // 0,93 // 0,01		822 // 6,69 // 0,01		

Danksagung

Prof. Dr. D. Strack möchte ich für die Bereitstellung des Themas und des Arbeitsplatzes, sowie für die Finanzierung der Stelle über die gesamte Zeit der Doktorarbeit danken.

Dr. Carsten Milkowski danke ich für die Betreuung der Arbeit, die Korrekturvorschläge und die vielen Diskussionen, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Dr. W. Heller und Dr. A. Albert von der GSF in München danke ich für die Zusammenarbeit und Hilfe bei den UV-Experimenten.

Dr. C. Böttcher danke ich für die Analysen der Arabidopsis-Samen mit Hilfe der LC-MS.

Den Doktoranden Felix Stehle, Heike Paetzold, Kathleen Clauß, Daniela Floß und Juliane Mittasch sowie Dr. Diana Weier danke ich vor allem für die moralische Unterstützung während der Doktorarbeit. Sara Schaarschmidt danke ich für die große Hilfsbereitschaft, die sie immer an den Tag gelegt hat.

Dr. Bettina Hause, Dr. Thomas Vogt und Dr. Thomas Fester danke ich ebenfalls dafür, dass sie stets für Fragen zur Verfügung standen und für jedes wissenschaftliche Problem einen Lösungsvorschlag hatten.

Dr. Alfred Baumert danke ich für die Unterstützung zur Lösung HPLC-relevanter Probleme.

Claudia Horn, Franziska Götsch und Sylvia Vetter danke ich für die Unterstützung im Labor und für die Verbreitung guter Laune im Laboralltag.

Allen anderen Mitarbeitern der Abteilung Sekundärstoffwechsel, sowie des gesamten Instituts für Pflanzenbiochemie möchte ich meinen Dank für eine unvergessene Zeit in Halle aussprechen.

Zum Schluß gilt der Dank natürlich meiner gesamten Familie und meiner Frau Michaela, mit der ich älter werden will bis zum Ende aller Tage. Also fast so alt, wie ich nach über 4 Jahren Doktorarbeit aussehen mag.

Publikationen:

Dirk Meißner, Andreas Albert, Christoph Böttcher, Dieter Strack, Carsten Milkowski (2008) The role of UDP-glucose:hydroxycinnamate glucosyltransferases in phenylpropanoid metabolism and the response to UV-B radiation in *Arabidopsis thaliana*, **Planta 2008.**

Jens Tiedemann, Gudrun Mönke, Twan Rutten, Hardy Rolletschek, Dirk Meißner, Carsten Milkowski, Hans-Peter Mock, Maarten Koornneef and Helmut Bäumlein (2007) Dissection of a complex seed phenotype: New insights in FUSCA3 regulated processes, **Developmental Biology.**

Vorträge:

Meißner Dirk The role of Hydroxycinnamate Glucosyltransferases (HCA-GTs) under UV-B stress in *Arabidopsis thaliana*. Second IPK Student Conference, 30.5.2006, Gatersleben.

Meißner Dirk The role of the Hydroxycinnamate Glucosyltransferase UGT 84A2 in *Arabidopsis thaliana*. Third Plant Science Student Conference, 08.06.07, IPB Halle.

Poster:

Juliane Mittasch, Dirk Meißner, Alfred Baumert, Dieter Strack, Carsten Milkowski Ester-forming glucosyltransferases in phenylpropanoid metabolism of *Brassicaceae*. Botanikertagung 05.-10.09 2004, Braunschweig.

Dirk Meißner, Carsten Milkowski, Dieter Strack The role of Hydroxycinnamate Glucosyltransferases (HCA-GTs) in *Arabidopsis thaliana*. First International Symposium on Secondary Metabolism in Plant Seeds 21.-24.02 2007, Potsdam.

Lebenslauf

Dirk Jens Meißner
Schillerstr. 7
06114 Halle Saale

Diplom-Biologe

geboren am 30.08. 1976 in Reutlingen

Eltern: Dieter Meißner und Erika Meißner, geb. Thiessen

1983-1987	Achalmschule in Eningen
1987-1996	Friedrich-List-Gymnasium in Reutlingen
01.06. 1996	Abitur
01.09. 1996-30.06. 1997	Grundwehrdienst bei den Gebirgsjägern in Bad Reichenhall
15.10. 1997	Immatrikulation an der Universität Kassel Studiengang Biologie/Diplom
31.03.-10.04. 1999	Exkursion nach Elba, Tauchkurs mit dem Thema „Invertebraten des Mittelmeeres“
01.10..10.10. 1999	Vordiplomprüfungen in den Fächern Botanik, Zoologie, Genetik/Mikrobiologie, Chemie, Physik
01.08.-10.10. 2000	Praktikum bei der Schutzstation Wattenmeer auf Amrum
15.04.-30.06. 2001	Betreuung von Studenten des Großpraktikums Pflanzenphysiologie als studentische Hilfskraft an der Universität Kassel
27.11.-17.12. 2001	mündliche Diplomprüfungen in den Fächern Ökologie, Botanik, Biochemie, Organische Chemie

-
- 02.04.-17.04. 2002 Exkursion auf die Insel La Réunion mit dem Thema
„Tropenökologie, Vegetation und Geologie der
Mascareninsel La Réunion“
- 15.01.-30.09. 2002 Diplomarbeit an dem Lehrstuhl für Ökologie der Universität
Kassel bei Prof. Dr. Ewald Langer über das Thema
„Mykorrhiza der Familie Orchidaceae - Reinisolation und
DNA-Sequenzierung der assoziierten Pilze aus
Orchideenwurzeln“
- 30.9. 2002 Diplom in Biologie an der Universität Kassel
- 24.10.2002 -31.01.2003 Auslandsaufenthalt in Australien
- 01.02. 2003-31.12.2007 Promotionsstelle am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie in
Halle Saale in der Abteilung Sekundärstoffwechsel von Prof.
Dr. Strack.
- 01.01.2008 Leiter Abteilung Molekularbiologie in der Laborarztpraxis Dr.
Samady / Dr. Groß / Dr. Grüter in Hameln

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe, die Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle, den 19.12.2007