



universität
wien

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

“Genexpressionsprofil der Flavonoidbiosynthese
in der Kamille, *Matricaria chamomilla* (Asteraceae)“

verfasst von / submitted by

Lisa Marie Saphir, BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of

Magistra pharmaciae (Mag.pharm.)

Wien, 2022 / Vienna 2022

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

UA 066 605

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Masterstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Ao. Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr. nat. techn. Johannes Novak

Abstract

Die echte Kamille (*Matricaria chamomilla* L., *Asteraceae*) findet als Heilpflanze der Pharmazie schon seit Jahrhunderten ihre Verwendung. Die Pflanze bietet ein umfangreiches Wirkungsspektrum, welches nicht zuletzt zu einem Gutteil den Flavonoiden zugeschrieben werden kann. Allen voran die Flavone Apigenin und Luteolin, aber auch Flavonole wie Quercetin ermöglichen der Kamille entzündungshemmend, heilend und krampflösend zu wirken.

Die Produktion dieser Flavonoide in der Pflanze ist weitgehend untersucht und die beteiligten Enzyme der Wissenschaft bereits bekannt. Außerdem ist die Kenntnis der Flavonoidmenge und Art verschiedener Pflanzenorgane schon seit längerem Teil der Literatur. Diese Arbeit ermöglicht es, die Synthese der Flavonoide, mittels Genexpressionsanalyse der wichtigsten Enzyme, zu untersuchen, um die Ergebnisse in weiterer Folge mit den tatsächlich enthaltenen Flavonoiden in Korrelation zu bringen.

Für diese Masterarbeit wurden Proben von zwei verschiedenen Individuen (Bona 11/18 und Degumilla 8) in drei verschiedenen Reifestadien der Blüte (jung, mittel, alt) genommen. Dieses Vorgehen beantwortet Fragen nach Individuenunterschieden und mögliche Flavonoidabweichungen, in Abhängigkeit zur Blütenreife. Für die Genexpressionsanalyse der zehn unterschiedlichen, für die Flavonoidsynthese wichtigen, Gene wurde die Methodik der qPCR Analytik verwendet. Die Untersuchung der Proben auf die enthaltenen Pflanzenstoffe erfolgte mithilfe der HPLC-Technik.

Die Durchführung der Untersuchung an zwei verschiedenen Individuen bestätigt erhebliche Sortendiversität, sowohl in Bezug auf die Genexpression der Enzyme, als auch auf das Inhaltsstoffmuster der Flavonoide. Apigenin wird als mengenmäßig wichtigstes Flavon eindeutig identifiziert und dieses mit der Expression der beteiligten Enzyme für die Synthese in Korrelation gebracht. Es wird ein definitiver Abfall der Enzymexpression mit zunehmender Reifung der Blüte beobachtet. Weiters wurden drei Glykosyltransferasen auf mögliche Zusammenhänge mit Flavonoidglycosylierung untersucht. Die Ergebnisse bestätigten den Zusammenhang der Expression dieser Enzyme mit den Flavonoidmustern. Der genaue Zusammenhang muss aber in weitergehenden Untersuchungen noch festgestellt werden. Die beiden Transkriptionsfaktoren MYB und WD40 sind bekanntermaßen für die Expression einiger Flavonoidgene verantwortlich. Hier konnten die Ergebnisse allerdings keinen überzeugenden Hinweis darauf liefern.

Weiterführende Forschung mit anderen Individuen oder weiteren Pflanzen aus der Familie der *Asteraceae* wären sinnvoll. Außerdem bietet diese Arbeit die Möglichkeit weiterführender Investigation der beteiligten Enzyme, mithilfe von Enzymtests oder weiterer Analysen der gefunden Flavonoide über Massenspektrometrie (MS).

Abstract (English)

The true chamomile (*Matricaria chamomilla* L., Asteraceae) has been used as a medicinal plant in pharmacy for centuries. The plant offers an extensive spectrum of effects, which can be attributed in no small part to the flavonoids. First and foremost the flavones apigenin and luteolin, but also flavonols such as quercetin enable chamomile to have an anti-inflammatory, healing and antispasmodic effect.

The production of these flavonoids in the plant has been widely studied and the enzymes involved are already known to science. In addition, knowledge of the flavonoid amount and type of different plant organisms has been part of the literature for some time. This work makes it possible to investigate the synthesis of flavonoids by means of gene expression analysis of the most important enzymes, in order to subsequently reconcile the results with the flavonoids actually contained.

For this master thesis, samples were taken from two different individuals (Bona 11/18 and Degumilla 8) at three different stages of flower maturity (young, medium, old). This approach answers questions about individual differences and possible flavonoid deviations depending on flower maturity. For the gene expression analysis of the ten different genes important for flavonoid synthesis, the methodology of qPCR analysis was used. The samples were analysed for the plant substances they contained using the HPLC technique.

The analysis of two different individuals confirmed considerable varietal diversity, both with regard to the gene expression of the enzymes and the content pattern of the flavonoids. Apigenin is clearly identified as the most important flavone in terms of quantity and this is correlated with the expression of the enzymes involved for synthesis. A definite decrease in the enzyme expression is observed as the flower matures. For glycosilation of flavonoids, three candidate glycosyltransferases were analyzed. From their expression pattern it is indeed very likely that they are responsible for flavonoid glycosilations. However, further research is needed here. The transcription factors MYB and WD40 are said to contribute to flavonoid gene expression. However, here the correlation in expression to flavonoid genes is not so convincing.

Further research with other individuals or other plants from the Asteraceae family would be useful. In addition, this work offers the possibility of further investigation of the enzymes involved, with the help of enzyme tests or further analyses of the flavonoids found via mass spectrometry (MS).

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	6
1.1 Die echte Kamille	6
1.1.1 Aussehen	6
1.1.2 Inhaltsstoffe	6
1.1.3 Wirkung und Anwendung.....	7
1.2 Flavonoide.....	7
1.2.1 Struktur der Flavonoide.....	7
1.2.2 Pharmakologie der Flavonoide.....	9
1.2.3 Flavonoide in der Kamille	10
1.3 Flavonoidsynthese in Pflanzen.....	11
1.4 Fragestellung	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Die Kamillenpflanzen.....	14
2.2 Probennahme.....	14
2.3 RNA.....	15
2.3.1 RNA-Extraktion.....	16
2.3.2 Qualitätskontrolle und Bestimmung der RNA-Konzentration	16
2.3.3 Qualitätskontrolle am Agarosegel.....	17
2.4 cDNA-Synthese.....	17
2.4.1 DNA-Verdau	17
2.4.2 cDNA-Synthese.....	18
2.5 Ausgewählte Gene und Primersequenzen	18
2.6 Quantitative PCR (qPCR)	19
2.6.1 Generelles qPCR-Protokoll.....	19
2.6.2 qPCR-Effizienzbestimmung.....	20
2.6.3 Auswertung der Genexpression.....	21
2.7 HPLC (High Performance Liquid Chromatography).....	21
2.7.1 Flavonoidextraktion	22
2.7.2 Protokoll HPLC.....	22

3 Ergebnisse	23
3.1 Qualität und Konzentration der RNA	23
3.2 Genexpression der Enzyme	25
3.2.1 Enzym 1 Chalconsynthase	25
3.2.2 Enzym 2 Chalconisomerase	26
3.2.3 Enzym 3 Flavanon-3-hydroxylase	27
3.2.4 Enzym 4 Flavonolsynthase	28
3.2.5 Enzym 5 Flavonsynthase	29
3.2.6 Glycosyltransferasen 1 bis 3	30
3.2.7 Transkriptionsfaktoren MYB und WD40	32
3.2.8 Ergebnisdarstellung in PCA-Biplots	33
3.3 Flavonoidzusammensetzung	36
3.3.1 Gruppierung der Flavonoide	36
3.3.2 Gesamtflavonoidgehalt	36
3.3.3 Flavongehalt	37
3.3.4 Gehalt an Apigenin und Apigeninglykosiden	38
3.3.5 Gehalt an Luteolin und Luteolinglykoside	39
3.3.6 Flavonoide mit einem UV-Maximum bei 328nm	40
3.3.7 Andere Flavonoide	41
3.3.8 PCA-Biplot HPLC Ergebnisse	42
3.4 Korrelation der Ergebnisse	43
3.4.1 Korrelationen der Röhrenblüten	44
3.4.2 Korrelation der Zungenblüten	45
4 Diskussion	46
5 Anhang	50
5.1 cDNA-Synthese Protokoll	50
5.2 Ausgewählte Beispiele grafische Darstellung Genexpressionsanalyse	52
5.3 Ergebnisse qPCR Effizienzbestimmungen	57
6 Literaturverzeichnis	79
7 Abbildungsverzeichnis	82

u.a. Apigenin und dessen Derivate, Luteolin, Rutin, Quercetin oder Hyperosid um nur einige wenige Beispiele zu nennen. In dieser Arbeit wird der Schwerpunkt auf den Apigeningehalt (vorwiegend in Zungenblüten) gelegt.¹

Weitere wichtige Inhaltsstoffe der Arzneipflanze bilden Phenolcarbonsäuren, wie die Methoxycimtsäure in mehreren Derivaten, die Kaffeesäure oder Chlorogensäure. Außerdem enthalten sind Sesquiterpenlactone (Guajanolide) wie Matricin oder Matricarin und auch Schleimstoffe.¹

1.1.3 Wirkung und Anwendung

Die Wirksamkeit von Kamillenblüten-Extrakten wurde in mehreren kontrollierten klinischen Studien bereits belegt. Wie bei den meisten pflanzlichen Extrakten beruht diese auf dem Zusammenspiel der verschiedenen enthaltenen Komponenten.¹

Eine antiphlogistische Wirkung konnte in vitro an der Hemmung der Lipxygenase bzw. der Cyclooxygenase und in vivo an Versuchen mit Nagern nachgewiesen werden. Durch diese entzündungshemmenden Eigenschaften findet die Kamille innerlich ihren Einsatz bei gastrointestinalen Beschwerden wie Blähungen, Gastritis oder Krämpfen. Äußerliche Indikationen sind Entzündungen im Mund- und Rachenbereich, im Anal- und Genitalbereich, bei Sonnenbrand, Geschwüren oder oberflächlichen Wunden. Der Pflanze wird ein beruhigender, verdauungs- und wundheilungsfördernder und krampflösender Effekt zugeschrieben.¹

Zu den häufigsten Darreichungsformen zählen Teeaufgüsse, Destillate oder Extrakte aus den Kamillenblüten. Phytopharmaka sind als Monopräparate oder in Kombination mit anderen Drogen am Markt erhältlich. Als Beispiele sind Kamillosan in verschiedenen Darreichungsformen, Iberogast, Kamillan, euceta Gel, u.v.m zu nennen.¹

1.2 Flavonoide

Flavonoide sind eine in Pflanzen vorkommende Stoffgruppe, welche sich vom 2-Phenylchroman ableitet. Den Grundkörper bildet Flavan, ein C15-Gerüst. Der Name stammt aus dem lateinischen „flavus“ (=gelb) ab, welcher die Aufgabe vieler Stoffe dieser Gruppe in den Pflanzen andeutet, nämlich die Färbung der Blüten und Früchte.⁵

1.2.1 Struktur der Flavonoide

Flavonoide sind also Derivate des 2-Phenylchromans (Abb. 4). Sie bestehen in der Regel aus drei Ringen, wobei Ring A und Ring B aromatisch sind und unterschiedliche Substitutionsmuster vorweisen können. Ring C kann außerdem in unterschiedlichen Oxidationszuständen vorliegen. Flavonoide können ferner nicht nur frei, sondern auch in Verbindung mit Zuckern bestehen, wobei hier die Art der Verknüpfung eine wesentliche Rolle spielt. Anhand dieser genannten Unterscheidungskriterien kann eine Einteilung erfolgen (Abb.5 bis Abb. 10).⁵

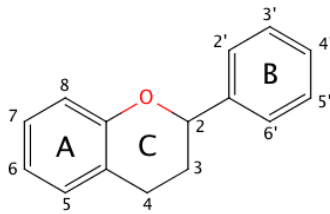


Abb. 4 Grundkörper Flavan⁶

Unterschiedliche Oxidationsstufen (Ring C)

Flavanon	Abb. 5 Flavanon⁷	Flavanonol	Abb. 6 Flavanonol⁸
Flavon	Abb. 7 Flavon⁹	Flavonol	Abb. 8 Flavonol¹⁰

Es können noch zahlreiche weitere Flavonoidderivate, wie Isoflavonoide, Anthocyanidine etc. unterschieden werden, die im Rahmen dieser Arbeit keine Rolle spielen und daher nicht weiter erörtert werden.

Unterschiedliche Substituenten (Ring A, B)

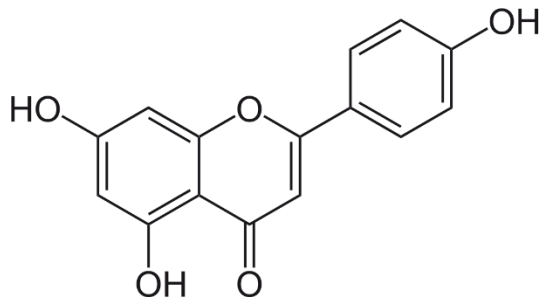


Abb. 9 Flavon Apigenin¹¹

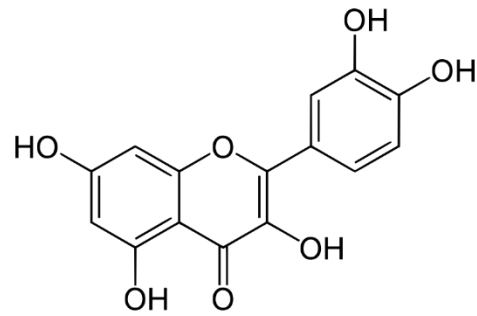


Abb. 10 Flavonol Quercetin¹²

Mögliche Glykosylierungen

Die Verzuckerung der Flavonoide differenziert eine O-glykosidische Verknüpfung (am Sauerstoff verbunden) vorrangig an den Positionen 3, 7, 4' (Abb. 11) und eine C-glykosidische (am Kohlenstoff verknüpft; auch Glykosyle genannt) weitgehend an den Positionen 6 und 8 (Abb. 12).⁵

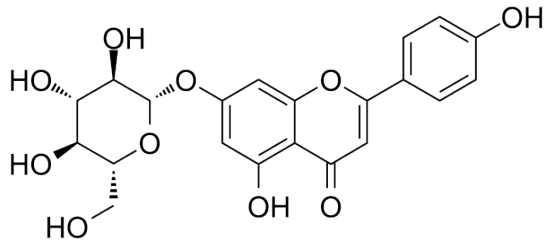


Abb. 11 Apigenin-7-Glucosid¹³

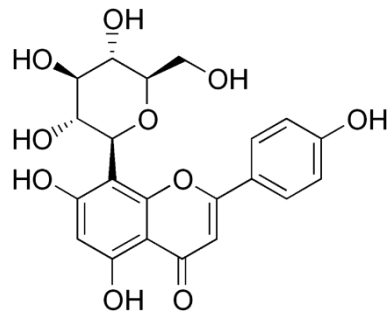


Abb. 12 Glycosyl Vitexin¹⁴

1.2.2 Pharmakologie der Flavonoide

Die Wirkung der Flavonoide auf den Körper wurde pharmakologisch bereits umfassend untersucht und deren positive Wirkung mehrfach bestätigt. Diese Stoffgruppe trumpft mit seinen zahlreichen Einsatzgebieten in der Medizin auf. Aus pharmakokinetischer Sicht betrachtet, werden Flavonoide nur in recht geringem Ausmaß absorbiert und werden folgedessen nur zu einem Bruchteil im Körper wirksam. Vor allem die an Zucker gebundenen Verbindungen können vom Körper nur schwer aufgenommen werden, während die vom Zucker abgespaltenen Aglyka eine bessere Resorption erfahren. Es konnten unter anderem eine antiatherosklerotische, spasmolytische, entzündungshemmende und durchblutungsfördernde Wirkung festgestellt werden. Die genauen Wirkmechanismen sind zum Teil noch nicht ganz geklärt, die bereits erworbenen Erkenntnisse lassen aber hauptsächlich auf mediatorenhemmende Eigenschaften schließen.¹⁵

Die Produktion von entzündungsfördernden Mediatoren, wie TNF- α oder Interleukine, wird durch Flavonoide über mehrere Angriffswege gehemmt. Daraus ergibt sich dann unter anderem ein antithrombotischer Effekt, welcher die Durchblutung und die Herzgesundheit fördert. Den Flavonoiden wird außerdem die Modulation der NO-Produktion und die damit verbundene Relaxation der glatten Muskulatur zugesprochen, was wiederum die vasoprotektive Wirkung unterstreicht.¹⁵

1.2.3 Flavonoide in der Kamille

Das in der Kamille am häufigsten vorkommende Flavonoid ist das Flavon Apigenin und dessen Glucoside, vor allem Apigenin-7-glucosid. Folglich spielt die enthaltene Menge dieser Metaboliten eine wichtige Rolle bei der Qualität der Droge. Das Arzneibuch sieht eine Mindestmenge von 0,25% Apigenin-7-glucosid, bezogen auf die getrocknete Gesamtdroge vor.² Vorhanden sind außerdem das Flavon Luteolin und das Flavonol Quercetin, auf welche im Zuge dieser Arbeit auch eingegangen wird. Weitere, durch HPLC- Chromatographie charakterisierte, phenolische Inhaltsstoffe können der folgenden Abbildung (Abb. 13) entnommen werden.¹⁶

Substance	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	MW	Source ref.
Apigenin	H	OH	H	OH	OH	H	270	[4, 9, 10]
Apigenin-7-O- β -glucoside	H	OH	H	O-glu	OH	H	432	[4, 10]
Apigenin-7-O-apiosyl-glucoside	H	OH	H	O-glu-apio	OH	H	564	[4]
Apigenin-7-O-glucosyl-6''-acetate	H	OH	H	O-glu-6''-ac	OH	H	474	[5, 6, 9]
Apigenin-7-O-glucosyl-2''-acetate	H	OH	H	O-glu-2''-ac	OH	H	474	[5, 6]
Apigenin-7-O-glucosyl-2'',3''-diacetate	H	OH	H	O-glu-2'',3''-diac	OH	H	516	[8, 11]
Apigenin-7-O-glucosyl-3'',4''-diacetate	H	OH	H	O-glu-3'',4''-diac	OH	H	516	[8, 11]
Luteolin	H	OH	H	OH	OH	OH	286	[4, 10]
Luteolin-7-O- β -glucoside	H	OH	H	Oglu	OH	OH	448	[4]
Luteolin-4'-O- β -glucoside	H	OH	H	OH	Oglu	OH	448	[4]
Luteolin-7-O- β -rutoside	H	OH	H	O-rut	OH	OH	594	[4]
6-Hydroxy-luteolin-7-glucoside	H	OH	OH	O-glu	OH	OH	464	[4]
Quercetin	OH	OH	H	OH	OH	OH	302	[4]
Quercetin-7-O- β -glucoside	OH	OH	H	O-glu	OH	OH	464	[4]
Quercetin-3-O- β -rutoside	O-rut	OH	H	OH	OH	OH	610	[4]
Quercetin-3-O- β -galactoside	O-gal	OH	H	OH	OH	OH	464	[4]
Patuletin	OH	OH	OCH ₃	OH	OH	OH	332	[4]
Patuletin-7-O- β -glucoside	OH	OH	OCH ₃	O-glu	OH	OH	494	[4]
Isorhamnetin	OH	OH	H	OH	OH	OCH ₃	316	[4]
Isorhamnetin-7-O- β -glucoside	OH	OH	H	O-glu	OH	OCH ₃	478	[4]
Chrysoeriol-7-O- β -glucoside	H	OH	H	O-glu	OH	OCH ₃	462	[4]
Jaceidin	OCH ₃	OH	OCH ₃	OH	OH	OCH ₃	360	[7]
Chrysosplenol	OCH ₃	OH	OCH ₃	OCH ₃	OH	OH	360	[7]
Eupatoletin	OH	OH	OCH ₃	OCH ₃	OH	OH	360	[7]
Spinacetin	OH	OH	OCH ₃	OH	OH	OCH ₃	346	[7]
Axillarin	OCH ₃	OH	OCH ₃	OH	OH	OH	346	[7]
Eupalitin	OH	OH	OCH ₃	OCH ₃	OH	H	330	[7]
Chrysosplenetin	OCH ₃	OH	OCH ₃	OCH ₃	OH	OCH ₃	374	[7,10]
Astragalin	O-glu	OH	H	OH	OH	OH	286	[10]

Abb. 13 Phenolische Inhaltsstoffe von Kamillenblüten¹⁶

Welchem Organ die Produktion der jeweiligen Flavonoide zugesprochen werden kann, ist schon mehrfach untersucht und belegt worden. Das Flavon Apigenin bildet das erste nachgewiesene Flavonoid in der Kamille und wurde 1914 erstmalig isoliert. In den weißen Zungenblüten wurden Apigenin und seine Glykoside, Luteolin und dessen Glykoside und noch weitere lipophile Flavone gefunden. Für die Röhrenblüten ergibt sich ein differentes Bild: Diese enthalten außerdem Patuletin und Quercetin, im Gegensatz zu den Zungenblüten aber so gut wie kein Apigenin. Luteolin konnte, als eines der wenigen Flavonoide, in allen Pflanzenteilen nachgewiesen werden.¹⁷

Sowohl in der Literatur, als auch bei den Ergebnissen später, ist zu sehen, dass es sehr große Unterschiede im Inhaltsstoffmuster zwischen verschiedenen Individuen der Kamillenpflanze gibt. So ist es beispielsweise möglich, dass eine ägyptische Sorte wesentlich mehr Quercetin enthält, als andere. Ein anderer Faktor, der eine entscheidende Rolle in der Menge der enthaltenen Flavonoide spielt ist, die Ernte und die Art der weiteren Verarbeitung des Pflanzenmaterials. So konnte festgestellt werden, dass wildwachsende Kamille sich in ihrem Inhaltsstoffmuster signifikant unterscheidet von Proben aus dem Glashaus. Unterschiede ergeben sich außerdem, abhängig vom verwendeten Ausgangsmaterial, also ob dieses trocken, gefroren oder frisch ist. Diese Tatsachen erklären die oft unterschiedlichen Angaben zu Flavonoidinhaltsstoffen der Kamille in der Literatur.¹⁷

1.3 Flavonoidsynthese in Pflanzen

Wie der folgenden Abbildung (Abb. 14 Flavonoidsynthese in Pflanzen¹⁸) entnommen werden kann, verläuft die Biosynthese der Flavonoide in Pflanzen schrittweise ab und wird von verschiedenen Enzymen katalysiert. Aus den Ausgangssubstraten p-Coumaroyl-CoA (Phenylpropanweg) und Malonyl-CoA (Polyketidweg) wird durch das Enzym Chalconsynthase (**CHS**) Naringenin-Chalcon gebildet. Die stereospezifische Ringbildung wird in weiterer Folge durch das Enzym Chalconisomerase (**CHI**) katalysiert.¹⁸

Das nun gebildete Naringenin bildet einen generellen Ausgangspunkt für zahlreiche Flavonoide, wie Flavonole, Anthocyanin, Procyanidine, Flavone oder Isoflavone. Die für diese Masterarbeit wichtigen Biosyntheseschritte bilden auf der einen Seite den Weg in Richtung der Flavone über die Flavonsynthasen (**FNS I + II**) und auf der anderen Seite den Weg zu den Flavonolen. Letzterer Biosyntheseweg erfolgt über Dihydrokaempferol durch die Flavanon-3-hydroxylase (**F3H**) und weiter zu den Flavonolen über die Flavonolsynthase (**FLS**).¹⁸

Auf die Synthese weiterer Metabolite wird in dieser Arbeit nicht eingegangen.

Zahlreiche Flavonoide liegen außerdem in glucosylierter Form vor, wie Apigenin-7-glucosid. Um einen Einblick in die Verzuckerung zu erhalten bzw. Rückschlüsse auf die für diese Vorgänge wichtigen Enzyme zu treffen wurden außerdem drei verschiedene Glycosyltransferasen (**GT1**, **GT2**, **GT3**) hinsichtlich ihrer Expression in der Pflanze untersucht.

Für die Produktion einzelner Enzyme sind Transkriptionsfaktoren wichtig, die für eine Regulation der genetischen Aktivität entscheidend sind. Sie regen die Expression spezifischer Gene an und ermöglichen so ein optimales Zusammenspiel der Enzyme für eine reibungslose Synthese der Flavonoide.¹⁹

Transkriptionsfaktoren sind in allen Zellen vorhanden, sowohl im aktiven, als auch im inaktiven (konstitutiven) Zustand. Normalerweise sind mehrere Transkriptionsfaktoren an einer Aktivierung der Transkription beteiligt.¹⁹ Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Faktoren (**MYB** und **WD40**), welche beide in der Kamille aktiv sind, untersucht, ob und in welchem Ausmaß die Expression die gesamte Flavonoidsynthese kontrolliert.

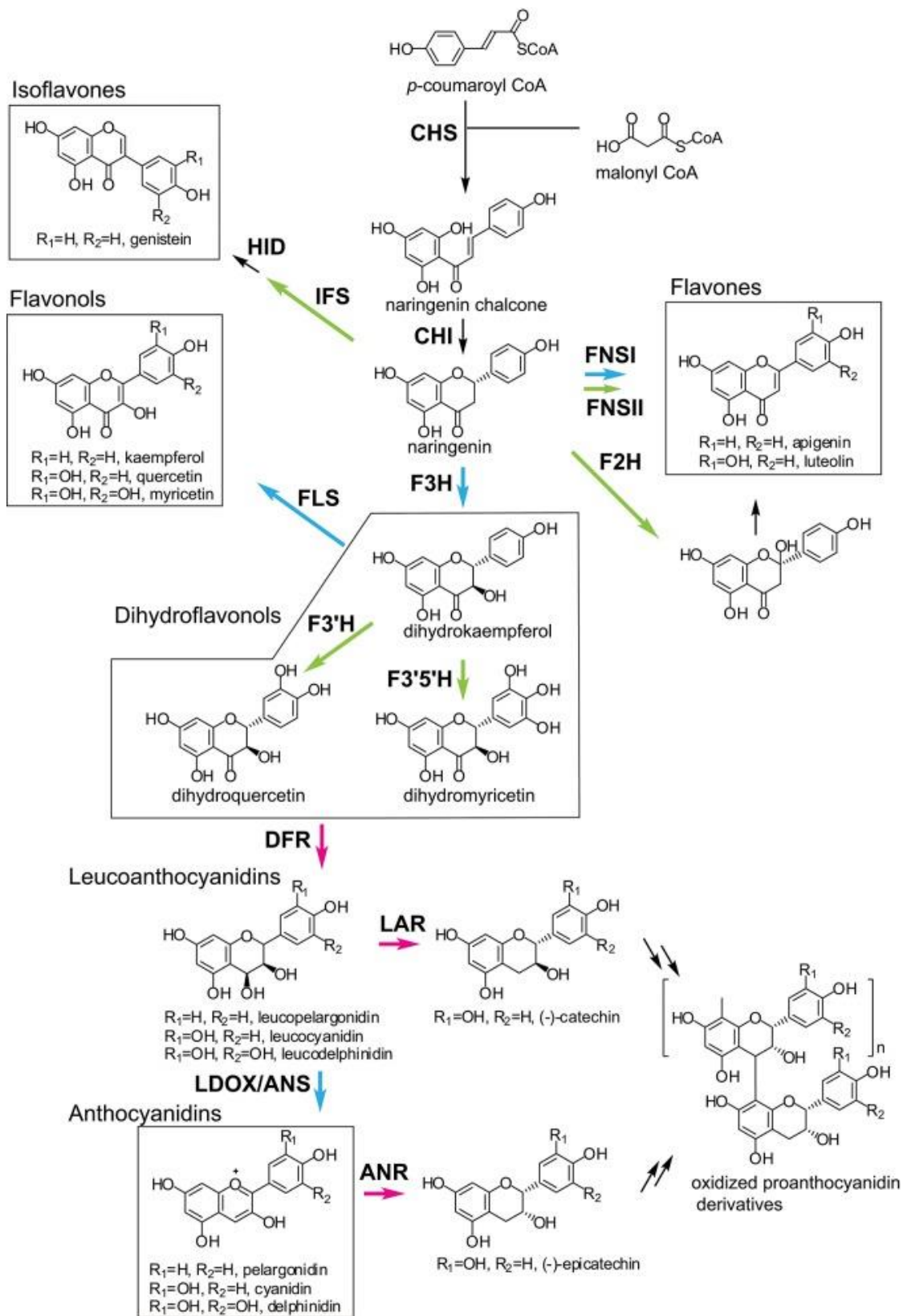


Abb. 14 Flavonoidsynthese in Pflanzen¹⁸

1.4 Fragestellung

Für die folgende Arbeit wurde die Genexpression einiger, für die Flavonoidsynthese in der Kamille, wichtiger Enzyme untersucht. Die Genkandidaten für die einzelnen Enzyme und Transkriptionsfaktoren sind im Vorfeld der Masterarbeit in RNA-Seq Daten der Kamillenblüten identifiziert worden. Auf die Identifizierung wird in dieser Arbeit nicht weiter eingegangen, da sie nicht im Rahmen dieser Masterarbeit durchgeführt wurde.

Es ergibt sich im Folgenden die Fragestellung, wie die Genexpression der Kandidatengene in den verschiedenen Blütenteilen und im jungen Blatt der Kamille abläuft und inwiefern die Genexpressionslevel der Enzyme mit der tatsächlich enthaltenen Menge an Flavonoiden in der Kamillenpflanze korreliert. Für diese Arbeit wurde die echte Kamille in zwei Genotypen untersucht, den Sorten Bona (BO11/18) und Degumill (DEG8). Die Probennahme der Blütenköpfe erfolgte in drei verschiedenen Reifestadien: junge Blütenköpfe (Röhrenblüten noch grün), mittlere Blütenköpfe (einige Reihen an Röhrenblüten bereits aufgeblüht) und alte Blütenköpfe (Röhrenblüten voll entwickelt, teilweise schon verblüht).

Die Blütenkopfprouben wurden ferner in Röhrenblüten und Zungenblüten unterteilt, eine Probe junger Blätter bildete den Referenzwert. Dies resultiert in gesamt 14 Proben, bei welchen einerseits mittels qPCR die Genexpressionslevel zehn verschiedener Enzyme und andererseits mittels HPLC der tatsächliche Gehalt an Flavonoiden bestimmt wurden. Die folgende Arbeit soll die Möglichkeit bieten, Rückschlüsse auf den Flavonoidgehalt in verschiedenen Reifestadien bzw. Blütenteilen zu ziehen und diese im Verhältnis zur Genexpression der einzelnen Enzyme zu betrachten. Es wird außerdem versucht, die Frage nach den für die Genexpression wirklich essentiellen Enzymen zu beantworten und Vermutungen über Kontrolle durch Transkriptionsfaktoren anzustellen.

2 Material und Methoden

2.1 Die Kamillenpflanzen

Das Ausgangsmaterial für diese Genexpressionsstudie bildeten zwei verschiedene Individuen der echten Kamille der Sorten „Degumill“ (DEG8) und „Bona“ (BO11/18), in dieser Arbeit häufig nur mit D beziehungsweise B abgekürzt. Die Pflanzen wurden in einem Klimaschrank Heraeus Vötsch HB0714, unter den in Tabelle 1 angeführten Bedingungen gezogen.

Tab. 1 Wachstumsbedingungen der Kamillepflanzen

Tag	Nacht
16 Stunden	8 Stunden
20°C Temperatur	10°C Temperatur
60% Luftfeuchtigkeit	60% Luftfeuchtigkeit

Sofern erforderlich, wurden die Kamillenpflanzen mit Dünger oder gegen Schädlinge, wie Mehltau oder Läuse, behandelt.

2.2 Probennahme

Für die Versuche wurden von verschiedenen Pflanzenteilen, aus drei unterschiedlichen Reifestadien der Blüte, Proben (Tab. 2) gezogen. (Abb. 15 Blütenköpfe in verschiedenen Reifestadien)

Tab. 2 Proben

Pflanzenteil	Individuum	Entnommene Probenmenge
Junge Blütenköpfe	DEG8	2 Blütenköpfe (ca. 80-100mg)
Mittlere Blütenköpfe	DEG8	2 Blütenköpfe (ca. 80-100mg)
Alte Blütenköpfe	DEG8	2 Blütenköpfe (ca. 80-100mg)
Junge Zungenblüten	DEG8	Von 5-6 Blütenköpfen (ca. 15-20mg)
Mittlere Zungenblüten	DEG8	Von 5-6 Blütenköpfen (ca. 15-20mg)
Alte Zungenblüten	DEG8	Von 5-6 Blütenköpfen (ca. 15-20mg)
Blätter	DEG8	2-3 Blätter (ca. 10-15mg)
Junge Blütenköpfe	BO11/18	2 Blütenköpfe (ca. 80-100mg)
Mittlere Blütenköpfe	BO11/18	2 Blütenköpfe (ca. 80-100mg)

Alte Blütenköpfe	BO11/18	2 Blütenköpfe (ca. 80-100mg)
Junge Zungenblüten	BO11/18	Von 5-6 Blütenköpfen (ca. 15-20mg)
Mittlere Zungenblüten	BO11/18	Von 5-6 Blütenköpfen (ca. 15-20mg)
Alte Zungenblüten	BO11/18	Von 5-6 Blütenköpfen (ca. 15-20mg)
Blätter	BO11/18	2-3 Blätter (ca. 10-15mg)



Abb. 15 Blütenköpfe in verschiedenen Reifestadien
(links: junges Reifestadium, mittig: mittleres Reifestadium, rechts: altes Reifestadium)

Für diese Arbeit ergibt sich somit ein Probenumfang von 14 Proben. Diese wurden unter geschützten Bedingungen entnommen und verarbeitet, um den Kontakt mit RNAsen möglichst gut zu unterbinden. Die Blütenköpfe wurden von den Zungenblüten und dem grünen Blütenboden befreit. Bei den Blättern wurde darauf geachtet, dass diese jung und frisch sind beziehungsweise in der Nähe eines Blütenkopfes gewachsen sind.

Unmittelbar nach der Probennahme wurden die Pflanzenteile in zuvor vorbereitete sterile 2ml Eppis überführt, in welchen sich jeweils 2 Metallkügelchen befanden. Ein sofortiges Eintauchen in flüssigen Stickstoff stellte den Erhalt des zu extrahierenden RNA-Materials sicher.

Anschließend wurden die Proberöhrchen, mithilfe von bereits vorgekühlten Adaptern, in die Retschmühle gebracht. Die Vermahlung des Pflanzenmaterials fand bei 30Hz statt und dauerte eine Minute.

2.3 RNA

Die Ribonukleinsäure (RNA) spielt eine wichtige Rolle bei der Transkription und der Translation, beides wichtige Vorgänge bei der Synthese von Proteinen. Die RNA ist im Gegensatz zur DNA einsträngig und unterscheidet sich zudem in der Zusammensetzung der Nucleotide und der angehängten Zucker.²⁰ Ribonukleinsäuren können je nach ihrer biologischen Aufgabe in fünf Klassen unterteilt werden: ribosomale RNAs (rRNA), Boten-RNAs (mRNA), Transfer-RNAs (tRNA), kleine nucleäre RNAs (snRNAs) und kleine interferierende RNAs (siRNA). Für diese Arbeit wurde die gesamte RNA extrahiert, wobei die rRNA mit 90-95% den Hauptbestandteil der vorhandenen RNA in der Zelle bildet.²¹

Das Arbeiten mit RNA erfordert besondere Vorsichtsmaßnahmen, da diese im Vergleich zu DNA sehr anfällig gegenüber spontaner und durch RNAsen enzymatisch katalysierter Hydrolyse ist. Diese RNAsen kommen ubiquitär in der Zelle vor und sind sehr widerstandsfähig gegenüber Hitze. Diese besonderen Vorkehrungen liegen vor allem im kontaminationsfreien Arbeiten mit einem gesonderten Satz an Geräten oder Chemikalien im Umgang mit dem Genmaterial.²¹

2.3.1 RNA-Extraktion

Die Zugabe von RNase Inhibitoren wie DEPC (Diethylpyrocarbonat) garantiert eine RNase freie Herstellung der Lösungen. Die Extraktionen der RNA aus den frisch vermahlenden Proben wurden mit dem RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) durchgeführt:

1. Pro Tube wurden 450µl Puffer RLT und 5µl beta-Mercaptoethanol dazu pipettiert - gut mischen (Vortex).
2. Das Lysat wurde auf ein „Lilac“-Säulchen übertragen.
3. Die Zentrifugation erfolgte bei 15000 rpm für 2 Minuten.
4. Der Überstand wurde vorsichtig in ein frisches Sammelröhrchen pipettiert, wobei das Pellet im Eppi verblieb.
5. 230µl Ethanol absolut (=0,5 ml des Volumens) wurden dazu gegeben und mittels auf und ab pipettieren vermischt.
6. Die Probe wurde danach auf ein dafür vorgesehenes Säulchen übertragen und bei 10000 rpm für 15 Sekunden erneut zentrifugiert.
7. Die Flüssigkeiten wurden nach jedem Waschschrift aus dem Eppi verworfen (die RNA befand sich auf dem Säulchen).
8. 700µl Puffer RW1 wurde hinzugefügt und dann bei 10000 rpm für 15 Sekunden zentrifugiert.
9. 500µl Puffer RPE wurde hinzugefügt und dann bei 10000 rpm für 15 Sekunden zentrifugiert.
10. 500µl Puffer RPE wurde hinzugefügt und dann bei 10000 rpm für 2 Minuten zentrifugiert.
11. Das Säulchen wurde in ein neues Sammelröhrchen überführt und erneut für 2 Minuten bei 15000 rpm zentrifugiert, um eine vollständige Trocknung der Proben zu garantieren.
12. Das Säulchen wurde in ein frisches Eppi übertragen, 30µl Wasser direkt auf die Säule pipettiert und kurz inkubiert.
13. Abschließend wurde bei 10.000 rpm für 1 Minute zentrifugiert.

2.3.2 Qualitätskontrolle und Bestimmung der RNA-Konzentration

In einem nächsten Schritt wurde die Menge der RNA mithilfe von UV-Spektroskopie bestimmt. Diese Vermessung passierte im Nanodrop (DeNovix). Eine Extinktionseinheit (E_{260}) entspricht einer Menge von ungefähr 40µg RNA. Qualitativ hochwertige RNA-Präparationen haben ein Verhältnis von E_{260} zu E_{280} , das zwischen 1,7 und 2,0 liegt.²²

Zu Beginn wurde der Leerwert bestimmt, indem 1µl Wasser (HPLC-Qualität) auf die Sensoroberfläche pipettiert wurde. Danach wurden die Proben durch Pipettieren von je 1µl einzeln vermessen. Zwischen den Einzelmessungen wurde die Sensoroberfläche mit einem Papiertuch gereinigt.

2.3.3 Qualitätskontrolle am Agarosegel

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der RNA-Qualität wird mittels Gelelektrophorese durchgeführt. Es sollten im Idealfall zwei diskrete Banden für die 18S und 28S rRNA aufscheinen, um eine intakte Präparation aufzuzeigen. Sind diese Banden nicht deutlich zu erkennen, so ist die RNA mit hoher Wahrscheinlichkeit bereits abgebaut worden. Ist dagegen Fluoreszenz im oberen Bereich der Banden zu sehen, deutet diese auf enthaltene DNA hin, welche, falls gewünscht, mit DNase I entfernt werden kann.²²

Auf ein 1,4%-iges Agarosegel, in dem bereits der Fluoreszenzfarbstoff enthalten war, wurden von jeder Probe 4 µl aufgetragen. Als Referenz wurden sowohl ein 1kbp molekulare Leiter, als auch ein 100bp molekulare Leiter aufgetragen. Die Elektrophorese lief bei 120V für 50 Minuten. Unter der Dunkelhaube wurden mit Hilfe von Blaulicht die Gele aufgenommen.

2.4 cDNA-Synthese

Die Herstellung von cDNA (copy DNA) meint die Synthese des Komplementärstranges zur RNA. Man kommt somit wieder zu einer doppelsträngigen DNA (cDNA), die sich durch PCR vervielfältigen lässt und sich von genomischer DNA durch das Fehlen der Introns auszeichnet.²³

Die wichtigsten Schritte bestehen im Binden eines Primers an die RNA, welcher den Startpunkt der Erststrangsynthese für die Reverse Transkriptase (RT) signalisiert und somit eine DNA-Kopie der RNA entsteht. Dem Reaktionsgemisch ist häufig ein RNase Inhibitor zugesetzt, um eine sichere und reproduzierbare cDNA-Synthese zu gewährleisten.²³

Für diese Arbeit wurde die Erstrangsynthese mithilfe des RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kits (Thermo Scientific) durchgeführt. Das vollständige Protokoll hierfür ist im Anhang zu finden.

2.4.1 DNA-Verdau

In einem ersten Schritt wurde die DNA aus den Proben vollständig verdaut, um die Qualität der RNA zu steigern und eine cDNA-Synthese überhaupt erst zu ermöglichen. Dies erfolgte in einem 10µl Ansatz mit 1µg RNA, der 1µl DNase I zugesetzt wurde. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 1µl 50mM EDTA zupipettiert und nochmals für 10 Minuten bei 65°C inkubiert. Damit war der Ansatz für die weitere cDNA-Synthese vorbereitet. Durch diesen Schritt wurden außerdem alle Proben auf gleiche RNA-Konzentration von 100ng/µl eingestellt.

2.4.2 cDNA-Synthese

Es wurden im Anschluss laut Protokoll folgende Reagenzien in dieselben Reaktionsgefäße pipettiert:

11µl Probe

+ 1µl zufällige Hexamerprimer ("Random Hexamer Primer")

+ 4 µl 5x Reaktionspuffer

+ 1 µl Ribolock RNase Inhibitor (20U/µl)

+ 2 µl 10mM dNTP Mix

+ 1 µl RevertAid M-MµLV RT (200U/µL)

Gesamtvolumen: 20 µl

Die Erststrangsynthese fand im PCR-System ProFlex 96Well Cycler (Applied Biosystems) bei 25°C für 5 Minuten, gefolgt von 60 Minuten bei 42°C und abschließend noch 5 Minuten bei 70°C, statt.

2.5 Ausgewählte Gene und Primersequenzen

In einem vorhergehenden Projekt, das RNASeq von Kamille beinhaltet hat, wurden in den Sequenzen Kandidatengene für die Flavonoidbiosynthese identifiziert und Primer dafür entwickelt (Tab. 3)

Für eine relative Quantifizierung der Ergebnisse ist es nötig, einen Referenzwert heranzuziehen. Diese stellen in der Praxis häufig sogenannte housekeeping-Gene dar (beispielsweise 18S rRNA), welche in jeder lebenden Zelle einer Pflanze in ungefähr gleicher Höhe exprimiert werden. Dieses Referenzgen wird aus der gleichen Nukleinsäureprobe amplifiziert. Für diese Arbeit wurde das 26SrRNA als Referenzgen herangezogen, um später die gewonnenen Ergebnisse darauf zu beziehen (Tab. 3).²⁴

Tab. 3 Primersequenzen der Kandidatengene und des Referenzgens (die Annealingtemperatur für alle Primerkombinationen lag bei 61°C)

Enzym	Primer 1 (5'-Sequenz)	Primer 2 (3'-Sequenz)	Fragmentlänge (bp)
Chalconsynthase	AGAACACCCCAATCTAGCCC	TCTTTTGGATCGCTCACCT	216
Chalconisomerase	TGAACCAACAATGACAGCCG	TGGGGCTGATTACCAACTCA	254
Flavanon 3-Hydroxylase	ATGAATCTTGCATGGTGGGC	GCTCCACTCAAACGAATGCA	268
Flavonolsynthase	TCCAGTGATCGACCTTAGCC	GCAGAAGGTGGCCAAATGAT	299
Flavonsynthase	AACTCGCTATGGTCCGCTAA	TGCCAAGAAGCTCAACTGTG	229
Glycosyltransferase 1	CAGGGGAAGCCTCAAGAAGA	CGTCCTCAGGCCTTACAGAA	278
Glycosyltransferase 2	CAGGGGAAGCCTCAAGAAGA	CGTCCTCAGGCCTTACAGAA	276
Glycosyltransferase 3	GTGATGGAAAACCGTTGGCT	CCCACCCGATCACTTTACCT	284
Transkriptionsfaktor MYB	AAATGGTCTCAGATTGCGGC	GTGTCGGTGTTTTCTGACT	310
Transkriptionsfaktor WD40	GACGTGGATAACAATGGGGC	TTCCACAACAGGCAAAGTCG	271
Referenzgen 26S rRNA	CCGACCGACCTTGATCTTCT	GAGGGAAACTTCGGAGGGAA	242

2.6 Quantitative PCR (qPCR)

2.6.1 Generelles qPCR-Protokoll

Die Methodik der PCR wird herangezogen, um DNA in multiplen Zyklen, zu vervielfachen. Diese wird, ergänzt durch einen Fluorimeter, zur quantitativen PCR, auch real-time PCR genannt, weil es dadurch möglich ist, nach jedem Zyklusschritt die Menge der DNA zu messen.²⁵

Die qPCR ist charakterisiert durch den hohen Informationsgehalt, der aus dieser Methodik gewonnen werden kann. Im Gegensatz zu einer gewöhnlichen PCR, bei welcher ausschließlich am Ende des PCR-Zyklus die Menge an PCR-Produkt gemessen wird, ist es bei der real-time PCR möglich, den Zyklus-Zeitpunkt zu ermitteln, bei welchem die Amplifikation der cDNA einen vorgegebenen Grenzwert überschreitet. Je größer die Menge des zu vervielfachenden Ausgangsproduktes ist, desto höher ist die Fluoreszenz und je kleiner damit die Zyklus-Zahl, bei der ein gewisser Schwellenwert (threshold) überschritten wird. Diese Zyklus-Zahl wird als Ct-Wert bezeichnet.²⁵

Während der gesamten Genexpressionsstudie wurde der Rotor-Gene q 2Plex (Qiagen) verwendet. Die gesamte Auswertung der qPCR-Läufe erfolgte mit der Rotor Gene Software 2.1.0.9.

Für die qPCR wurde ein 10µl Ansatz pipettiert. Der Ansatz enthielt 2µl EvaGreen Solis HRM Mastermix (Solis Biotec), je 200nM Primer, ergänzt durch ddH₂O auf 9µl. Danach wurde 1µl cDNA Verdünnung 1:16 zupipettiert.

Zu Beginn wurde der Ansatz für 14 Minuten bei 95°C inkubiert, um die Polymerase zu aktivieren. Das Programm des Thermocycler bestand aus 45 Zyklen. Die Denaturierung erfolgte bei 95°C für 30 Sekunden, die Anlagerung bei 61°C für 30 Sekunden und die Elongation bei 72°C für eine Minute.

In jedem Lauf wurde das Referenzgen mitgeführt.

2.6.2 qPCR-Effizienzbestimmung

Die Durchführung einer qPCR-Effizienzbestimmung ist unumgänglich, um die anschließende Auswertung der Ergebnisse zu ermöglichen und die Korrektheit der Resultate zu garantieren. Im besten Fall nimmt die Effizienz den Wert von 100% ein, was eine ideale Amplifikation, also die exakte Verdoppelung der DNA nach jedem Zykluslauf, implizieren würde. In der Praxis, ist ein Effizienzwert zwischen 90 % und 110 % tolerabel.²⁶

Für diese Arbeit wurde folgende Methode der Bestimmung gewählt: zuerst wurden die Proben innerhalb von Genotypen und Organen gepoolt, um Unterschiede zwischen den Proben auszuschalten. Aus den resultierenden sechs gepoolten Proben (DBK, DZB, DBL, BBK, BZB und BBL) wurde eine Verdünnungsreihe mit vier Verdünnungsschritten erstellt. Die Verdünnung fand im Verhältnis 1:4 statt.

Die qPCR wurde mit obigem Protokoll (2.6.1) durchgeführt. Danach wurde mit der Regressionsgeraden die Effizienz bestimmt (Abb. 16). Die Effizienz lag zwischen 82% (GT3) und 105% (MYB).

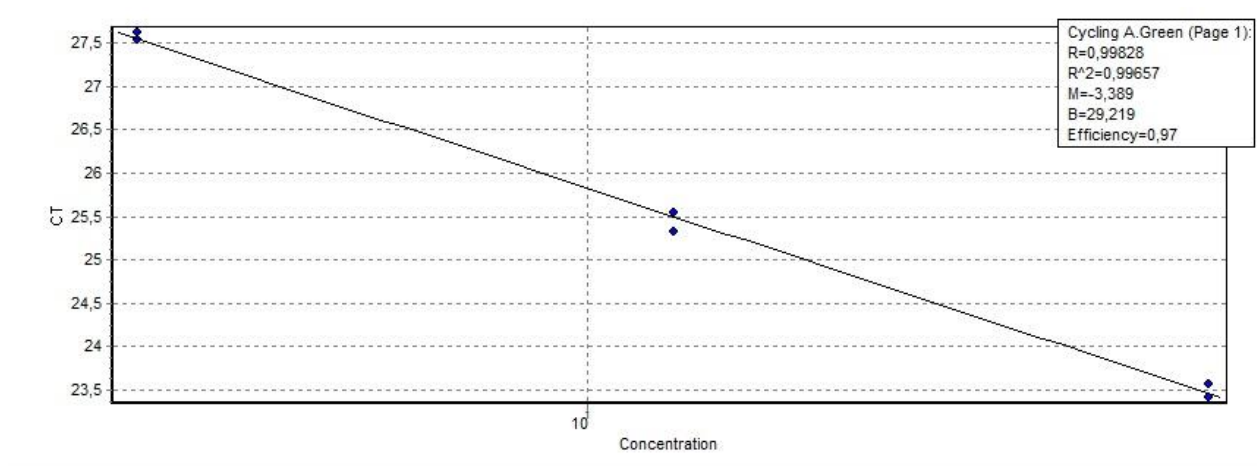


Abb. 16 beispielhafte qPCR-Effizienzbestimmung (1CHS BK)

Der gesamte Prozess der Probenaufbereitung und die tatsächliche Durchführung der qPCR-Läufe erfolgte unter Einhaltung der MIQE-Guidelines.²⁷

2.6.3 Auswertung der Genexpression

Die Daten der Genexpression wurden in Excel nach der δ Ct-Methode normalisiert. Dabei wird der Ct-Wert des Referenzgens vom Ct-Wert des untersuchten Gens abgezogen und um die Primereffizienz korrigiert. Da das Referenzgen im Vergleich zu den Zielgenen sehr hoch exprimiert ist, sind die Angaben in mRNA untersuchtes Gen pro Million 26S mRNA (ppm).²⁸ Die oft verwendete $\delta\delta$ Ct-Methode wurde deshalb nicht angewendet, weil es durch die extrem unterschiedliche Expression schwierig war, sich auf ein Organ als Referenz zu einigen.

Die statistischen Berechnungen erfolgte in R 4.0.5²⁹ unter Rstudio (1.3.1093).³⁰

2.7 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Um Rückschlüsse aus den Ergebnissen der Genexpressionsanalyse auf die Flavonoidbiosynthese zu treffen, wurde die tatsächlich vorhandene Flavonoidzusammensetzung und -menge der einzelnen Pflanzenteile mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC; High Performance Liquid Chromatography) bestimmt.

Unter Chromatographie wird allgemein ein Trennungsprozess verstanden, bei dem sich die zu untersuchende Probe in zwei Phasen, einer stationären und einer mobilen, verteilen soll. Diese Verteilung findet, je nach angewandter Methode, in einer Trennsäule oder einem Bett statt. Während die stationäre Phase in diesem chromatographischen Bett ruht, strömt die mobile Phase, in welcher sich das Probengemisch befindet, vorbei und ermöglicht den einzelnen Komponenten der Probe eine Wechselwirkung mit den Phasen.³¹

Affinitätsabhängig werden manche Substanzen stärker durch die stationäre Phase zurückgehalten, als andere, was in verschiedenen Retentionszeiten resultiert. Dieses bevorzugte Bindungsvermögen wird mithilfe des Verteilungskoeffizienten K ausgedrückt.³¹ Die zeitlich differente Elution der einzelnen Substanzgruppen resultiert in einem Chromatogramm, auf welchem die Abszisse die Zeit und die Ordinate die Stärke des Signals zeigen. Die Peakhöhen bzw. Peakflächen erlauben in weiterer Folge eine Vorhersage über die Konzentration der Analyten in der Probe.³¹

Als stationäre Phase fungieren in der Regel feste und poröse Trägermaterialien, welche mit einem Flüssigkeitsfilm bedeckt sind. Während in der Gaschromatographie eine gasförmige mobile Phase (Stickstoff, Wasserstoff) eingesetzt wird, finden bei einer Flüssigchromatographie (LC; Liquid Chromatography) verschiedenste Flüssigkeiten ihre Anwendung.³¹

Im Vergleich zur klassischen LC, ermöglicht die HPLC durch ihre deutlich erhöhte Trennleistung, eine Trennung bereits kleinster Substanzmengen. Diese Trennleistung kann auf der einen Hand erzielt werden durch eine sehr kleine Partikelgröße der stationären Phase und auf der anderen Hand durch eine Hochdruckpumpe, welche die mobile Phase durch die Säule presst.³²

2.7.1 Flavonoidextraktion

Die Flavonoidextraktion aus den getrockneten Pflanzenteilen erfolgte laut folgendem Protokoll:³³

Die Probe wurde zuerst in der Schwingmühle (MM30, Retsch) vermahlen und danach 500mg in ein 10ml Glasgefäß eingewogen. Dann wurde die eingewogene Probe mit 5 ml 70% Methanol versetzt und im Ultraschallbad bei 60°C für 20 Minuten extrahiert. Nach der Extraktion wurde in einen 5 ml Maßkolben filtriert und bis zur Marke mit 70% Methanol aufgefüllt. Die geringe Masse der Blütenteile und die fehlende Blütenmenge der Pflanzen limitierte die Probennahme, weshalb die zugegebene Methanolmenge an die tatsächliche Einwaage der Proben angepasst wurde (Tab. 4).

Tab. 4 HPLC-Einwaagen

Probe	Einwaage	Methanol
DJBK	0,0551g	5,5 ml
DMBK	0,0549g	5,5 ml
DABK	0,0523g	5,2 ml
DJZB	0,0191g	1,9 ml
DMZB	0,0297g	2,9 ml
DAZB	0,0500g	5,0 ml
DBL	0,0046g	0,5 ml

Probe	Einwaage	Methanol
BJBK	0,0600g	6,0 ml
BMBK	0,0533g	5,3 ml
BABK	0,0527g	5,3 ml
BJZB	0,0095g	1,0 ml
BMZB	0,0191g	1,9 ml
BAZB	0,0216g	2,1 ml
BBL	0,0045g	0,5 ml

2.7.2 Protokoll HPLC

Für die Messungen wurde eine HPLC-Apparatur Shimadzu Nexera XR verwendet. Dieses HPLC-Geräte war aufgebaut aus einer Pumpe LC-20AD, einem Autosampler SK-20A, einem Degassing Unit 20A_{SR}, einem Systemcontroller SCL-40, dem Säulenofen CTO-20AC und einer Durchflussszelle (Diode Array Detector) SPD-M20A. Die für eine Ergebnisauswertung nötige Software, war LabSolutions Version 5.97. Das Injektionsvolumen der Proben betrug 10 µl und die Auswertung der Ergebnisse erfolgte bei 335nm Wellenlänge. Die Auftrennung der gesamt 14 Proben fand unter folgenden Bedingungen statt.³⁴

- Säule: C18 (250 x 4,6 mm id, 5 µm Partikelgröße)
- Flussrate: 1.5 ml/min.
- Lösungsmittel
 - A: H₂O + 0,1% Essigsäure
 - B: Acetonitril
- Gradient:
 - 0-15 min. 25%
 - 15-20 min. 25-35%
 - 20-25 min. 35-55%
 - 25-30 min. 55-60%

3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, die Genexpression der Gene, die für einen Teil der Flavonoidsynthese in der Kamille verantwortlich sind, zu analysieren, um anschließend die gewonnenen Ergebnisse mit der tatsächlich vorhandenen Flavonoidzusammensetzung zu vergleichen. Die Experimente wurden an zwei verschiedenen Individuen durchgeführt (DEG8 und BO11/18) und von drei Altersstadien der Blüte und dem jungen Blatt genommen, was Rückschlüsse auf mögliche Sortendiversitäten und altersbedingte Unterschiede im Inhaltsstoffmuster bzw. in der Genexpression zuließ.

Es wurden Daten von zehn Genen gewonnen, wobei fünf davon für die Synthese der Flavonoidaglykoe essentiell sind. Die andere Hälfte bilden drei Kandidatengene für die Verzuckerung (Glykosidasen) beziehungsweise zwei Transkriptionsfaktoren, die im Zusammenhang mit der Flavonoidbiosynthese entscheidend sind. Parallel dazu wurden die Flavonoide mit HPLC analysiert und vor allem die Flavone Apigenin, Luteolin und deren Glykoside, nachgewiesen.

3.1 Qualität und Konzentration der RNA

Die gewonnenen RNA-Konzentrationen waren allgemein zufriedenstellend (Tab. 5). Das Verhältnis 260/280 war lediglich bei der Probe DEG8 JBK ein Ausreißer, was sich auch später bei der Ergebnisauswertung niederschlug.

Tab. 5 Ergebnisse Nanodropvermessung

Sample	Sample Name	Konzentration [ng/μl]	260/280	260/230
1	DEG8 JBK	1146.985	2.12	2.23
2	DEG8 MBK	957.116	2.04	2.35
3	DEG8 ABK	410.774	2.07	1.76
4	DEG8 JZB	232.444	2.08	1.17
5	DEG8 MZB	260.358	2.06	0.66
6	DEG8 AZB	106.892	2.06	1.08
7	DEG8 Blatt	438.112	2.09	1.81
8	BO11/18 JBK	594.872	2.07	2.25
9	BO11/18 MBK	962.585	2.03	1.43
10	BO11/18 ABK	616.316	2.06	2.15
11	BO11/18 JZB	356.586	2.08	1.06
12	BO11/18 MZB	262.264	2.07	0.64
13	BO11/18 AZB	216.722	1.97	1.63
14	BO11/18 Blatt	479.675	2.1	1.89

Die Blütenköpfe und die Zungenblüten der Bonaproben zeigten die zu erwarteten Banden im Bereich von ca. 1 bzw. 3 kbp (Abb. 17). Für DEG8 Blütenköpfe im mittleren und altem Stadium waren die Ergebnisse nach der ersten RNA-Extraktion nicht befriedigend. Diese wurden noch einmal extrahiert und im Gel aufgetrennt (siehe Abb. 18). Die jungen Zungenblüten zeigten sich in der Fragmentierung wesentlich schwächer als die mittleren und alten Zungenblüten. Für die Blätter zeigte sich sowohl in Bona, als auch in Degumill die Bande bei 1 kbp, die zweite Bande ist durch andere Banden nur unklar zu sehen. Die Fragmentierung war für die Blätterproben zwar nicht ideal, aber die Qualität war für die darauffolgenden Schritte ausreichend.

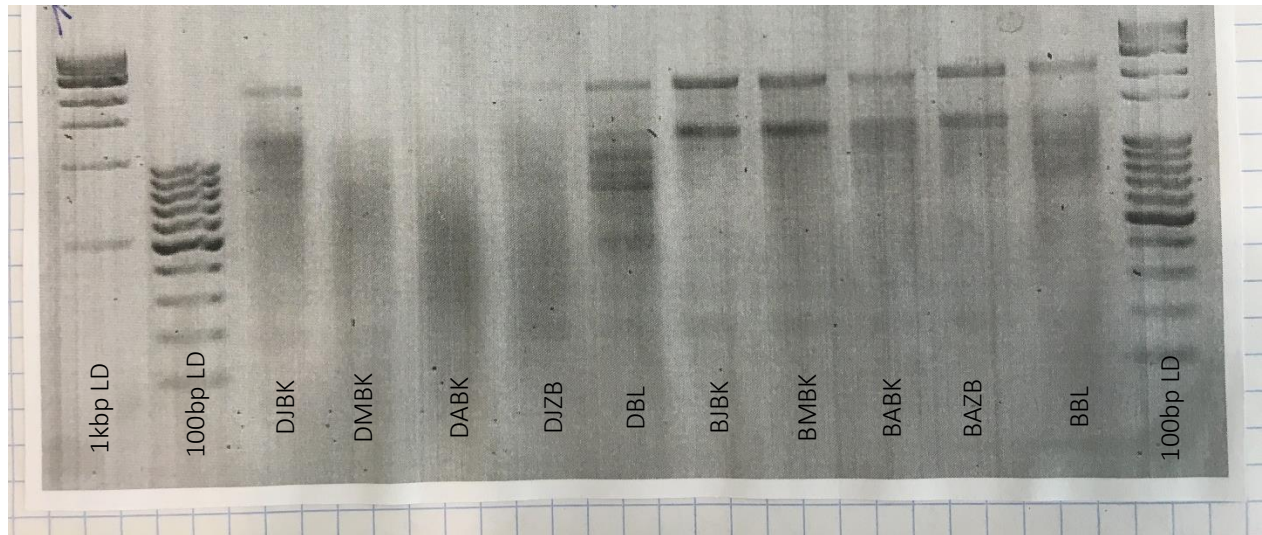


Abb. 17 Agarosegel RNA-Qualität 1

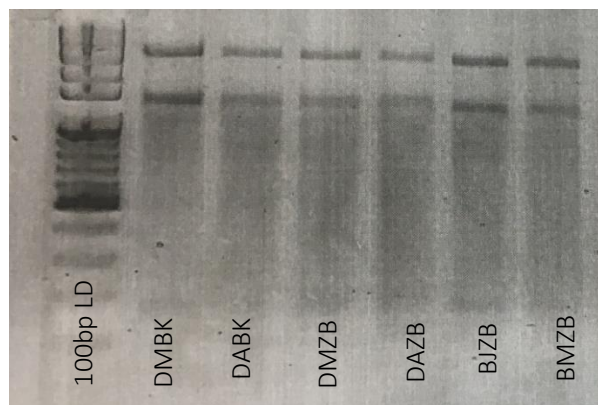


Abb. 18 Agarosegel RNA-Qualität 2

3.2 Genexpression der Enzyme

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden bereits Kandidatengene für die Flavonoidbiosynthese in der Kamille identifiziert. Deren Expression wurde in dieser Arbeit an verschiedenen Blütenbestandteilen und dem jungen Laubblatt untersucht. Als Referenzgen fungierte 26S rRNA. Da diese überaus hoch exprimiert war ist die Ergebnisdarstellung in Kopien pro Million 26SrRNA Kopien angegeben.

3.2.1 Enzym 1 Chalconsynthase

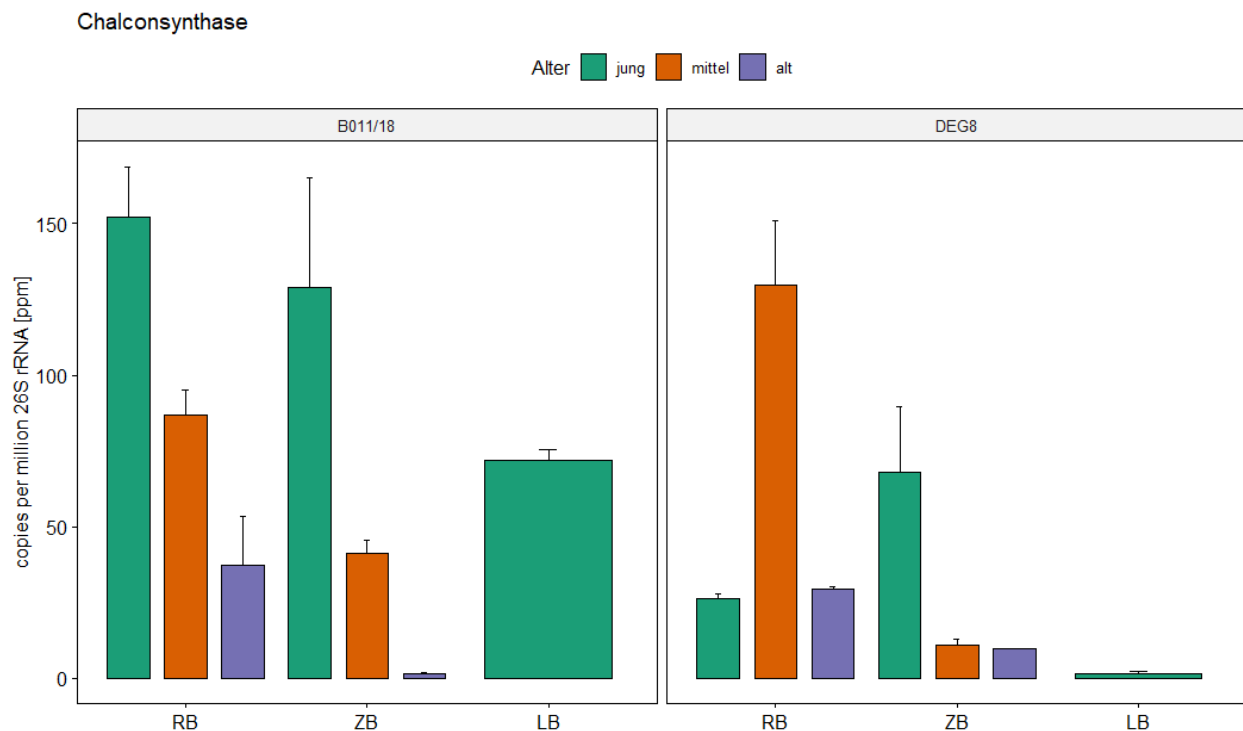


Abb. 19 Genexpression Chalconsynthase (RB ... Röhrenblüten, ZB ... Zungenblüten, LB ... erstes Laubblatt)

Die Chalconsynthase war generell stärker in BO11/18 exprimiert, wobei sich aber auch das Expressionsmuster deutlich von DEG8 unterschied (Abb. 19).

In BO11/18 war die Chalconsynthase in den jungen Reifestadien immer am höchsten exprimiert und nahm signifikant über mittel zu alt ab. In den Röhrenblüten war die Expression am höchsten, während sie in Zungenblüten in mittleren und alten Stadien signifikant geringer war als in den Röhrenblüten. Die Chalconsynthase war im jungen Laubblatt nur etwa halb so hoch exprimiert wie in den Röhrenblüten.

Bei der DEG8 zeigte sich ein anderes Expressionsprofil. In den Röhrenblüten schien die Expression im mittleren Alter am höchsten zu sein, während in den Zungenblüten ein abfallendes Muster zu beobachten war. Die Blätter exprimierten dieses Enzym in sehr geringer Menge.

3.2.2 Enzym 2 Chalconisomerase

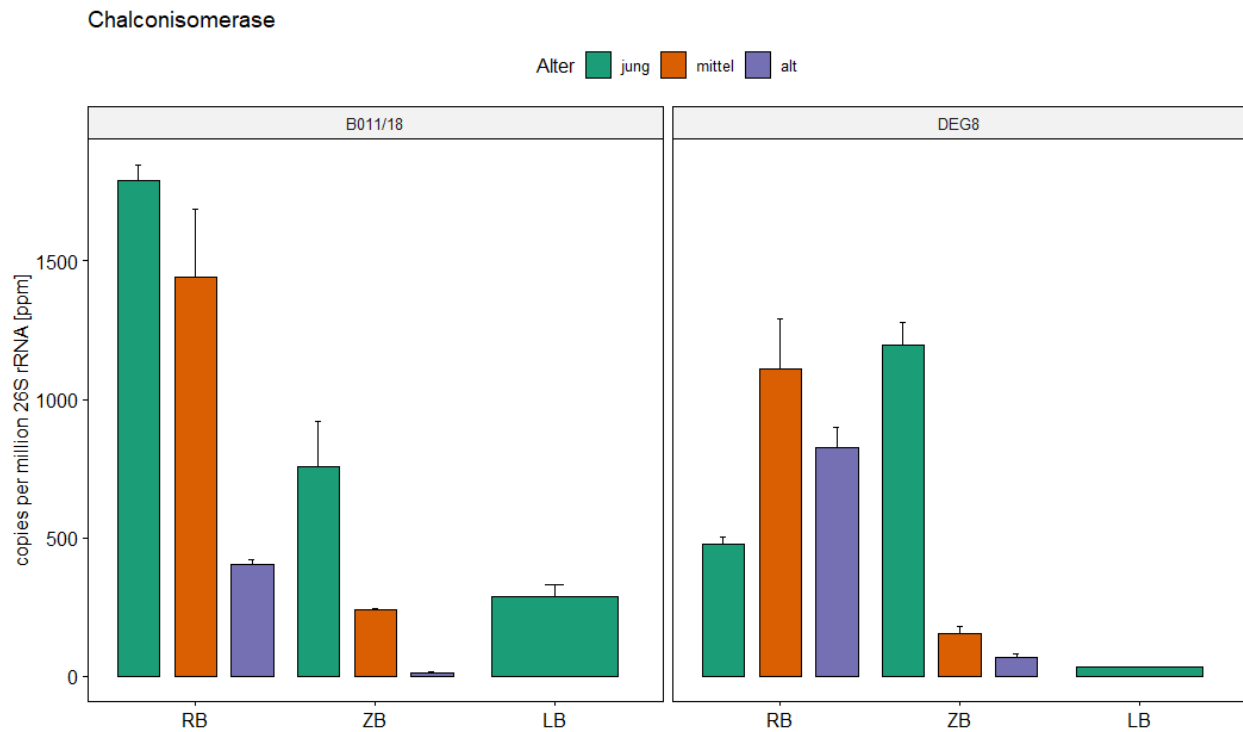


Abb. 20 Genexpression Chalconisomerase (RB ... Röhrenblüten, ZB ... Zungenblüten, LB ... erstes Laubblatt)

Das Genexpressionsmuster des zweiten Enzyms Chalconisomerase war dem des ersten Enzyms sehr ähnlich (Abb. 20). Einzig die Anzahl der Genkopien war um ein zehnfaches höher zu beobachten. Auch hier war im Individuum BO11/18, unabhängig vom Pflanzenteil, ein alt-jung Gefälle zu beobachten. Die Blätter der BO11/18 exprimierten dieses Gen stärker als die Blätter von DEG8. Betrachtet man die Genkopien in DEG8, so war in den mittleren Röhrenblüten und in den jungen Zungenblüten die höchste Menge an Chalconisomerase zu finden.

3.2.3 Enzym 3 Flavanon-3-hydroxylase

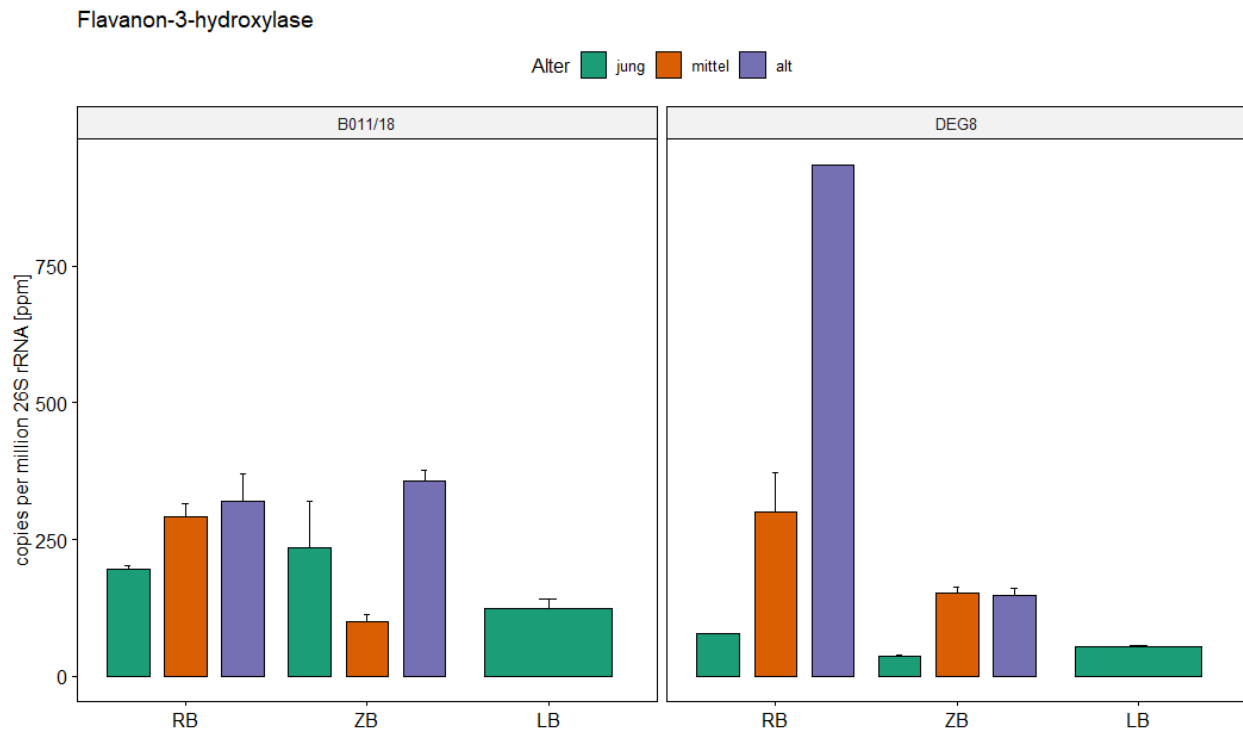


Abb. 21 Genexpression Flavanon-3-hydroxylase (RB ... Röhrenblüten, ZB ... Zungenblüten, LB ... erstes Laubblatt)

Das dritte Enzym Flavanon-3-hydroxylase ist wie im Punkt 1.3 Flavonoidsynthese in Pflanzen beschrieben das erste Enzym am Syntheseweg Richtung der Flavonole. Dieses Enzym war sowohl in Röhren- als auch in Zungenblüten in nennenswerter Höhe exprimiert (Abb. 21). Das Expressionsmuster der Röhrenblüten zeigte in beiden Individuen einen Anstieg mit dem Blütenalter. Die Zungenblüten ließen kein eindeutiges Muster erkennen. Im Individuum B011/18 stach ein Abfall im mittleren Blütenalter heraus. In DEG8 zeigten die jungen Zungenblüten eine niedrigere Expression als die mittleren und alten Zungenblüten. Die Flavanon-3-hydroxylase wurde in den Blättern unabhängig vom Individuum zu einem geringen Teil exprimiert.

3.2.4 Enzym 4 Flavonolsynthese

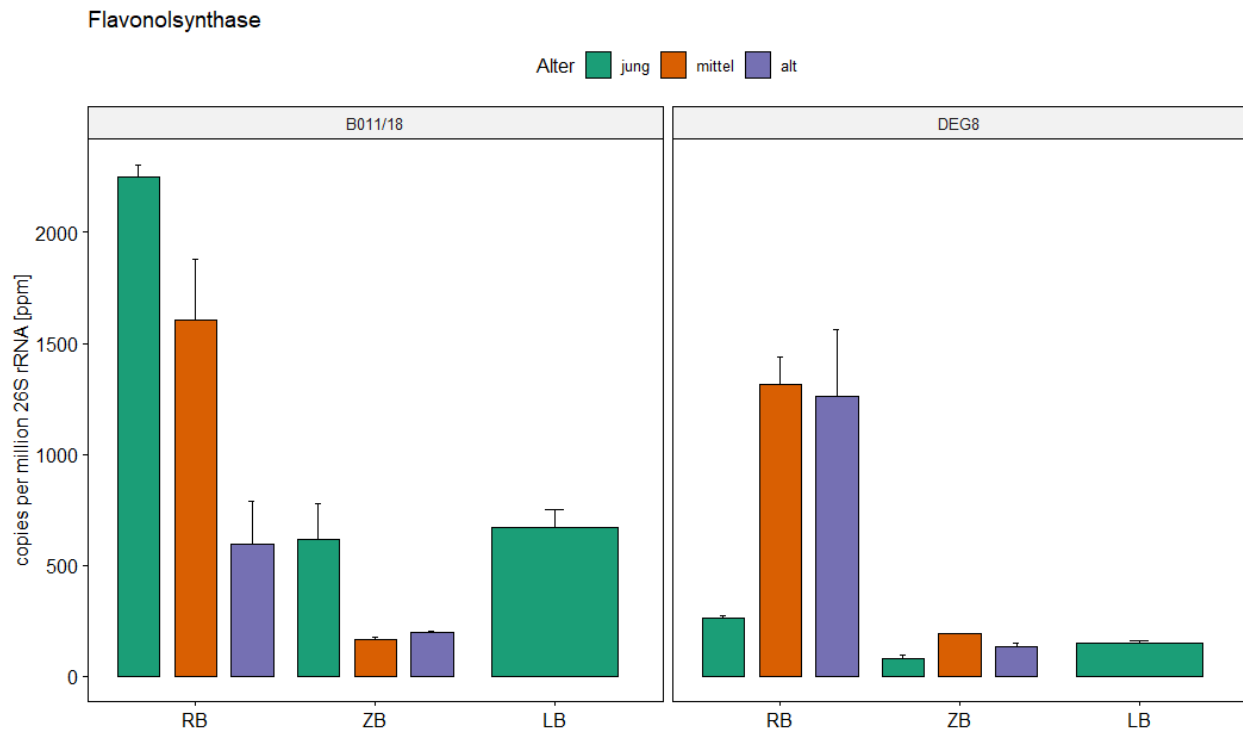


Abb. 22 Genexpression Flavonolsynthese (RB ... Röhrenblüten, ZB ... Zungenblüten, LB ... erstes Laubblatt)

In einem zweiten Schritt der Flavonolsynthese spielt die Flavonolsynthase eine wichtige Rolle (siehe 1.3 Flavonoidsynthese in Pflanzen). Die Expression dieses Enzyms war, im Vergleich zur Flavanon-3-hydroxylase, ausgesprochen hoch (Abb. 22). Das Muster der B011/18 zeigte in den Röhrenblüten ein gänzlich anderes Bild, als das vorhergehende Enzym. Hier konnte wieder eine abfallende Genexpression mit steigendem Alter beobachtet werden. Die Zungenblüten hingegen zeigten ein ähnliches Bild wie vorher, nämlich einen nennenswerten Abfall der Genexpression im mittleren Alter.

Das Individuum DEG8 zeigte ein sehr ähnliches Genexpressionsmuster wie bei der Flavanon-3-hydroxylase. Die Genkopien stiegen mit dem Alter der Röhrenblüten an, während in den Zungenblüten die jungen Proben wenig Flavonolsynthase vermuten ließen.

3.2.5 Enzym 5 Flavonsynthase

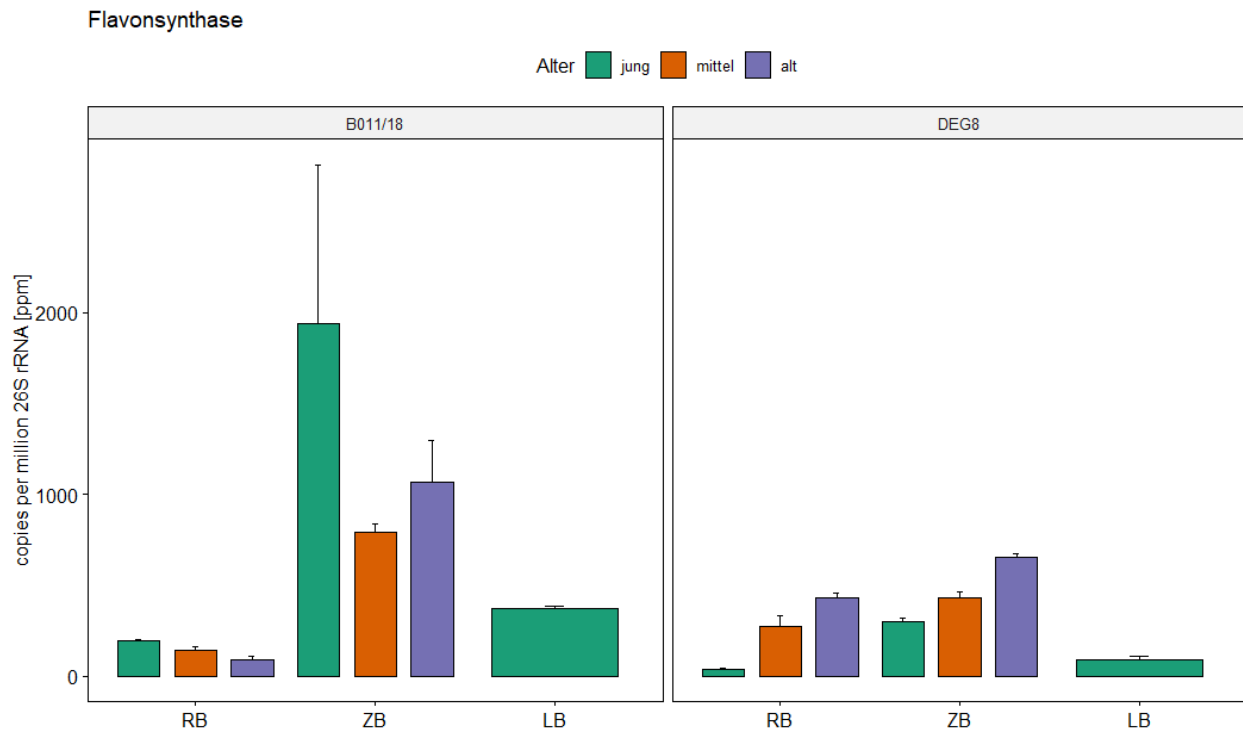


Abb. 23 Genexpression Flavonsynthase (RB ... Röhrenblüten, ZB ... Zungenblüten, LB ... erstes Laubblatt)

Das Enzym Flavonsynthase ist für die Synthese der Flavone, im konkreten Fall der Kamille für die Herstellung von Luteolin oder Apigenin und dessen Glykoside verantwortlich. Wie bereits aus der Literatur hervorgeht, werden diese Flavonoide vorwiegend in Zungenblüten produziert, ferner in den Röhrenblüten oder Blättern.¹⁷ Vor allem im Individuum B011/18 war klar ersichtlich, dass dieses Enzym vor allem in den eben diesen Zungenblüten exprimiert wurde, in besonderer Intensität in den jungen Proben. Hervorzuheben ist hier auch die Anzahl der mRNA-Kopien, die im Vergleich zu den vorigen Enzymen rigoros hoch ausfiel (Abb. 23).

Auch in DEG8 war ein Trend in Richtung der Zungenblüten zu verzeichnen, wenn auch nicht so ausgeprägt. Weder in Röhrenblüten, noch in Blättern wurde die Flavonsynthase in nennenswerter Menge exprimiert.

3.2.6 Glycosyltransferasen 1 bis 3

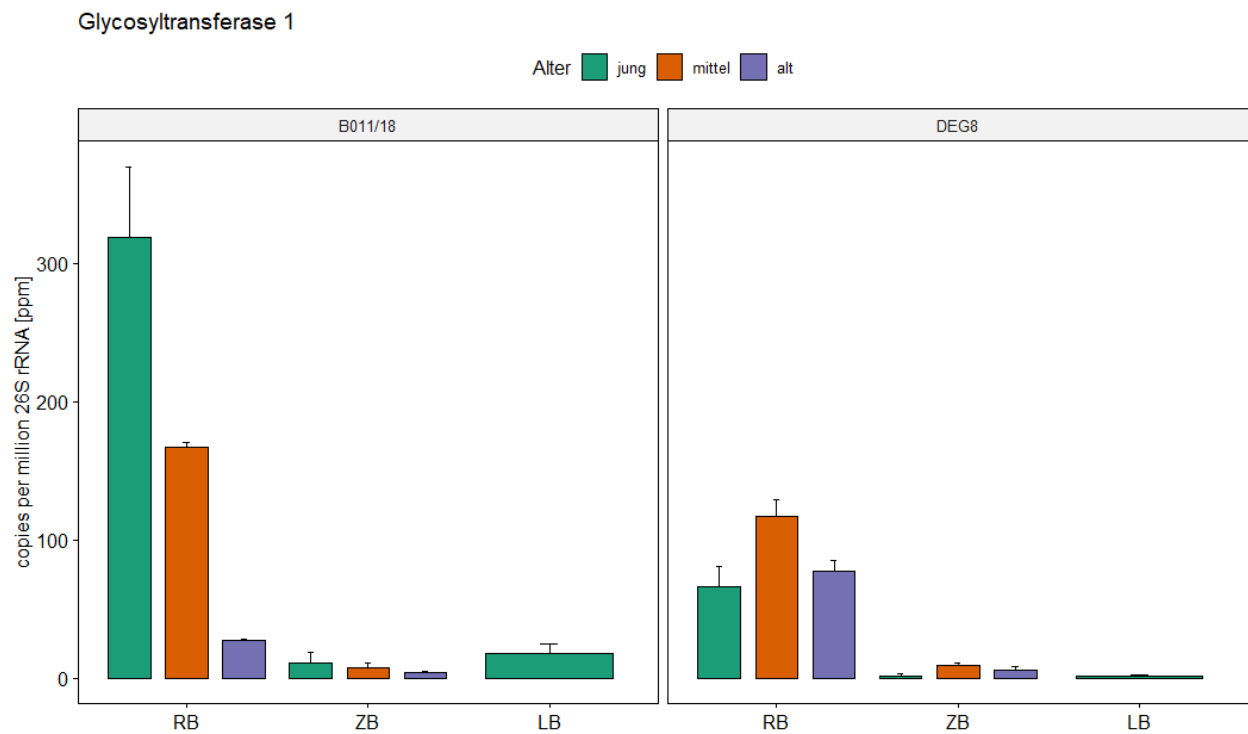


Abb. 24 Genexpression Glycosyltransferase 1 (RB ... Röhrenblüten, ZB ... Zungenblüten, LB ... erstes Laubblatt)

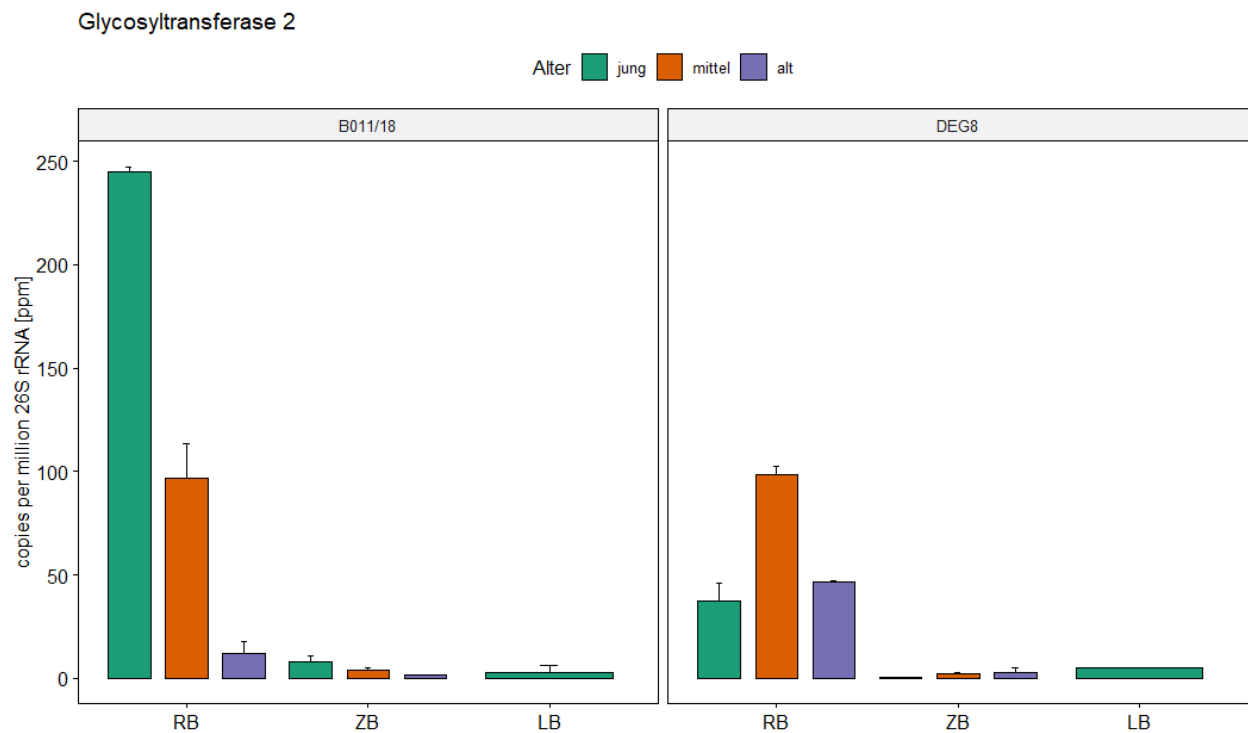


Abb. 25 Genexpression Glycosyltransferase 2 (RB ... Röhrenblüten, ZB ... Zungenblüten, LB ... erstes Laubblatt)

Glycosyltransferase 3

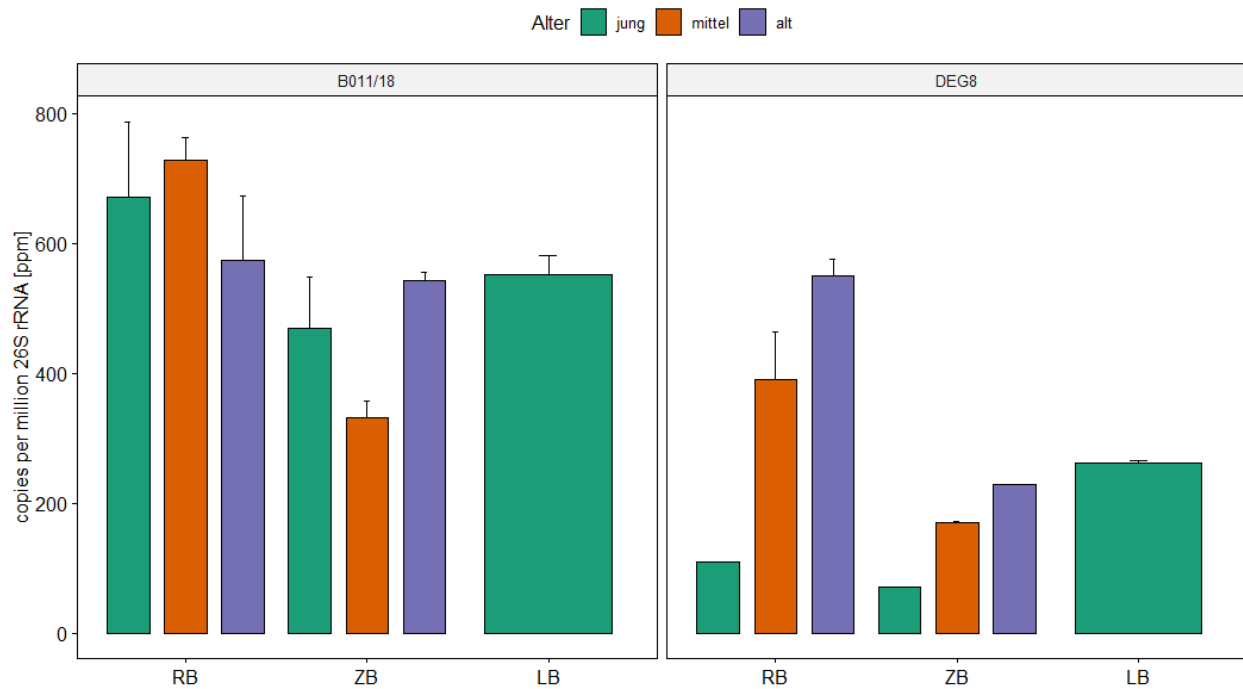


Abb. 26 Genexpression Glycosyltransferase 3 (RB ... Röhrenblüten, ZB ... Zungenblüten, LB ... erstes Laubblatt)

Die Ergebnisse der drei Kandidaten für Glycosyltransferasen werden hier aufgrund der sehr ähnlichen Expression der ersten beiden Glycosyltransferasen gemeinsam vorgestellt. Um eventuell Rückschlüsse auf die Glykosylierungen treffen zu können, wurden im Zuge dieser Arbeit drei verschiedene Glycosyltransferasen auf ihre Expression hin untersucht. (siehe 1.3 Flavonoidsynthese in Pflanzen).

Die erste und die zweite Transferase GT1 (Abb. 24) und GT2 (Abb. 25) schienen zwar, unabhängig vom Individuum, in Röhrenblüten aktiv zu sein, aber weder in den Zungenblüten noch in den Blättern eine Funktion zu erfüllen. Außerdem ist anzumerken, dass die Anzahl der mRNA-kopien nicht von beträchtlichem Ausmaß war. Lediglich das Jung-Alt-Gefälle war im Individuum B011/18 wieder sehr gut erkennbar und auch das Genexpressionsmuster der DEG8 ließ ähnliche Schlussfolgerung zu.

Das Ergebnis der dritten Glycosyltransferase war wesentlich signifikanter. Diese schien in allen Pflanzenteilen und auch in beiden Individuen für die Verzuckerung mitverantwortlich zu sein. Diese Erkenntnis ließ aber nicht darauf schließen, dass einzig dieses Enzym für die Glykosylierungen verantwortlich ist, vielmehr ist GT3 (Abb. 26) offensichtlich daran beteiligt.

Im Individuum DEG8 war ein Jung-Alt-Anstieg zu beobachten. Die Blätter exprimierten diese Transferase ebenfalls in einem nennenswerten Ausmaß.

3.2.7 Transkriptionsfaktoren MYB und WD40

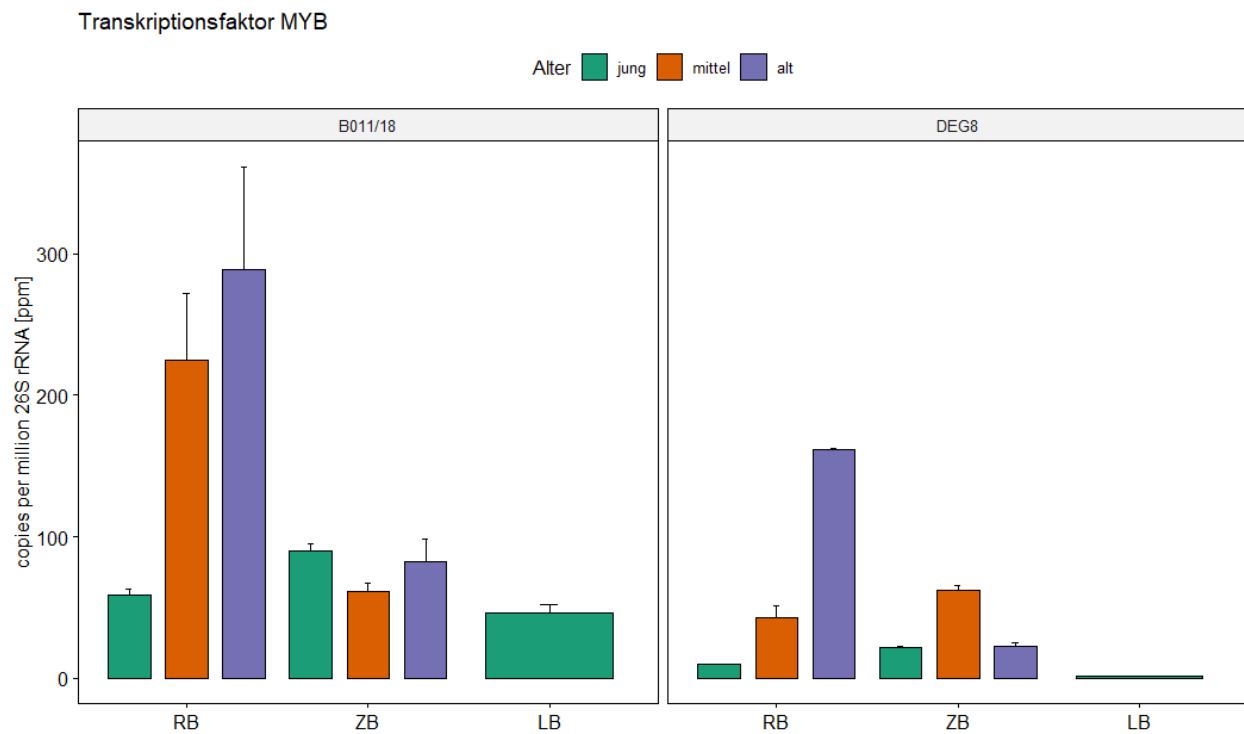


Abb. 27 Genexpression Transkriptionsfaktor MYB (RB ... Röhrenblüten, ZB ... Zungenblüten, LB ... erstes Laubblatt)

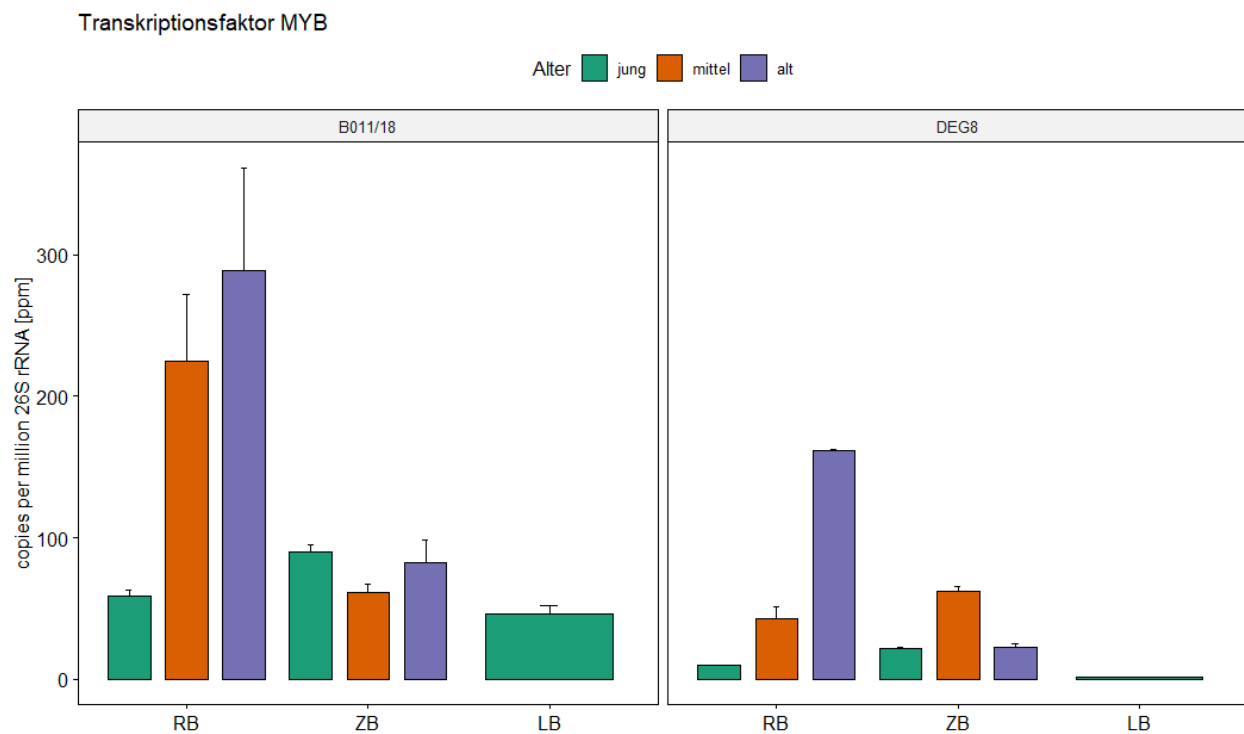


Abb. 28 Genexpression Transkriptionsfaktor WD40 (RB ... Röhrenblüten, ZB ... Zungenblüten, LB ... erstes Laubblatt)

Wie unter 1.3 Flavonoidsynthese in Pflanzen bereits beschrieben, sind Transkriptionsfaktoren für die Kontrolle der Genexpression bzw. für die Aktivierung der Transkription essentiell. Für diese Arbeit wurden zwei verschiedene Faktoren MYB und WD40 untersucht, um Überlegungen zu deren Mitbeteiligung bei der Genexpression der Enzyme anzustellen.

Allgemein betrachtet, würde man vermuten, dass das Genexpressionsmuster eines Transkriptionsfaktors mit dem der Enzyme korrelieren müsste. Eine hohe Expression dieses Faktors, zieht also auch eine hohe Expression des betroffenen Gens nach sich. Paradoxerweise zeigten die gewonnenen Ergebnisse für MYB aber das genaue Gegenteil (Abb. 27). Der Faktor wurde, sowohl in BO1/18, als auch in DEG8 in den jungen Röhrenblüten weniger stark exprimiert, als in den älteren Proben. Für die Zungenblüten ergab sich ein kurioses Genexpressionsmuster. In BO11/18 war der Faktor im mittleren Altersstadium am höchsten, in DEG8 im niedrigstem Ausmaß exprimiert.

Für den Transkriptionsfaktor WD40 ließ sich im ersten Individuum das gleiche Muster erkennen (Abb. 28). Im Fall von DEG8 war in Röhren- und in Zungenblüten ein Jung-Alt-Gefälle erkennbar.

3.2.8 Ergebnisdarstellung in PCA-Biplots

Um die Ergebnisse vertieft hinsichtlich einer Individuenunterscheidung zu beurteilen, wurden außerdem PCA-Biplots angefertigt. PCA steht für principal components analysis zu deutsch Hauptkomponentenanalyse, welche ein zentrales statistisches Verfahren darstellt. Ziel ist es, eine große Menge an Daten auf sogenannte Hauptkomponenten zu reduzieren und diese grafisch darzustellen.³⁵

Die folgenden PCA-Biplots zeigten zum einen die Daten der beiden Individuen vermischt, um die Unterschiede in den einzelnen Pflanzenorganen darzustellen. Dabei zeigte sich, dass sich die Zungenblüten sehr deutlich in ihrem Expressionsprofil von Röhren- und Laubblatt unterschieden (Abb. 29). Zum anderen wurden die Daten der Röhrenblüten, Zungenblüten und Blätter in den beiden Individuen unterschieden (Abb. 30 bis Abb. 32). Dabei zeigten sich hier sehr deutliche Unterschiede zwischen den beiden Genotypen.

Die wichtigste Information, die aus diesen Analysen gezogen werden konnte, ist der deutliche Unterschied zwischen DEG8 und BO11/18. Die Pfeile wiesen zu einem Gutteil in Richtung des zweiten Individuums BO11/18, in welchem die Gene in wesentlich erheblicherer Menge gefunden wurden. Im Biplot der Zungenblüten und der Blätter war der Individuenunterschied wesentlich besser ersichtlich, als in den Röhrenblüten, in welchen sich die Verteilung der Gene doch recht divers zeigte.

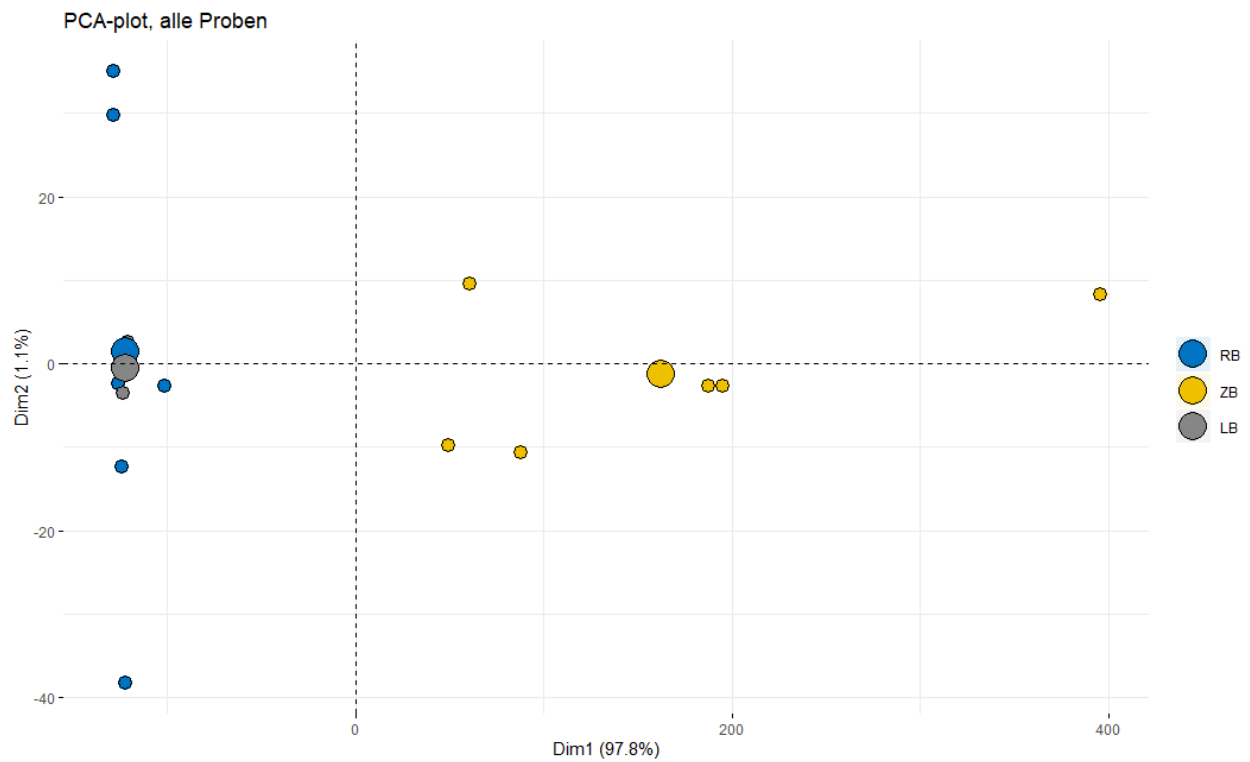


Abb. 29 PCA-Biplot aller Proben (die großen Kreise zeigen die Positionen der Gruppenzentroide an)

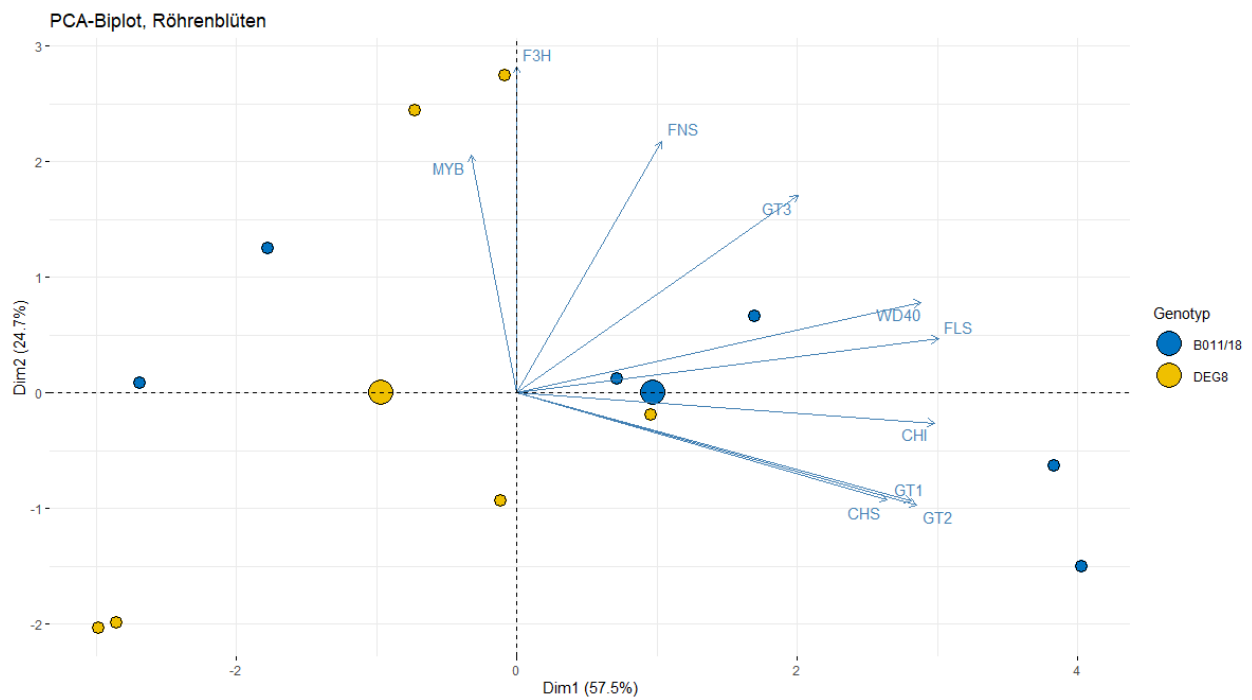


Abb. 30 PCA-Biplot der Röhrenblüten (die großen Kreise zeigen die Positionen der Gruppenzentroide an)

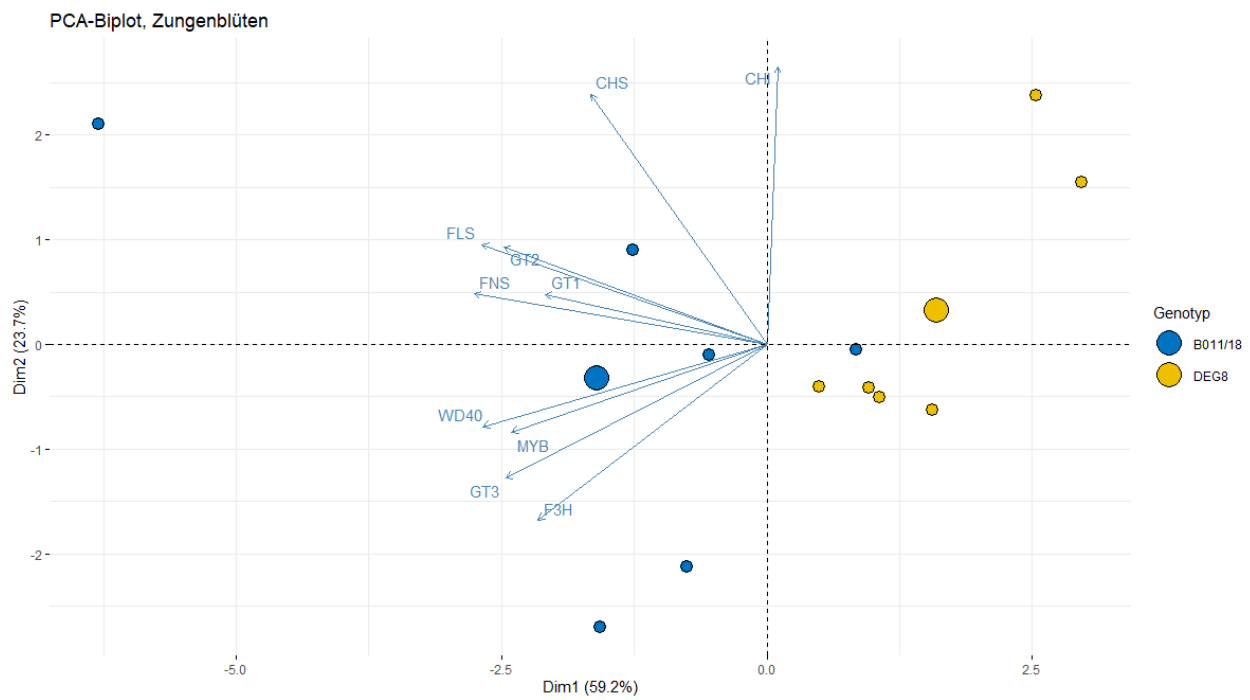


Abb. 31 PCA-Biplot der Zungenblüten (die großen Kreise zeigen die Positionen der Gruppenzentroide an)

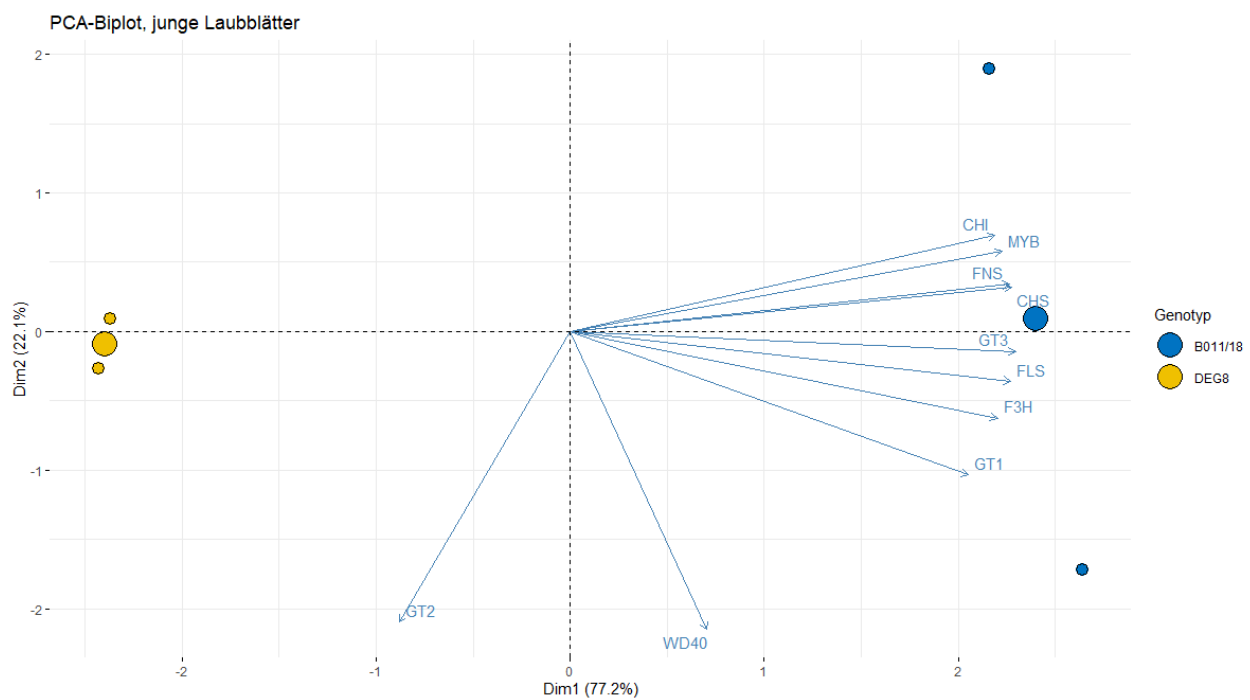


Abb. 32 PCA-Biplot Blätter (die großen Kreise zeigen die Positionen der Gruppenzentroide an)

3.3 Flavonoidzusammensetzung

3.3.1 Gruppierung der Flavonoide

Die Proben wurden mit HPLC/UV untersucht. Die Ergebnisdarstellung beruht auf der Relation der Peakflächen einzelner Flavonoide zur Gesamtfläche aller Flavonoide eines Laufes (= einer Probe).

Aufgrund der UV-Spektren konnten die Flavonoide deutlich erkannt werden (Gesamtflavonoidgehalt). Insgesamt wurden sieben Apigeninderivate und drei Luteolinderivate (die Aglyka jeweils in dieser Aufstellung mit inkludiert) aufgrund ihrer Spektren gruppiert. Diese beiden Gruppen sind Flavone und wurden nach ihrer Stellung in der Biosynthese auch zusammengefasst betrachtet. Außerdem war noch eine Gruppe von Flavonoiden mit ungewöhnlichem Spektrum mit einem maximalen UV-Peak bei 328 nm zu sehen. Alle anderen als Flavonoide erkannte Substanzen wurden ebenfalls als Gruppe subsummiert.

3.3.2 Gesamtflavonoidgehalt

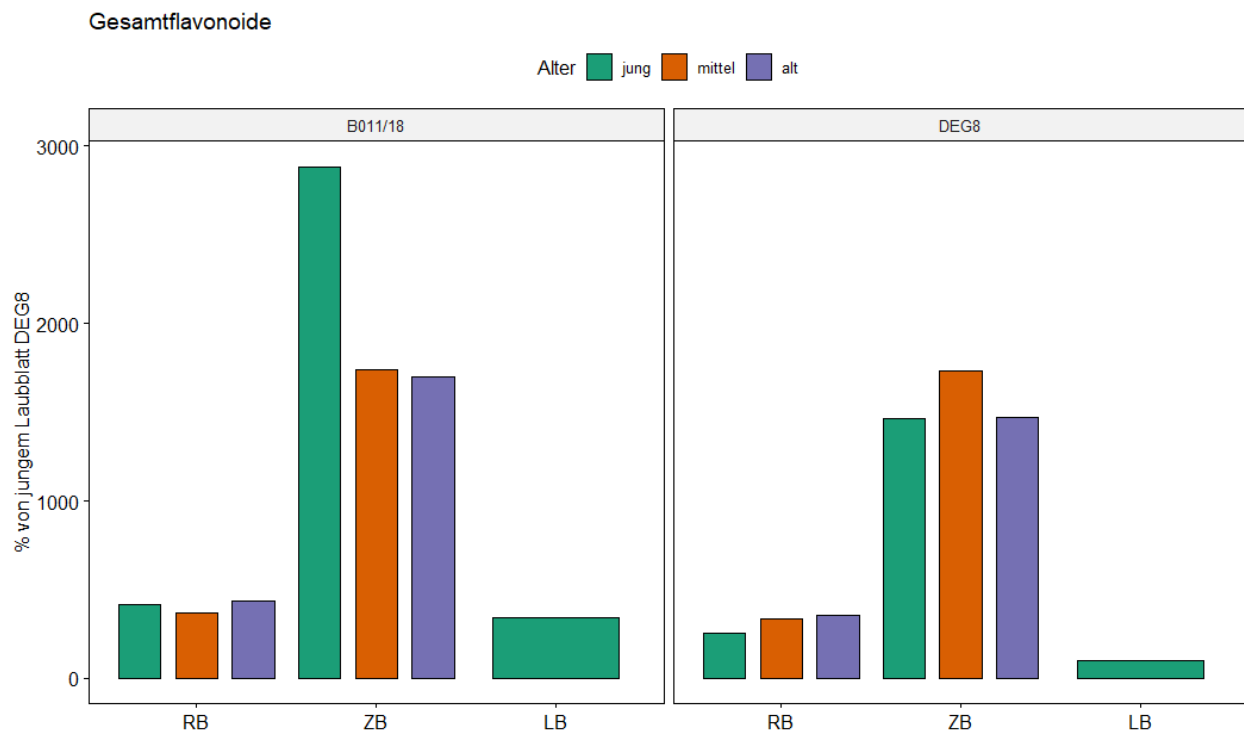


Abb. 33 Gesamtflavonoidgehalte der beiden Individuen und einzelnen Fraktionen in Relation zum jungen Blatt von DEG8 (RB ... Röhrenblüten, ZB ... Zungenblüten, LB ... Laubblätter)

Als Referenzpunkt wurde das Blatt mit der niedrigsten standardisierten Peakfläche gewählt (junges Laubblatt von DEG8). Innerhalb von B08/11 waren die Flavonoide in den Röhrenblüten und im Laubblatt um das etwa 4-fache gegenüber dem DEG8 Blatt erhöht (Abb. 33). Die Flavonoide in den Zungenblüten waren im Mittel um etwa das 21-fache höher.

In der DEG8 waren die Röhrenblüten um etwa das 3-fache, die Zungenblüten um das 15-fache gegenüber dem Blatt erhöht.

3.3.3 Flavongehalt

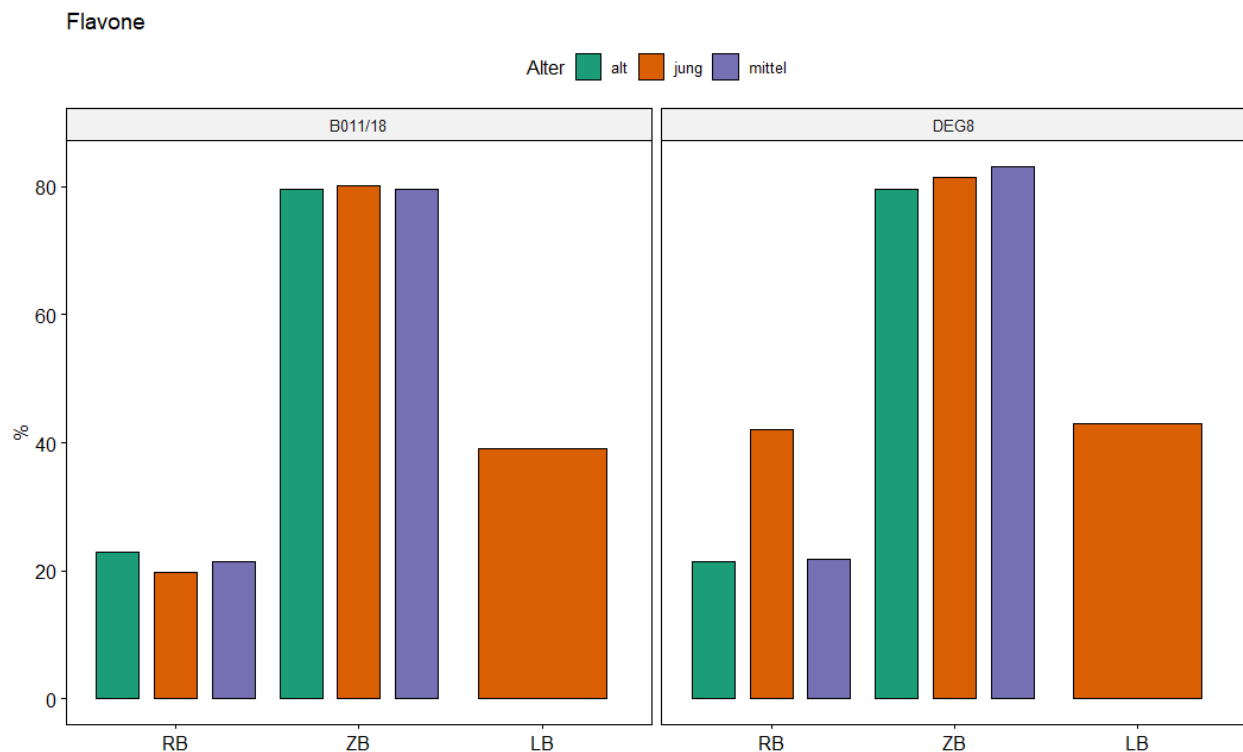


Abb. 34 Flavongehalt der beiden Individuen und einzelnen Fraktionen (RB ... Röhrenblüten, ZB ... Zungenblüten, LB ... Laubblätter)

Die Flavone machten in Bezug auf den Gesamtflavonoidgehalt vor allem in den Zungenblüten den Löwenanteil in der Kamille aus (Abb. 34). Das Muster war, mit Ausnahme des Ausreißers junge Röhrenblüten bei DEG8, bei beiden Genotypen gleich. In den Laubblättern war der Anteil der Flavone an den Gesamtflavonoiden im Mittel bei 47%, der Anteil in den Röhrenblüten mit Ausnahme des Ausreißers (56%) bei ca. 20%.

3.3.4 Gehalt an Apigenin und Apigeninglykosiden

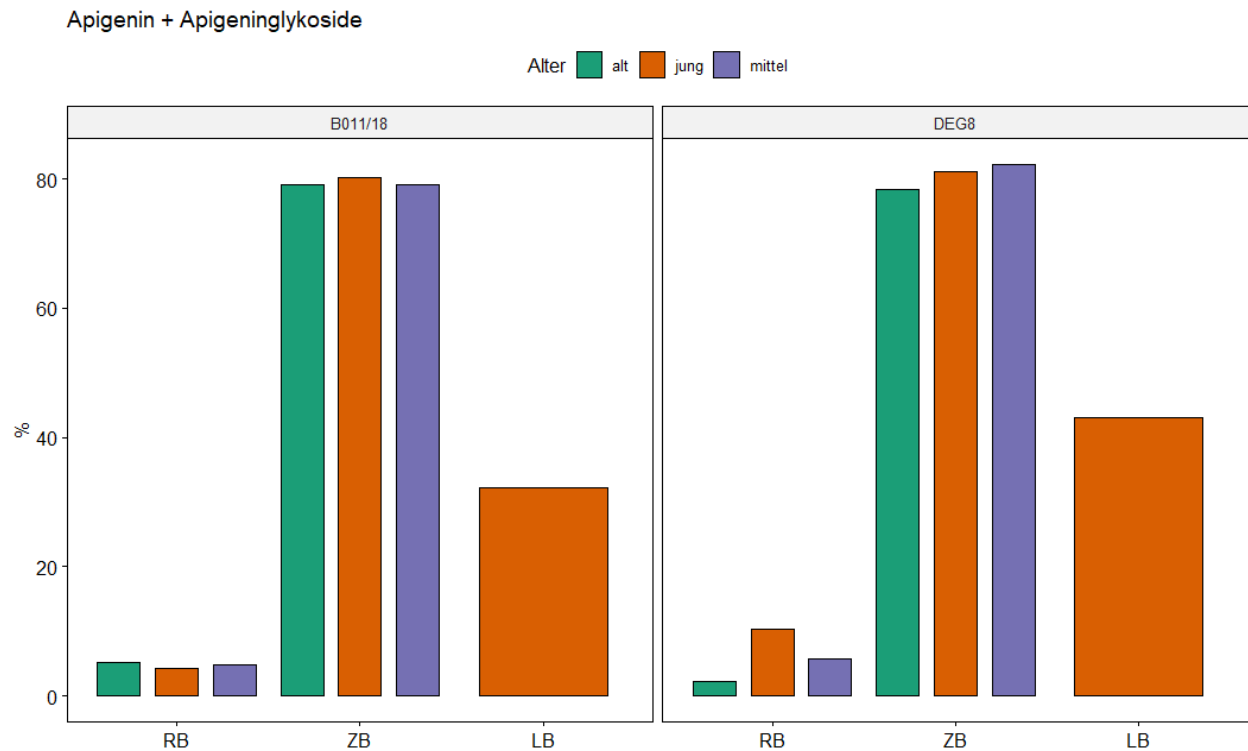


Abb. 35 Gehalt an Apigenin + Apigeninglykoside der beiden Individuen und einzelnen Fraktionen (RB ... Röhrenblüten, ZB ... Zungenblüten, LB ... Laubblätter)

Wiederum gab es zwischen den Genotypen kaum Unterschiede (Abb. 35). Die Apigeninderivate waren in den Zungenblüten zu ca. 80% und in den Laubblättern im Mittel mit 38% vorhanden. In den Röhrenblüten hingegen war der Gehalt mit im Mittel 4,9% sehr niedrig.

3.3.5 Gehalt an Luteolin und Luteolinglykoside

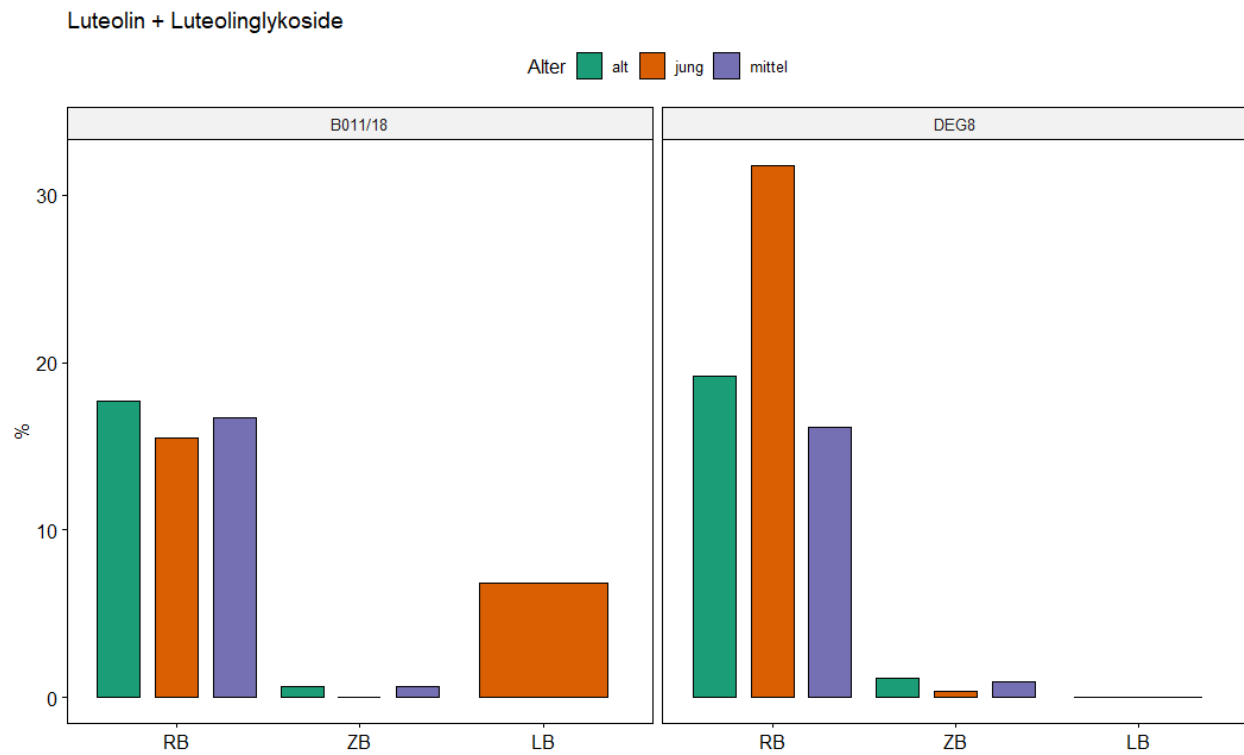


Abb. 36 Gehalt an Luteolin und Luteolinglykoside der beiden Individuen und einzelnen Fraktionen (RB ... Röhrenblüten, ZB ... Zungenblüten, LB ... Laubblätter)

Die Luteolinderivate zeigten zu den Apigeninderivaten ein komplementäres Bild, relativ hohe Mengen in den Röhrenblüten (im Mittel 19,5%) und kaum nennenswerte Mengen in den Zungenblüten (<1%). Interessant war das junge Laubblatt, das bei DEG8 gar keine Luteolinderivate ausbildete, bei B011/18 aber etwa 7%. (Abb. 36)

3.3.6 Flavonoide mit einem UV-Maximum bei 328nm

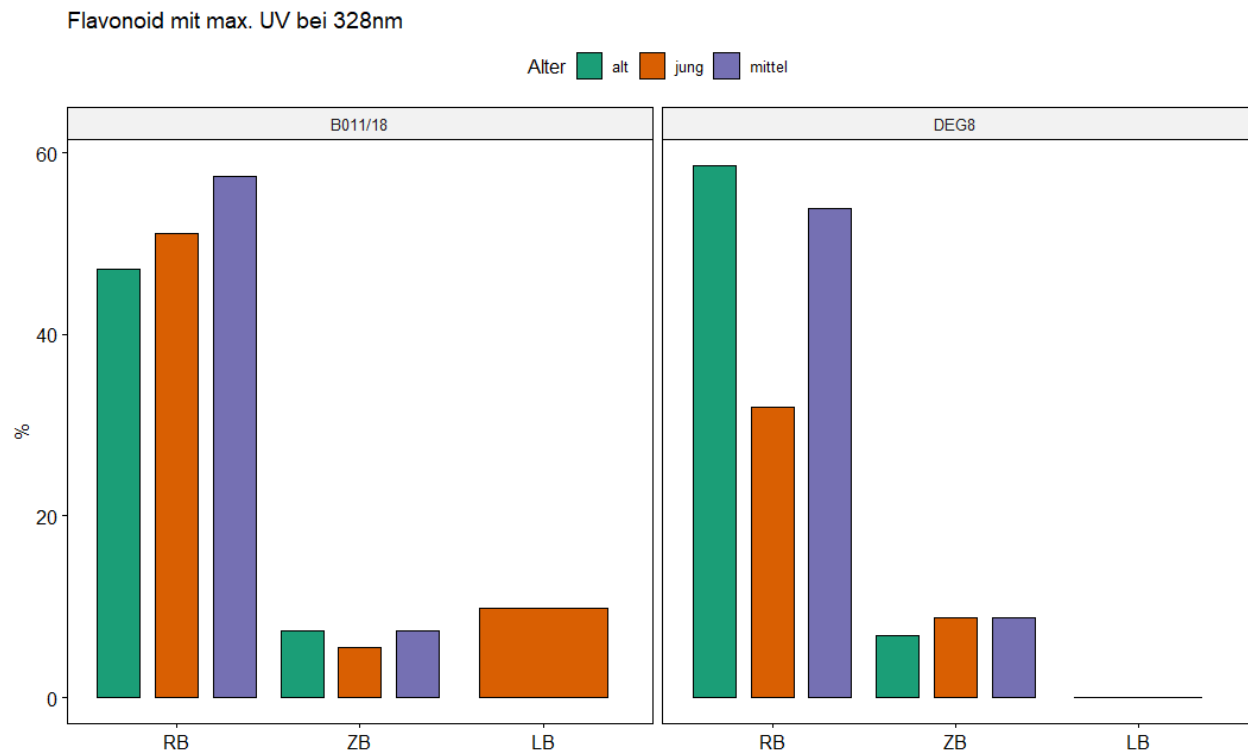


Abb. 37 Flavonoide mit max. UV bei 328nm der beiden Individuen und einzelnen Fraktionen (RB ... Röhrenblüten, ZB ... Zungenblüten, LB ... Laubblätter)

In den Auswertungen der Chromatogramme recht auffällig präsentierten sich drei Peaks mit einem UV-Maximum von 328nm (Abb. 37). Auch nach sorgfältiger Literaturrecherche konnte dieser keinem Flavonoid eindeutig zugeordnet werden. Diese unbekannte Komponente war in B011/18 Röhrenblüten, unabhängig vom Alter mit im Mittel 50% in großen Mengen vorhanden. In den Zungenblüten war der Gehalt dieser Flavonoide mit 8,6% dagegen relativ gering. Im jungen Laubblatt gab es einen sehr großen Unterschied zwischen den Genotypen. Während der Gehalt in B08/11 mit 10% sehr hoch ausfiel, waren in der DEG8 keine Flavonoide dieser Gruppe vorhanden.

3.3.7 Andere Flavonoide

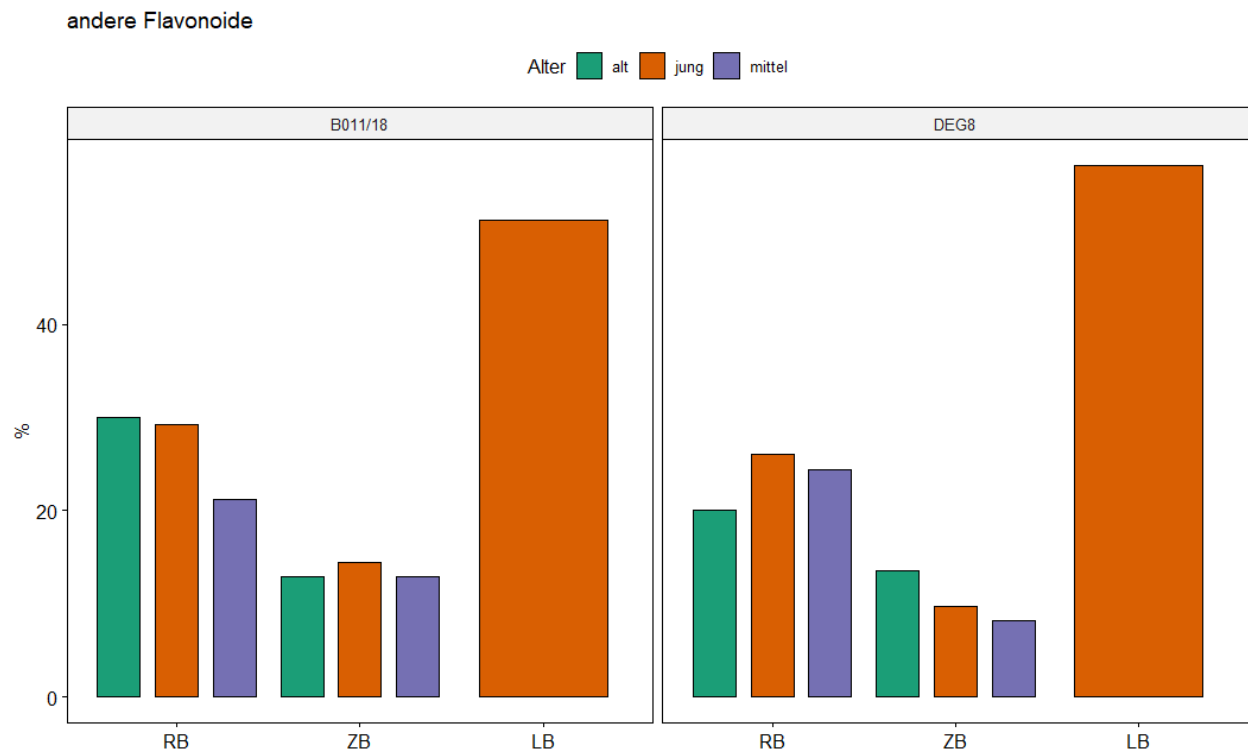


Abb. 38 Nicht gruppierbare Flavonoide der beiden Individuen und einzelnen Fraktionen (RB ... Röhrenblüten, ZB ... Zungenblüten, LB ... Laubblätter)

Auffallend war bei der Gruppierung der nicht zuordenbaren Flavonoide der mit 51% (B08/11) und 57% (DEG8) sehr hohe Anteil im jungen Laubblatt. In den Röhrenblüten lag der Anteil im Mittel bei 25%, in den Zungenblüten bei 12%. (Abb. 38)

3.3.8 PCA-Biplot HPLC Ergebnisse

Auch für die Ergebnisse der HPLC-Analyse wurde ein PCA-Biplot angefertigt. (siehe 3.2.2 Ergebnisdarstellung in PCA-Biplots) Aus dieser Darstellung konnte die Verteilung der einzelnen Glykoside von Apigenin in den beiden Individuen sehr gut herausgelesen werden. Das Individuum BO11/18 enthielt, wie bereits erwähnt, wesentlich mehr an qualitätsbestimmendem Apigenin-7-Glykosid, während die Sorte Degumilla mehr an Apigenin-6-Glykosid und Apigenin-4-Glykosid beinhalten. (Abb. 39 und Abb. 40)

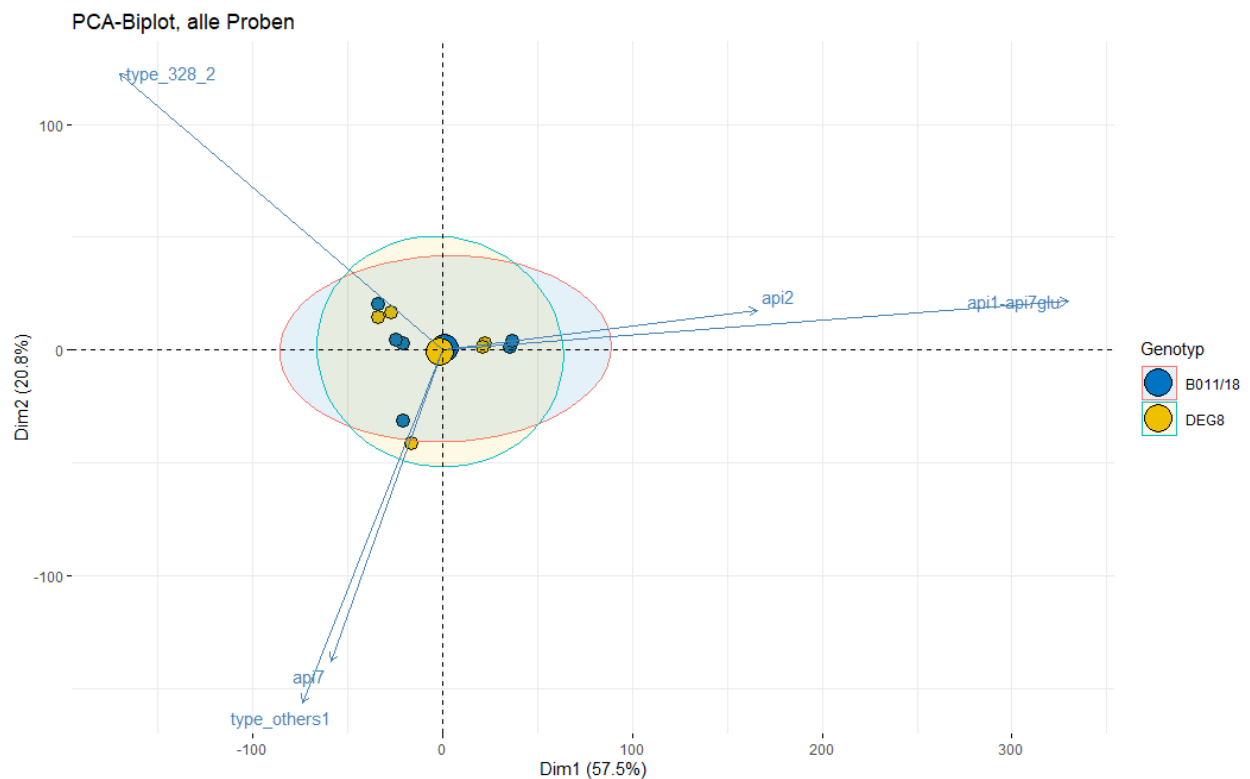


Abb. 39 PCA-Biplot Flavonoide, Farbe nach Genotyp

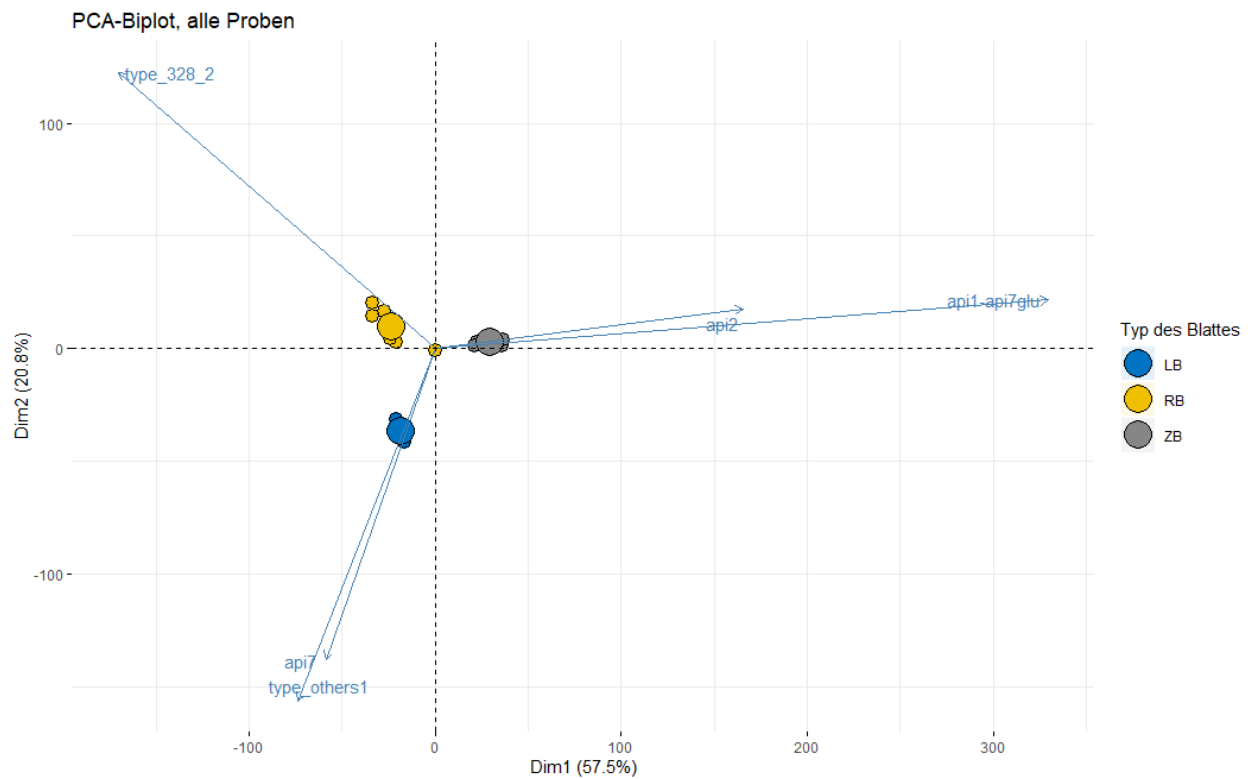


Abb. 40: PCA-Biplot Flavonoide, Farbe nach Typ des Blattes (LB ... junges Laubblatt, RB ... Röhrenblüten, ZB ... Zungenblüten)

3.4 Korrelation der Ergebnisse

Im Folgenden wird versucht, den Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der Genexpression und der chemischen Analytik zu erörtern.

Für die Diskussion dieser folgenden Korrelationen wurden die Ergebnisse der beiden Individuen zusammengefasst und nur zwischen den Blütenteilen unterschieden, da in diesen vor allem die Unterschiede im Flavonoidmuster sehr deutlich zu erkennen waren. Für die Laubblätter wurden keine Korrelationen berechnet, da die Stichprobenzahl ($n = 4$) dafür zu gering war.

3.4.1 Korrelationen der Röhrenblüten

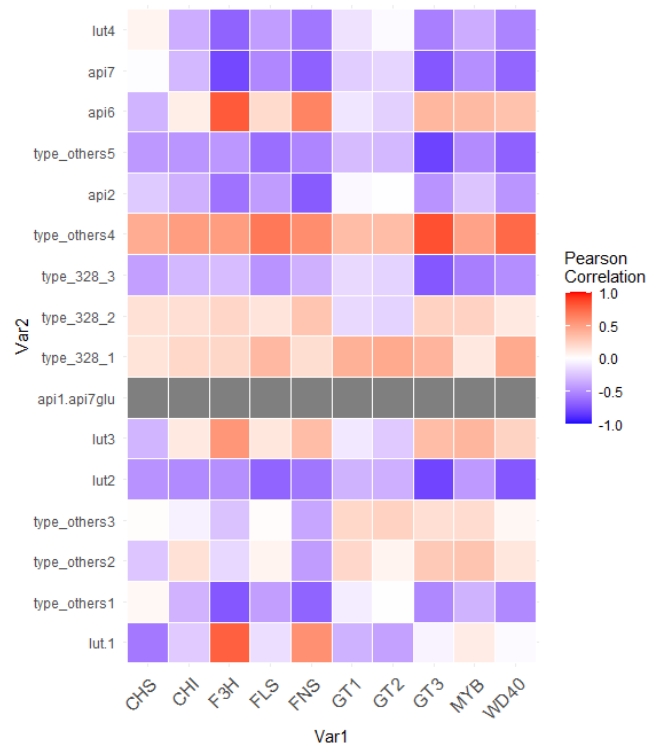


Abb. 41 Heatmap der Korrelationen zwischen den Kandidatengenen (Var1) und den Flavonoiden (Var2) in den Röhrenblüten

CHS und CHI zeigten nur schwache bis mittlere Korrelationen zu den Flavonoiden (Abb. 41). F3H war hoch positiv mit ,lut.1' und ,api6' korreliert, sehr ähnlich den Korrelationen von FNS und den Flavonoiden. Die Kandidaten für Glykosylierungen GT1 und GT2 zeigten keinerlei Auffälligkeiten, während GT3 hoch positiv mit ,type_others4' und stark negativ mit ,lut.2', ,type_328_3', type_others5' und ,api7' korrelierte. Die beiden Transkriptionsfaktoren MYB und WD40 hatten ein ähnliches Muster, wobei aber die Korrelationen von MYB schwächer als für WD40 ausfielen. Das Muster entsprach ziemlich exakt dem von GT3.

3.4.2 Korrelation der Zungenblüten

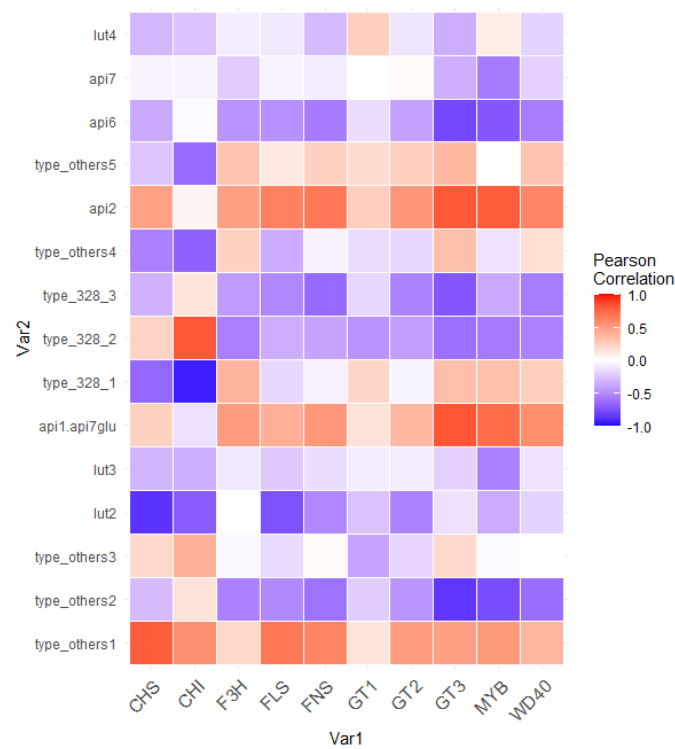


Abb. 42 Heatmap der Korrelationen zwischen den Kandidatengenen (Var1) und den Flavonoiden (Var2) in den Zungenblüten

In den Zungenblüten waren CHS und CHI zwar im Muster ähnlich mit den Flavonoiden korreliert, aber in der Intensität der Korrelation doch deutlich unterscheidbar (Abb. 42). CHS korrelierte stark positiv mit ,type_others1', während CHS sehr stark positiv mit ,type_328_2' korrelierte. Die drei nachfolgenden Gene F3H, FLS und FNS bildeten wiederum einen Block ähnlicher Korrelationen mit leicht unterschiedlichen Intensitäten. GT1 und GT2 waren sich ebenfalls ähnlich im Muster, aber sehr unterschiedlich in ihrer Intensität. GT3, MYB und WD40 bildeten – wie schon bei den Röhrenblüten einen gemeinsamen Block mit stark positiver Korrelation zu den beiden Apigeninderivaten ,api1.api7glu' und api2'.

4 Diskussion

Diese Arbeit gibt einen ersten Einblick in die Synthese von Flavonoiden in der Kamille (*Matricaria chamomilla*). Die Schlüsselenzyme für die Produktion dieser sekundären Pflanzenstoffe werden in unterschiedlichem Ausmaß, abhängig von Individuum, Pflanzenteil und Blütenalter, von der Pflanze produziert. In der folgenden Diskussion werden die wichtigsten Erkenntnisse zur Expression dieser Gene und der damit verbundene tatsächliche Flavonoidgehalt in Einklang gebracht. Weiters werden verschiedene Thesen aufgestellt, die mithilfe von gefundener Literatur untermauert und begründet werden. Probleme, die sich im Rahmen dieser Masterarbeit ergeben haben werden beleuchtet und in weiterer Folge Lösungsansätze erarbeitet. Zuletzt wird noch auf mögliche weiterführende Forschung, welche sich aus diesen Ergebnissen aufzwingt, eingegangen.

Die Sortenunterschiede sind nicht nur hinsichtlich der Genexpression, sondern auch in der Menge und Art der enthaltenen Flavonoide eklatant. Die Proben des Individuums BO11/18 enthalten vor allem im Hinblick auf die Blätter eine wesentlich höhere Genexpression der Schlüsselenzyme und demnach auch mehr Flavonoide. Generell präsentieren sich die gewonnenen Erkenntnisse aus diesem Individuum eindeutiger, als in DEG8.

Eine Literaturrecherche zum Thema Flavonoide ergab, dass bei der Untersuchung von Flavonoiden in der Königs-kerze (*Verbascum plomoides*) folgende Ergebnisse erzielt werden konnten: In der Entwicklung der Blüte steigt der Flavonoidgehalt, während in der Blütezeit zwar Schwankungen zwischen den Pflanzen auftraten, die Flavonoidmenge aber keiner signifikanten Ab- oder Zunahme unterlagen.³⁶ Für die hier untersuchte Kamille ergibt sich ein differentes Bild. Die Blüten enthalten im jungen Blütestadium, vor allem in Bezug auf Apigenin, erheblich mehr Flavone. Die Menge ändert sich danach im mittleren und alten Stadium aber nicht nennenswert. Ein Jung-Alt-Gefälle kann zwar bei der Genexpression beobachtet werden, was den Rückschluss zulässt, dass die Kamille im Laufe ihres Reifezyklus die Synthese der Flavonoide stark einzuschränken scheint, diese aber nicht abgebaut werden.

Die Verteilung der Flavonoide in den einzelnen Pflanzenteilen, ist schon mehrfach untersucht und belegt worden. Die durch diese Arbeit erhaltenen Ergebnisse in der Flavonoidmenge decken sich restlos mit den in der Literatur zu findenden Angaben. Den Gutteil der Flavonoide in der Kamille machen Flavone aus, allen voran das Apigenin und das Luteolin und die zugehörigen Glykoside. Das zentrale Flavonoid Apigenin und dessen Glykoside sind vorrangig in Zungenblüten enthalten, während sich der Gehalt in den Röhrenblüten als verschwindend gering erweist. Für Luteolin ergibt sich folgendes Muster: Die gefundene Menge ist im Vergleich zwar nichtig, aber dennoch vorhanden und im Muster, dem des in der Literatur nachzulesendem, gleich. Der Gehalt ist in Röhrenblüten und Blättern höher als in Zungenblüten, aber in jedem Pflanzenorgan nachzuweisen.¹⁷

Eine eindeutige Korrelation lässt der Syntheseweg für die Flavone inklusive der Schlüsselenzyme Chalconsynthase, Chalconisomerase und Flavonsynthase mit der Menge an gefundenem Apigenin zu. Die für die Produktion

dieses sekundären Pflanzenstoffes erforderlichen Enzyme sind in den jungen Zungenblüten rigoros hoch exprimiert, ein Bild welches sich auch in der Apigeninverteilung der Zungenblüten widerspiegelt. Diese Beobachtungen sind vor allem im Individuum BO11/18 von nennenswertem Charakter.

Die gewonnenen Ergebnisse lassen Vermutungen über die Verzuckerung der Flavonoide in der Kamille zu. Die drei untersuchten Glycosyltransferasen zeigen in GT1 und GT2 ein recht ähnliches Genexpressionsverhalten. Vor allem in den Röhrenblüten scheinen diese beiden mitverantwortlich für eine Verzuckerung zu sein. Im Fall von Glycosyltransferase 3 kann eine eindeutige Mitbeteiligung in allen Pflanzenorganen bei der Verzuckerung festgestellt werden. Dieses Enzym zeigt in DEG8 einen signifikanten Jung-Alt-Anstieg, was die Annahme zulässt, dass eine Verzuckerung der Flavonoide in diesem Individuum erst später passiert. Aufgrund der Ergebnisse kann man vermuten, dass alle drei Glycosyltransferasen an der Flavonoidbiosynthese beteiligt sein dürften. Allerdings steht dazu aber ein direkter Nachweis noch aus.

Das gefundene Flavonoid bei 328nm lässt einige Fragen offen. Auch nach intensiver Literaturrecherche konnte diesem Peak kein eindeutiges Flavonoid zugeordnet werden. Die Überlegungen dazu gingen erst in Richtung Quercetin oder Patuletin, welche sich aber beide in anderen Retentionszeiten äußern würden.¹⁶ Schlussendlich wurde die Suche nach dieser Verbindung aufgegeben, weitere Untersuchungen würden den Rahmen dieser Arbeit überziehen.

Diese Arbeit untersucht zwei verschiedene Transkriptionsfaktoren MYB und WD40. Sie bilden zwei der wichtigsten Transkriptionsfaktorfamilien in höheren Pflanzen und regulieren die gesamte Genexpression der Synthese zahlreicher Pflanzenstoffe. Ihre Rolle in der Regulation der Flavonoidsynthese wurde bereits untersucht. Sie können sowohl repressorische, als auch aktivierende Funktionen übernehmen.^{37,38} Genau diese repressorische, also hemmende Wirkung auf die Flavonoidsynthese kann in den Experimenten beobachtet werden. Die Expression von MYB ist in beiden Individuen in den alten Pflanzenteilen am höchsten, was eine Transkriptionsrepression der Schlüsselenzyme impliziert. Für WD40 ist im Individuum DEG8 ein simultanes Verhalten zu beobachten, während in BO11/18 ein Jung-Alt-Gefälle herrscht. Auch hier ist somit wieder eine starke Sortendiversität zu beobachten. In BO11/18 nimmt WD40 eine aktivierende Funktion auf die Genexpression ein.

Im Rahmen dieser Arbeit sind einige Probleme aufgetreten, welche im Folgenden ausgearbeitet werden sollen. Allen voran ist zu nennen, dass einige genommene Proben auch nach mehrmaliger Beprobung leider keine ordentlich schlüssigen Ergebnisse liefern konnten. Hier ist vor allem die Probe der jungen Blütenköpfe im Individuum DEG8 anzuführen. Diese wurde gesamt drei Mal beprobt und untersucht. Obwohl die Menge an enthaltener RNA erfolgversprechende Ergebnisse in Aussicht stellte, konnten die qPCR-Läufe nicht zu 100% überzeugen. Möglich ist auch, dass die teilweise widersprüchlichen Daten ausschließlich auf die starke Sortendifferenz zurückzuführen sind. Eine nochmalige Beprobung und Untersuchung hätte aber einen deutlichen Mehraufwand mit sich gezogen. Ein weiterer Punkt dagegen war, dass die für diese Arbeit verwendeten Kamillepflanzen nach

den Wochen der qPCR-Läufe am Zenit ihrer Lebensdauer angelangt waren. Für eine angemessene Ergebnisdarstellung bzw. eine Auswertung reichten dennoch die Proben des Individuums BO11/18 und die restlichen Altersstadien und Pflanzenteile von DEG8 aus.

Dieser Punkt bringt uns zu der nächsten Herausforderung, die diese Masterarbeit mit sich bringt. Die Sortenunterschiede sind gravierend, was die Auswertung erheblich erschwert. Solch eine Sortendiversität ist auch in der Literatur nachzulesen. Demnach spielen Faktoren, wie Anbaugebiet, dort herrschende Klimabedingungen und die Art des Anbaus eine zentrale Rolle.¹⁷ Die für diese Arbeit beprobten Individuen DEG8 und BO11/18 wurden für diese Experimente zwar simultan im Glashaus gezogen, es ist dennoch von sehr starken genetischen Unterschieden auszugehen.

Für eine Ergebnisauswertung von qPCR-Daten wird in der Regel die Delta Delta Ct Methode herangezogen. Die erhaltenen Daten werden auf einen Standard, zum Beispiel ein housekeeping Gen, normalisiert. Danach findet eine weitere Normalisierung auf ein anderes Gen statt, um noch mehr Informationen bzw. Klarheit in den Ergebnissen zu gewinnen.³⁰ Für die Daten dieses Projektes wurden die Werte im ersten Schritt auf das housekeeping Gen 26SrRNA normalisiert und im Anschluss eine nochmalige Normalisierung auf die Proben der Blätter versucht. Leider ergab diese Methodik keine brauchbaren Ergebnisse, da es zwischen den Organen so eklatante Unterschiede gab, dass sich kein Organ als echte Referenz angeboten hätte. Folgedessen war es sinnvoll die Delta Ct Methode als optimales Vorgehen zu wählen.

Diese Arbeit eröffnet viele Möglichkeiten für weitere Forschungsarbeit. Ein möglicher Ansatz ist die Untersuchung von noch mehr Individuen, um die festgestellte Sortendiversität noch weiter zu investigieren. Von besonderem Interesse dahingehend ist auch, in welcher Form eventuell Kreuzungen stattgefunden haben, die diese Individuenunterschiede möglicherweise erklären würden. Die Untersuchung von anderen Pflanzen der Korbblütler oder ein direkter Vergleich mit anderen Pflanzenfamilien bietet eine weitere Option für weiterführende Forschung.

Die Flavonoidsynthese in Pflanzen ist zwar weitestgehend gut bekannt, bezüglich ihrer Regulation sind dennoch einige Fragen offen, die es noch zu beantworten gilt. Eine investigative Forschung in diese Richtung wird häufig durch die Probleme der Pflanzenzüchtung limitiert.³⁷ Es gilt hier noch weiter zu forschen, um die Genexpression und ihre Kontrolle durch Transkriptionsfaktoren vollends zu verstehen.

In Anbetracht der gewonnenen Erkenntnisse aus der durchgeführten Chromatographie, wäre es sinnvoll die gefundenen Flavonoide zweifelsfrei mithilfe einer Massenspektrometrie zu identifizieren. Diese Methodik würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen, wäre aber durchaus von großem Interesse, um auch das gefundene unbekannte Flavonoid zu identifizieren. Außerdem würde das die Möglichkeit bieten, weitere Eindrücke über die Verteilung der sekundären Pflanzenstoffe in den einzelnen Pflanzenorganen in unterschiedlichen Altersstadien zu gewinnen.

Eine weitere Untersuchung der Enzymaktivität der für die Flavonoidsynthese wichtigen Schlüsselenzyme wurde laut Literatur bereits in der Rose oder der Kartoffelpflanze versucht.³⁹ Solche Enzymtests wären auch für die Ergebnisse dieser Masterarbeit eine wertvolle Ergänzung. Außerdem wurden alle HPLC-Experimente mit getrocknetem Pflanzenmaterial durchgeführt. Um weitere Daten zu sammeln und diese mit den gewonnen vergleichen zu können, würde eine Durchführung der Chromatographie mit frischem Pflanzenmaterial in jedem Fall Sinn machen.

CONTROL REACTIONS

Positive and negative control reactions should be used to verify the results of the first strand cDNA synthesis steps.

- **Reverse transcriptase minus (RT-) negative control** is important in RT-PCR or RT-qPCR reactions to assess for genomic DNA contamination of the RNA sample. The control RT- reaction contains every reagent for the reverse transcription reaction except for the RT enzyme.
- **No template negative control (NTC)** is important to assess for reagent contamination. The NTC reaction contains every reagent for the reverse transcription reaction except for RNA template.
- **Positive control** RNA template and gene-specific primers are supplied with the kit. The human GAPDH control RNA (1.3 kb) was produced by *in vitro* transcription. The GAPDH-specific control PCR primers are designed to be complementary to human, mouse and rat GAPDH genes and generate 496 bp RT-PCR product. The protocol for the positive control RT-PCR is provided below.

I. Control first strand cDNA synthesis reaction

Mix and briefly centrifuge all components after thawing, keep on ice.

1. Add the following reagents into a sterile, nuclease-free tube on ice in the indicated order:

Control GAPDH RNA (50 ng/μL)	2 μL
Oligo (dT) ₁₈ Primer	1 μL
or Random Hexamer Primer	1 μL
or Reverse GAPDH Primer	1 μL
5X Reaction Buffer	4 μL
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/μL)	1 μL
10 mM dNTP Mix	2 μL
RevertAid RT (200 U/μL)	1 μL
Water, nuclease-free	9 μL
Total volume	20 μL

2. Mix gently and centrifuge.
3. For oligo(dT)₁₈ or gene-specific primed cDNA synthesis, incubate for 60 min at 42°C.
For random hexamer primed synthesis, incubate for 5 min at 25°C followed by 60 min at 42°C.
4. Terminate the reaction by heating at 70°C for 5 min.
5. Briefly centrifuge and proceed with control PCR amplification.

TROUBLESHOOTING

Low yield or no RT-PCR product
Degraded RNA template. RNA purity and integrity is essential for synthesis of full-length cDNA. Always assess the integrity of RNA prior to cDNA synthesis. Sharp 18S and 28S RNA bands should be visible after denaturing agarose gel electrophoresis of total eukaryotic RNA. Follow general recommendations to avoid RNase contamination. Low template purity. Trace amounts of agents used in RNA purification protocols may remain in solution and inhibit first strand synthesis, e.g. SDS, EDTA, guanidine salts, phosphate, pyrophosphate, polyamines, spermidine. To remove trace contaminants, re-precipitate the RNA with ethanol and wash the pellet with 75% ethanol. Insufficient template quantity. Increase the amount of template to the recommended level. Following DNase I treatment, terminate the reaction by heat inactivation in the presence of EDTA (to bind magnesium ions). RNA hydrolyzes during heating in the absence of a chelating agent (1). Incorrect primer choice. Use the correct primer for the RNA template. Use the random hexamer primer instead of the oligo(dT)₁₈ primer with bacterial RNA or RNA without a poly(A) tail. Ensure sequence-specific primers are complementary to 3'-end of the template RNA. GC rich template. If the RNA template is GC rich or is known to contain secondary structures, increase the temperature of the reverse transcription reaction up to 45°C.
RT-PCR product longer than expected
RNA template is contaminated with DNA. Amplification of genomic DNA containing introns. Perform DNase I digestion prior reverse transcription. To avoid amplification of genomic DNA, design PCR primers on exon-intron boundaries. RT-PCR product in negative control RNA template is contaminated with DNA. PCR product in the negative control (RT-) indicates the reaction is contaminated with DNA. Perform DNase I digestion prior reverse transcription.

PRODUCT USE LIMITATION

This product is developed, designed and sold exclusively for research purposes and *in vitro* use only. The product was not tested for use in diagnostics or for drug development, nor is it suitable for administration to humans or animals. Please refer to www.thermoscientific.com/bioaba for Material Safety Data Sheet of the product.

© 2013 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries.

5. 2 Ausgewählte Beispiele grafische Darstellung Genexpressionsanalyse

5.2.1 Chalkonisomerase (2 CHI)

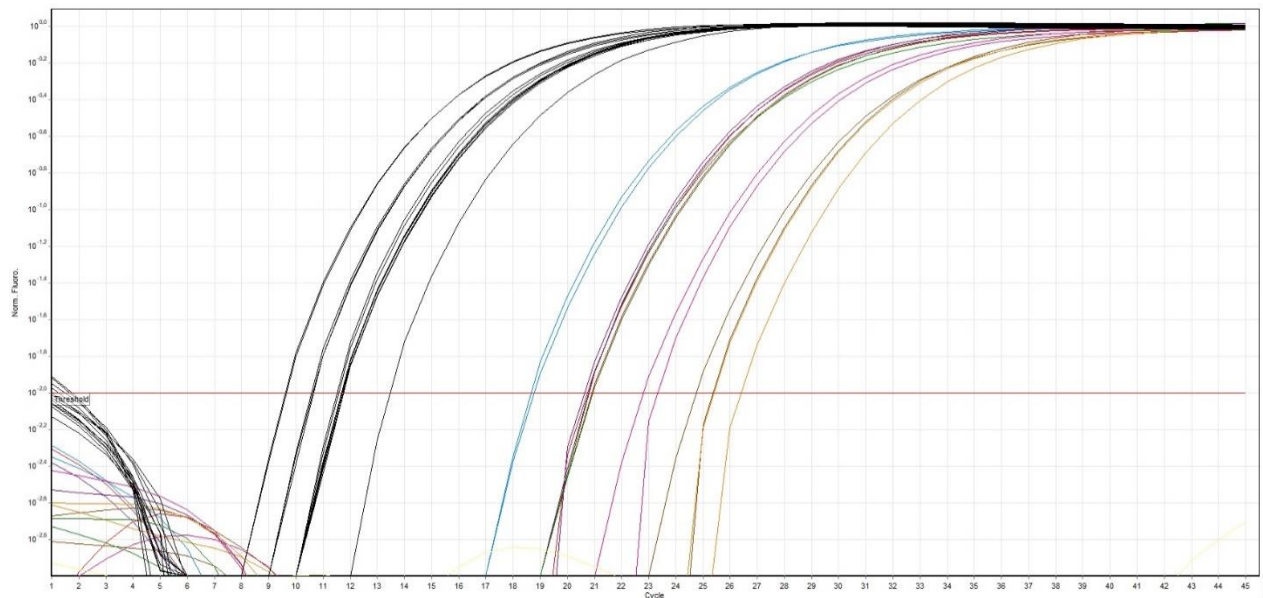


Abb. 45 Enzym 2 DEG8 qPCR log

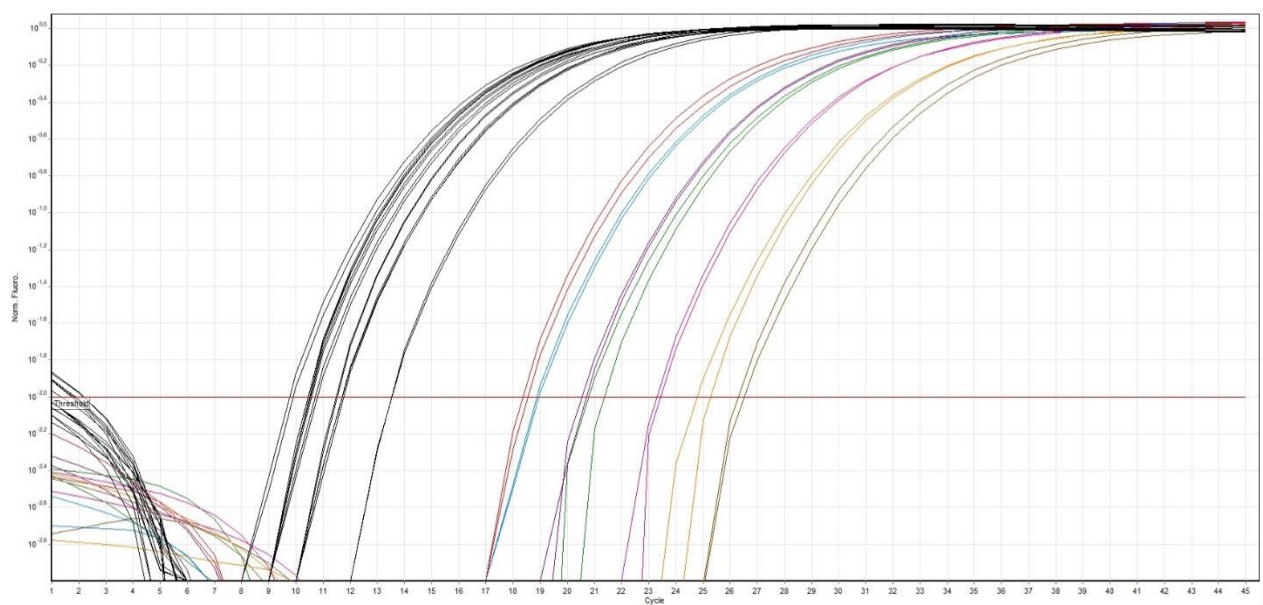


Abb. 46 Enzym 2 BO11/18 qPCR log

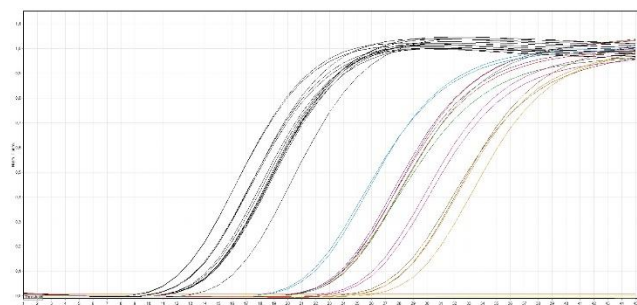


Abb. 47 Enzym 2 DEG8 linear

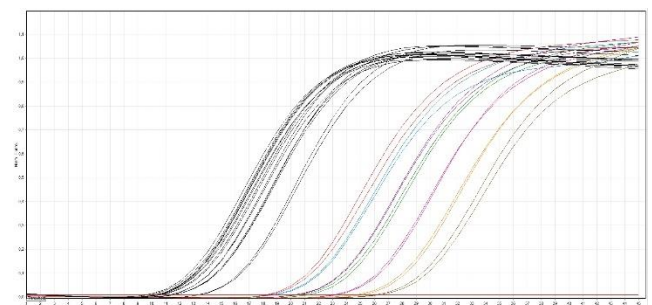


Abb. 48 Enzym 2 BO 11/18 qPCR linear

5.2.2 Flavanon-3-Hydroxylase (3F3H)

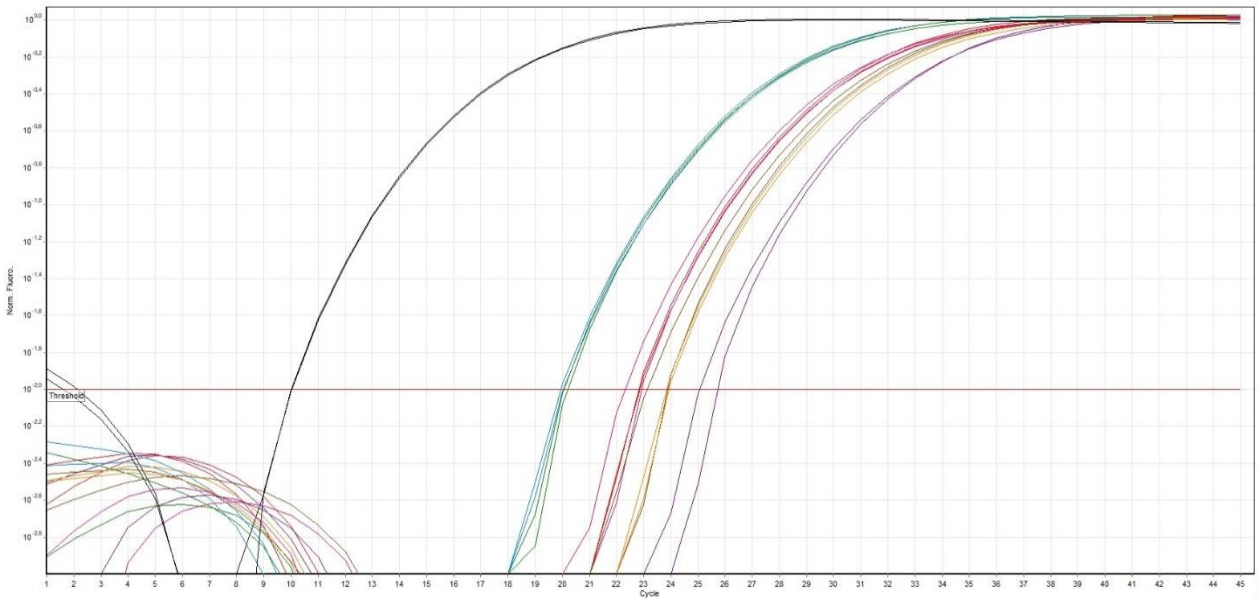


Abb. 49 Enzym 3 DEG8 qPCR log

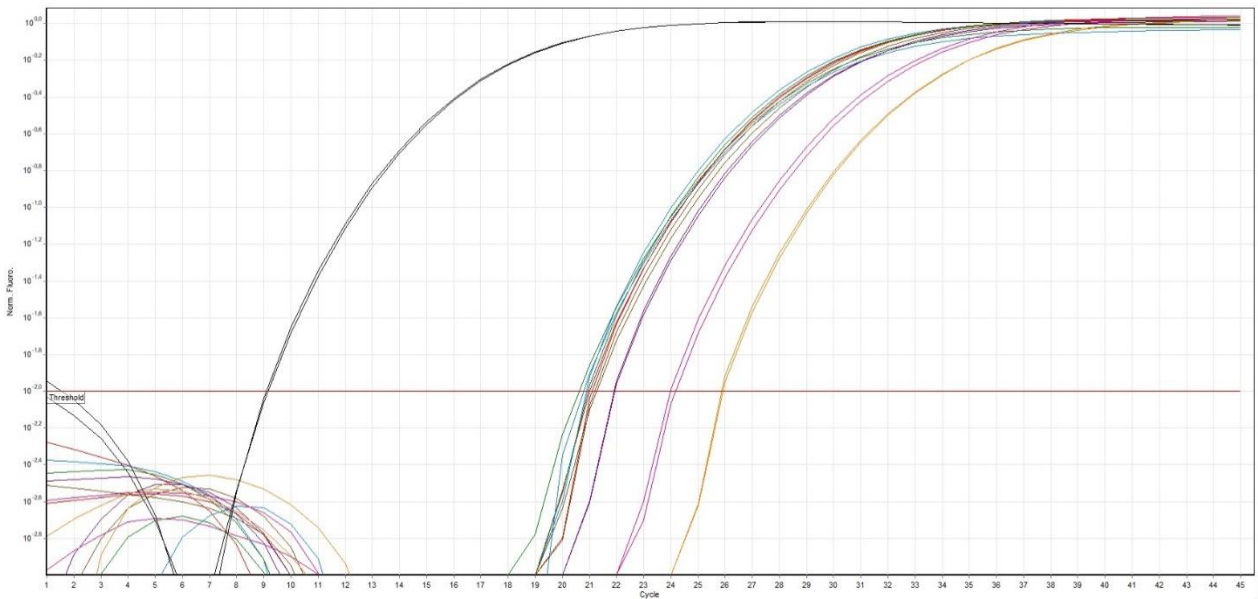


Abb. 50 Enzym 3 BO11/18 qPCR log

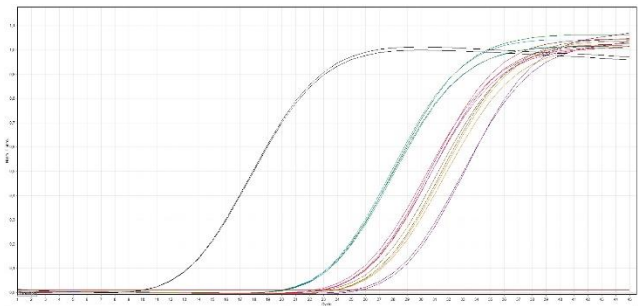


Abb. 51 Enzym 3 DEG8 qPCR linear

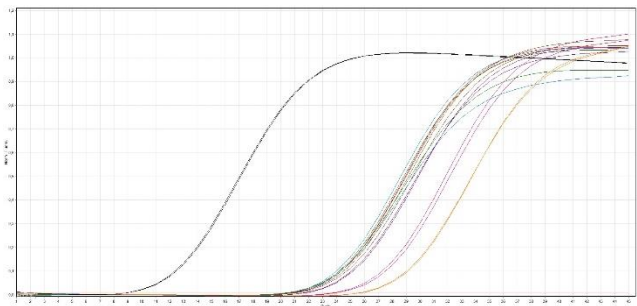


Abb. 52 Enzym 3 BO11/18 qPCR linear

5.2.3 Flavonolsynthase (4FLS)

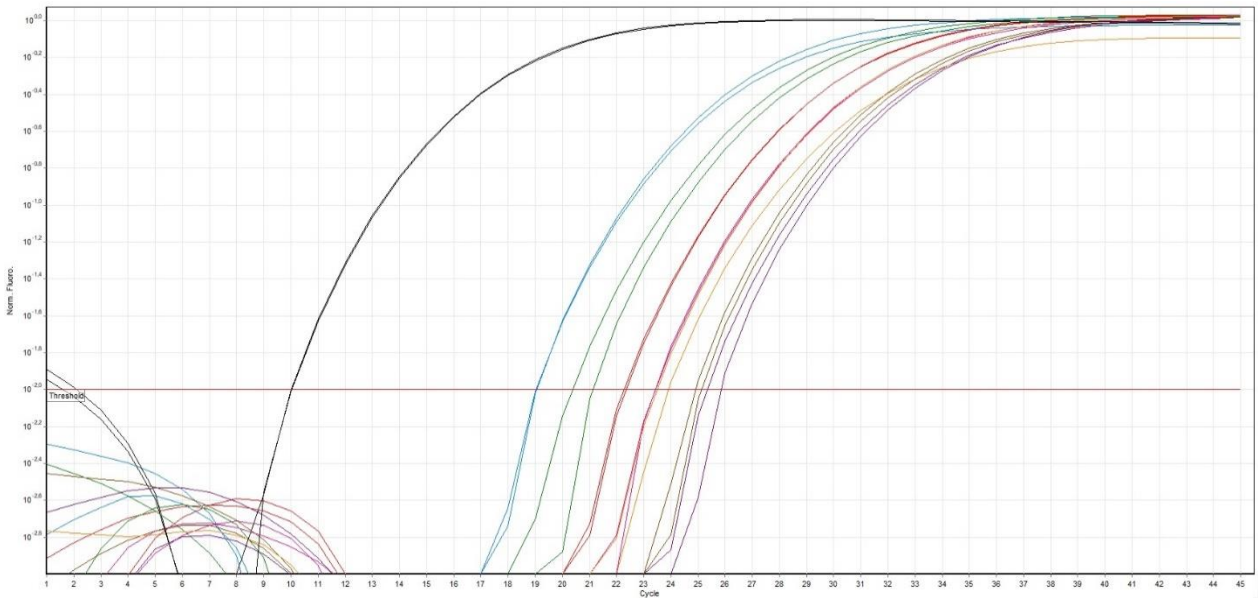


Abb. 53 Enzym 4 DEG8 qPCR log

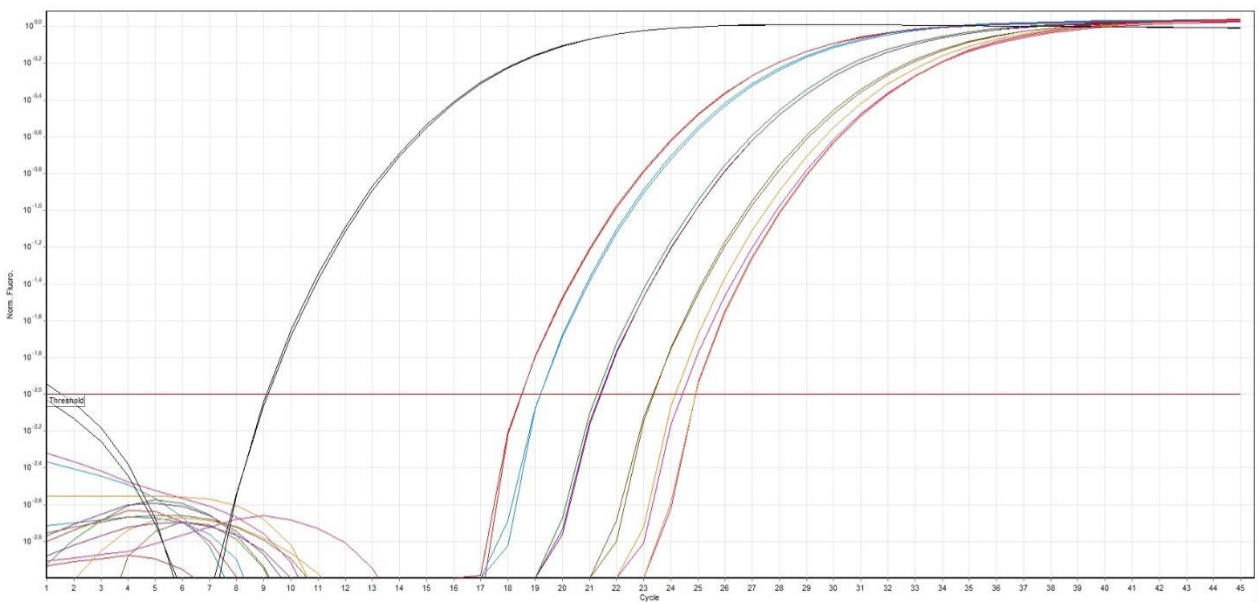


Abb. 54 Enzym 4 BO11/18 qPCR log

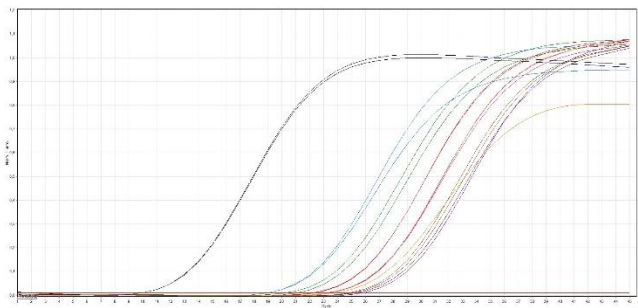


Abb. 55 Enzym 4 DEG8 qPCR linear

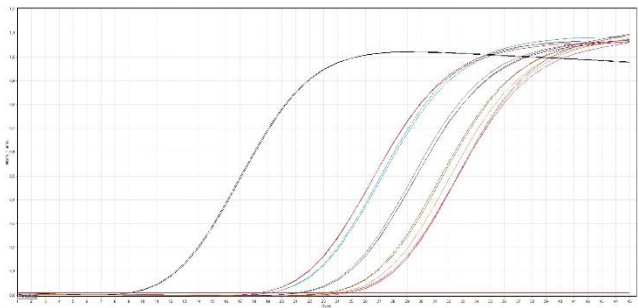


Abb. 56 Enzym 4 BO11/18 qPCR linear

5.2.4 Flavonsynthase (5 FNS I + II)

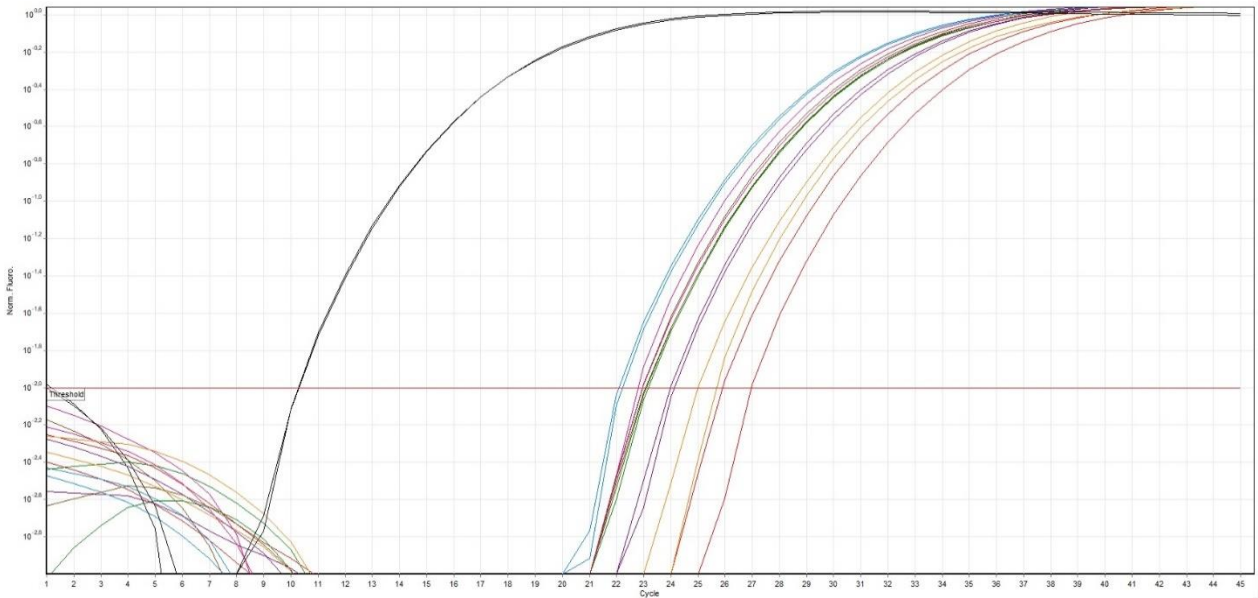


Abb. 57 Enzym 5 DEG8 qPCR log

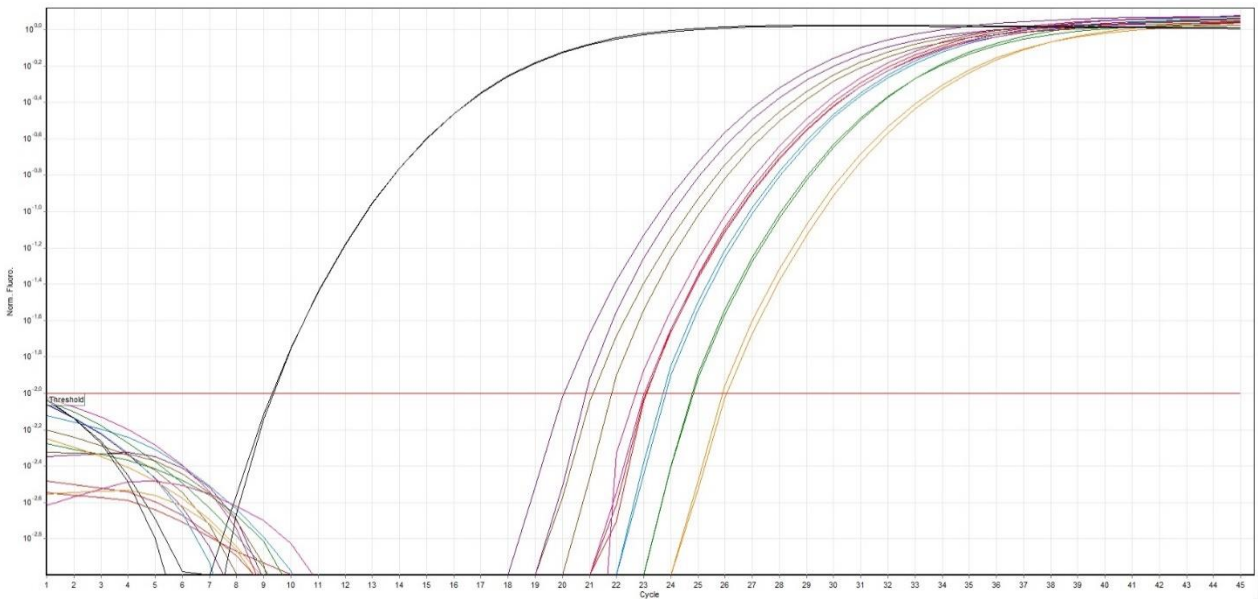


Abb. 58 Enzym 5 BO11/18 qPCR log

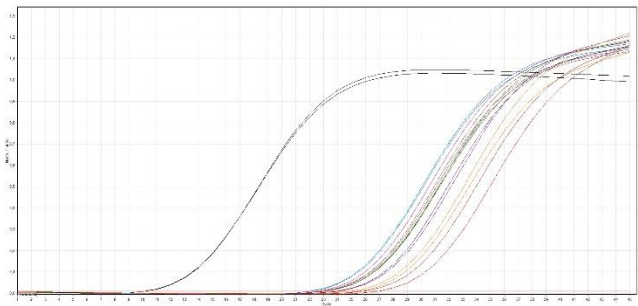


Abb. 59 Enzym 5 DEG8 qPCR linear

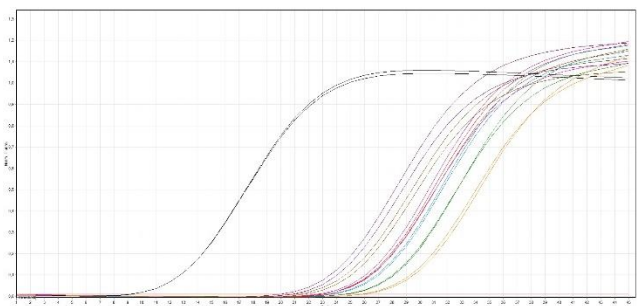


Abb. 60 Enzym 5 BO11/18 qPCR linear

5.2.5 Glycosyltransferase 3 (8 GT3)

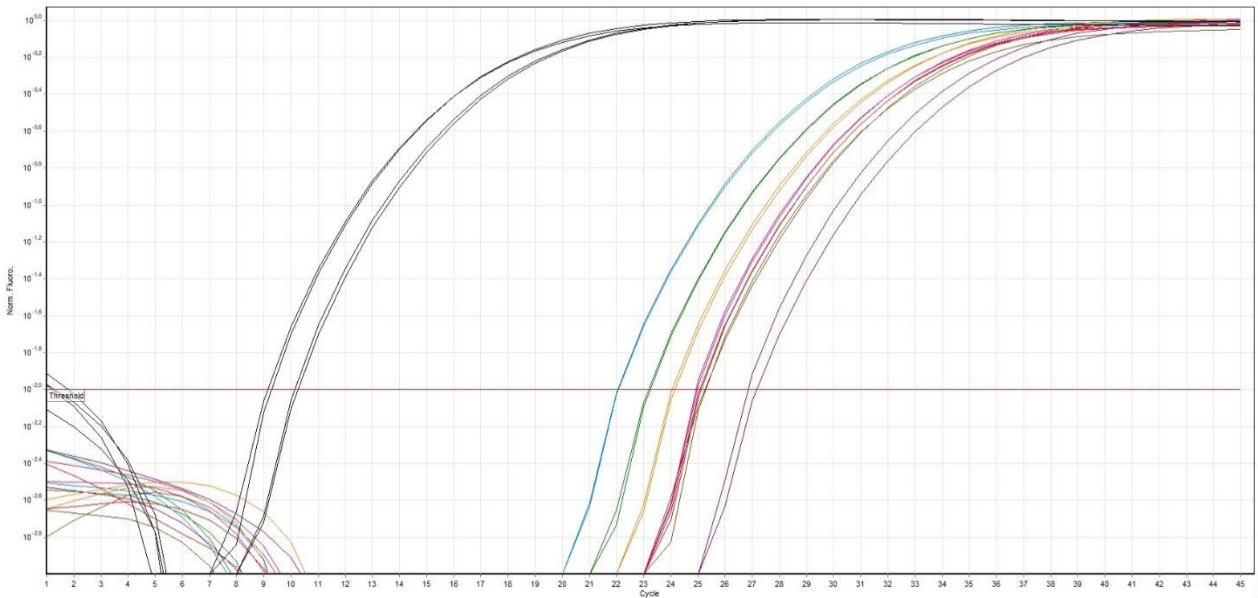


Abb. 61 Enzym 8 DEG8 qPCR log

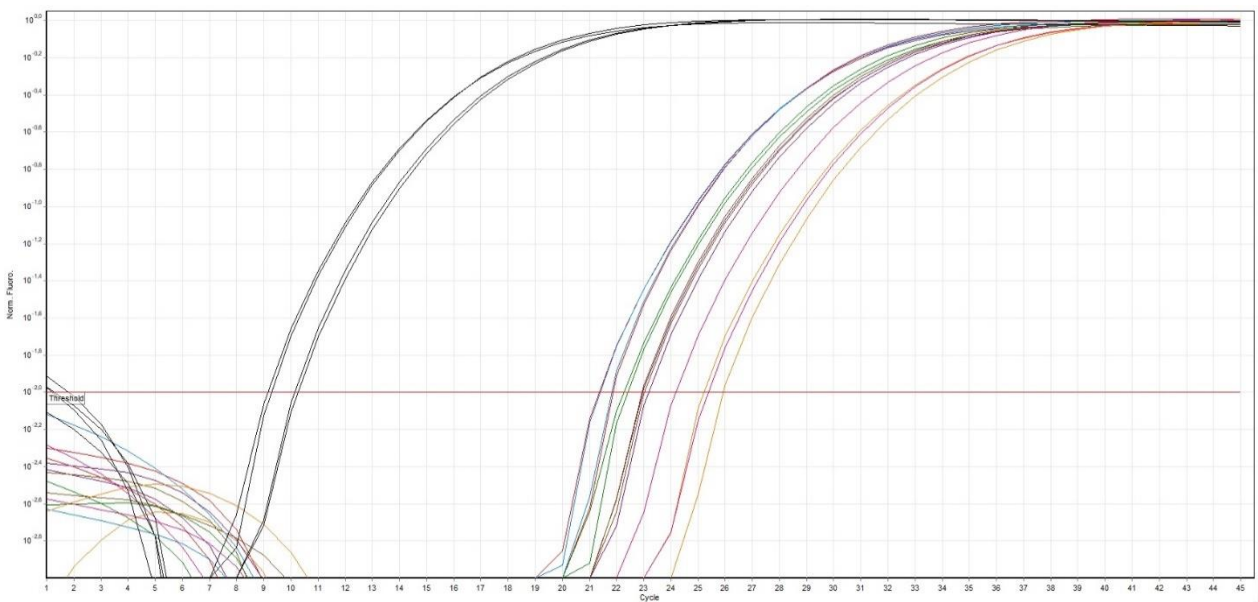


Abb. 62 Enzym 8 BO11/18 qPCR log

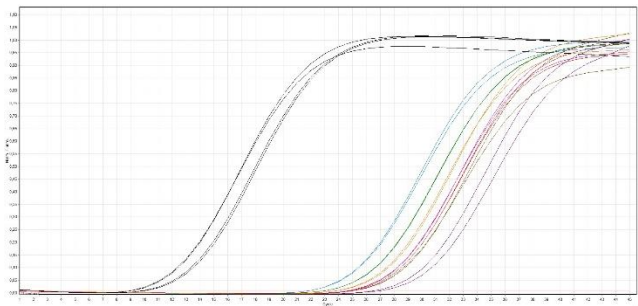


Abb. 63 Enzym 8 DEG8 qPCR linear

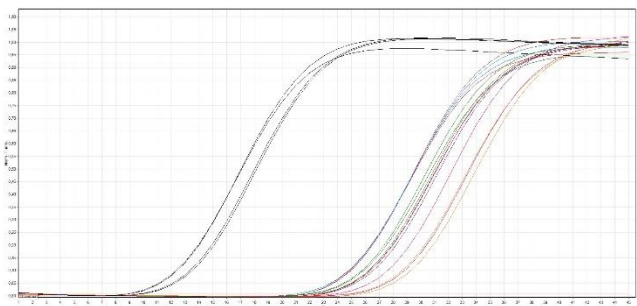


Abb. 64 Enzym 8 BO11/18 qPCR linear

5.3 Ergebnisse qPCR Effizienzbestimmungen

5.3.1 qPCR Effizienz Chalconsynthase (1CHS)

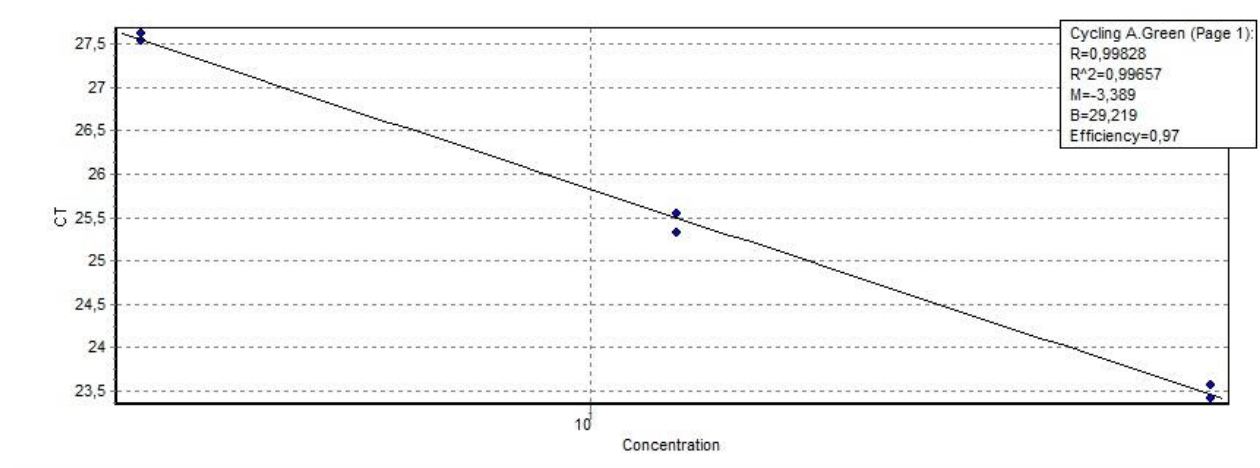


Abb. 65 Enzym 1 DEG8 BK qPCR Effizienz

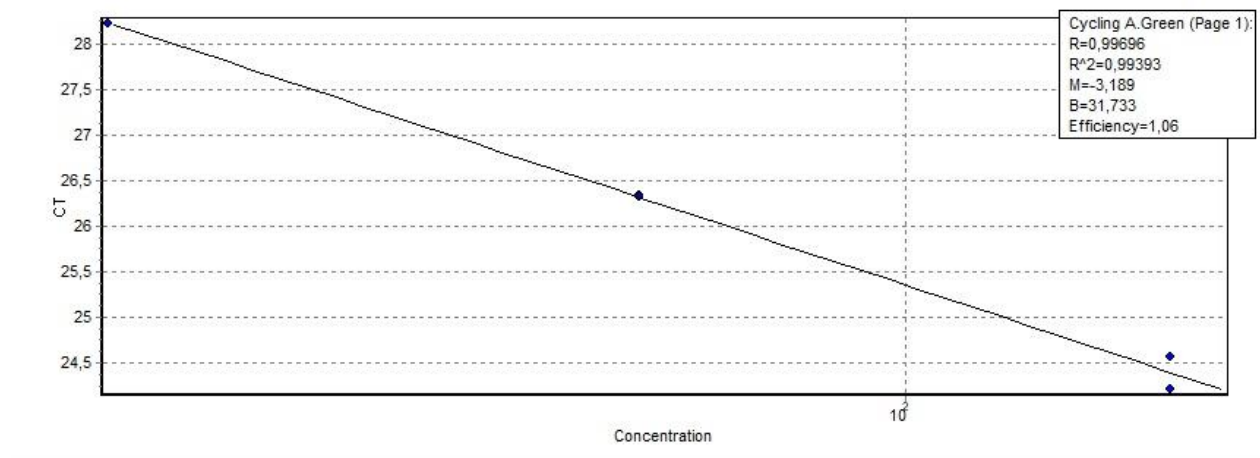


Abb. 66 Enzym 1 DEG8 ZB qPCR Effizienz

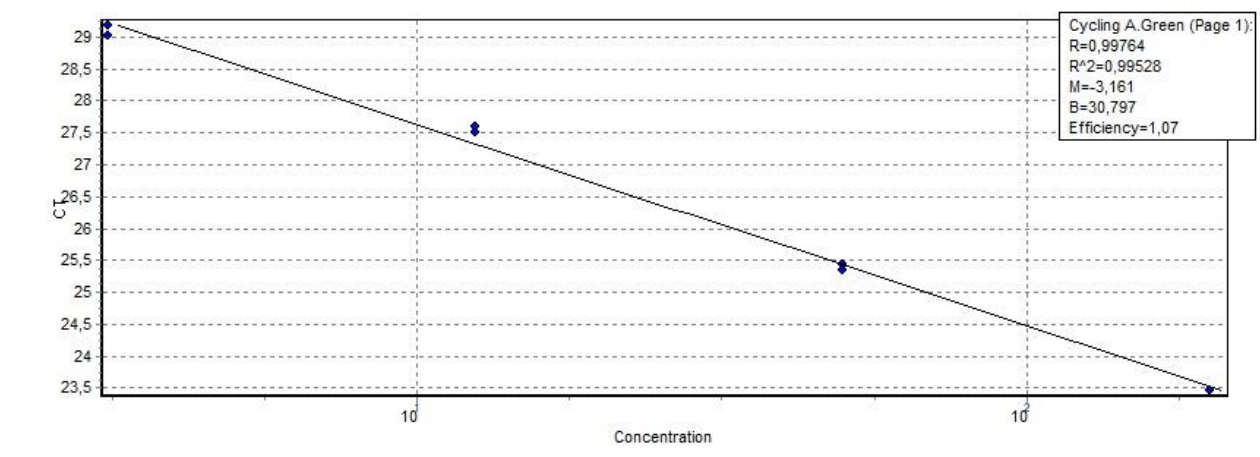


Abb. 67 Enzym 1 BO11/18 ZB qPCR Effizienz

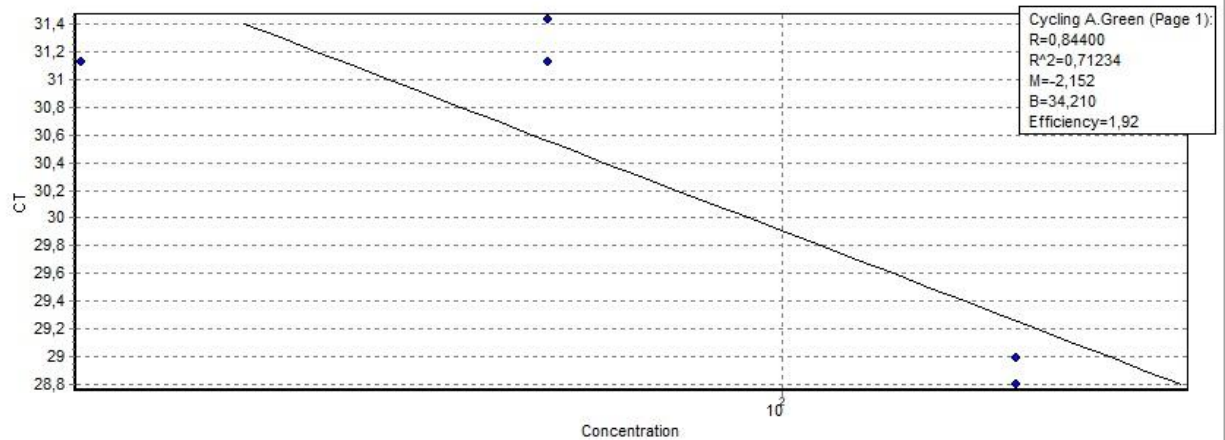


Abb. 68 Enzym 1 DEG8 Blätter qPCR Effizienz

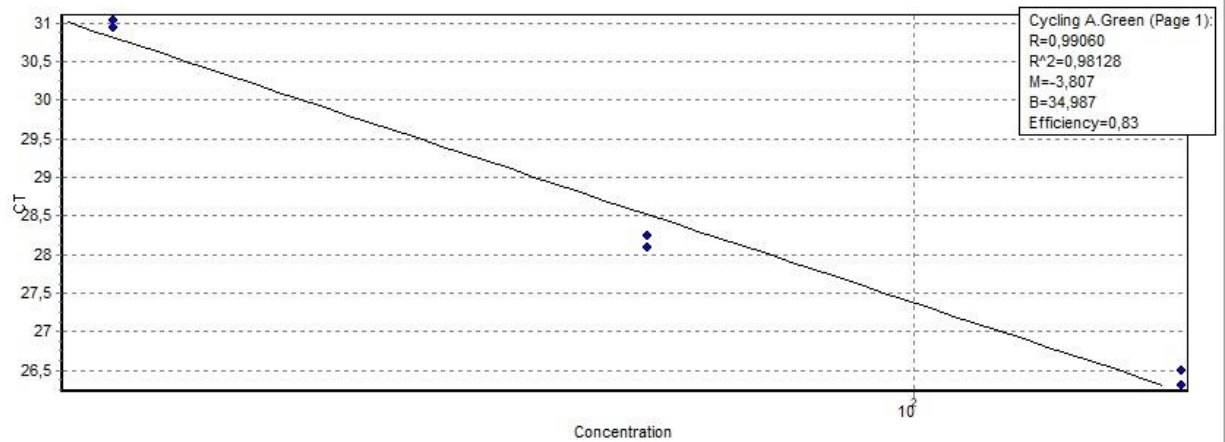


Abb. 69 Enzym 1 BO11/18 Blätter qPCR Effizienz

5.3.2 qPCR Effizienz Chalconisomerase (2CHI)

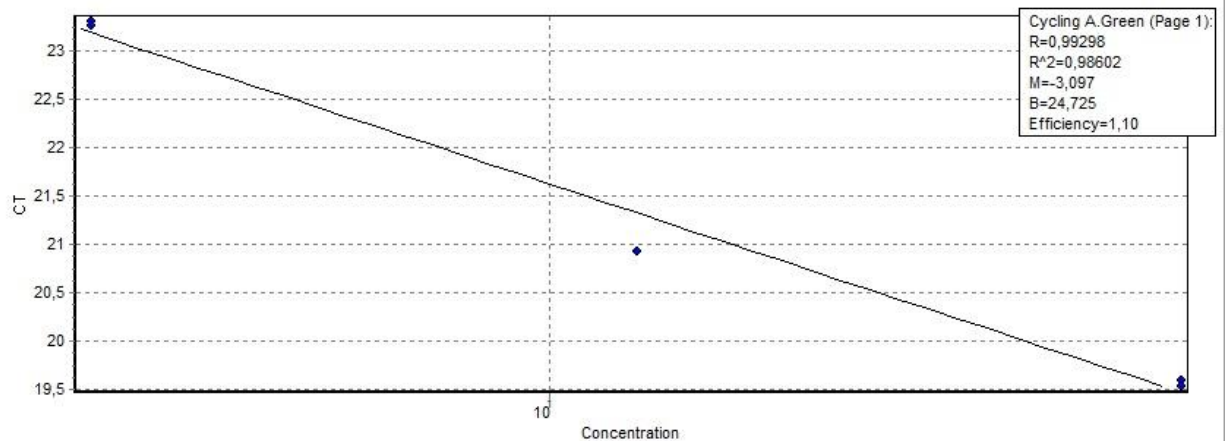


Abb. 70 Enzym 2 DEG8 BK qPCR Effizienz

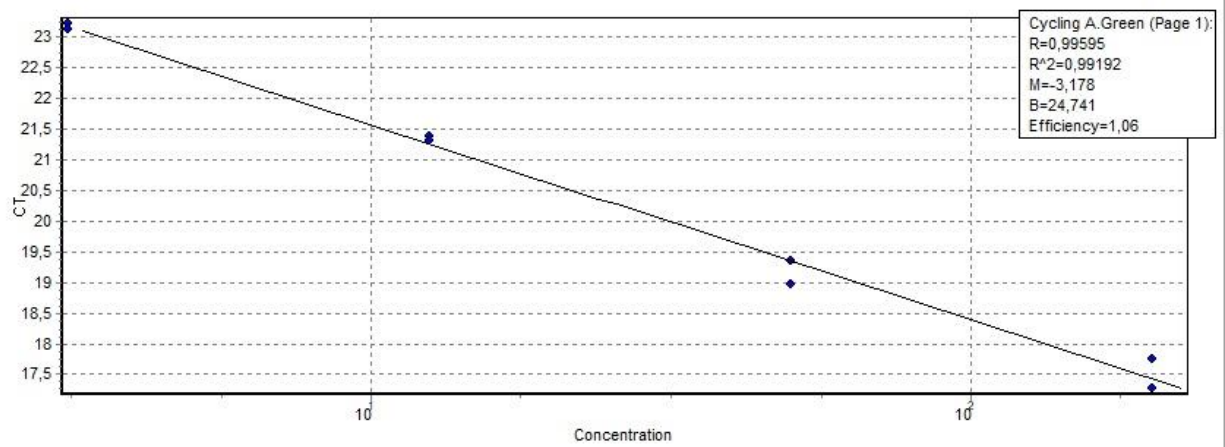


Abb. 71 Enzym 2 BO11/18 BK qPCR Effizienz

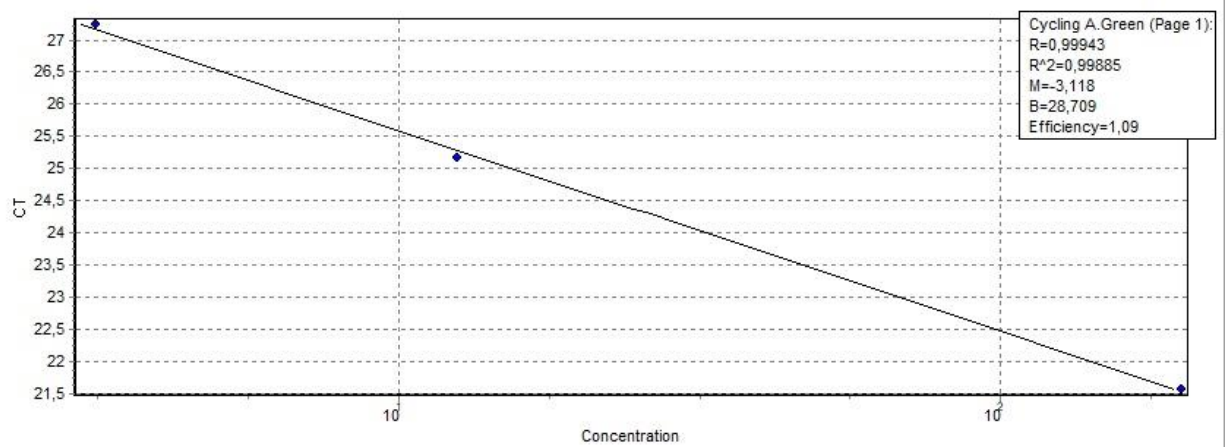


Abb. 72 Enzym 2 DEG8 ZB qPCR Effizienz

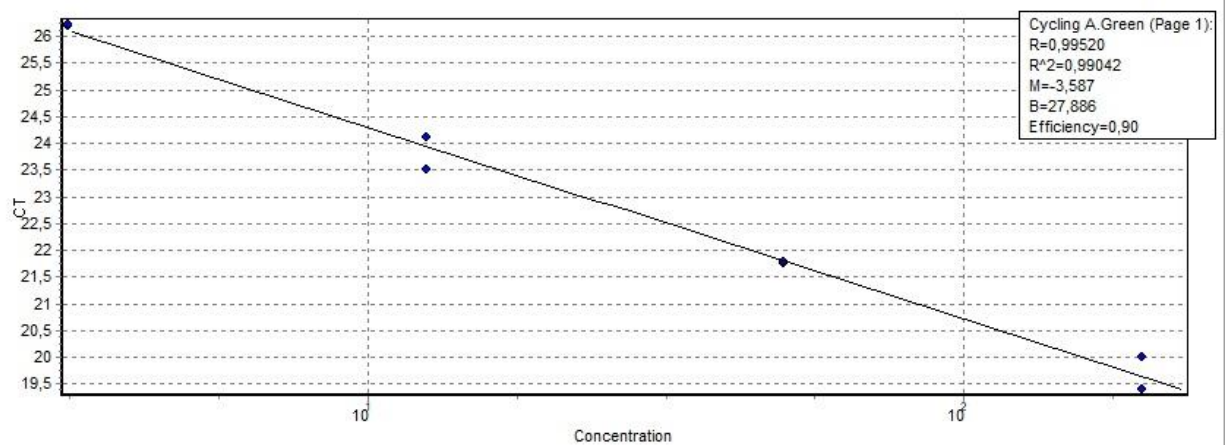


Abb. 73 Enzym 2 BO11/18 ZB qPCR Effizienz

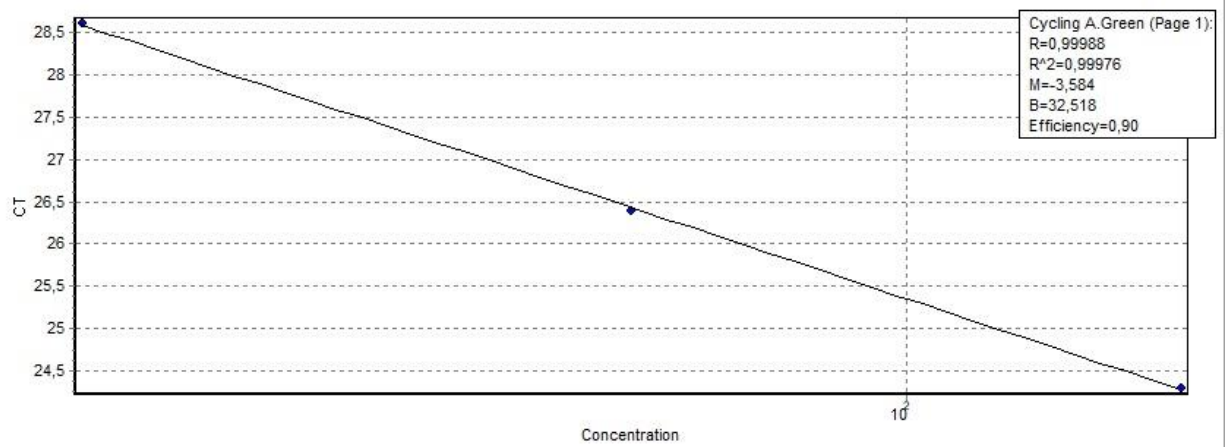


Abb. 74 Enzym 2 DEG8 Blätter qPCR Effizienz

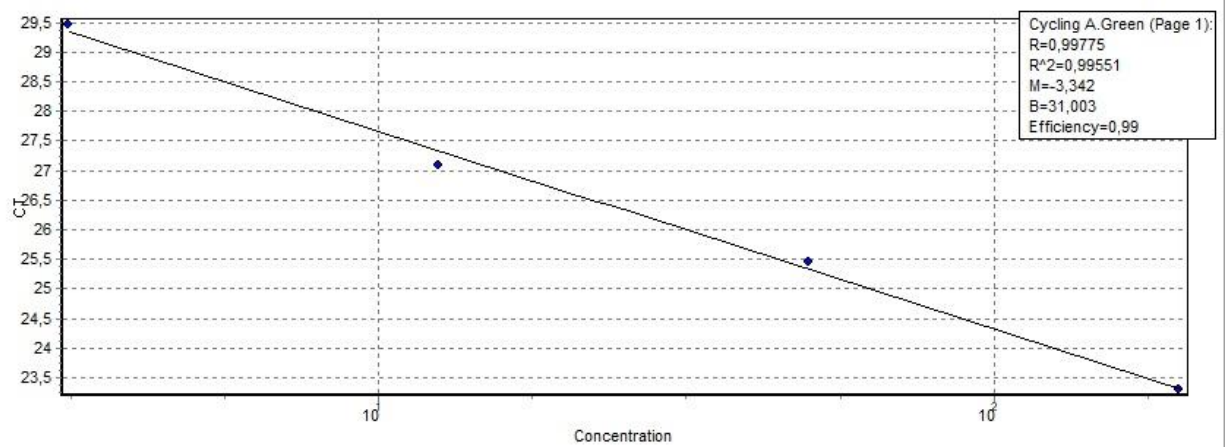


Abb. 75 Enzym 2 BO11/18 Blätter qPCR Effizienz

5.3.3 qPCR Effizienz Flavanon-3-hydroxylase (3F3H)

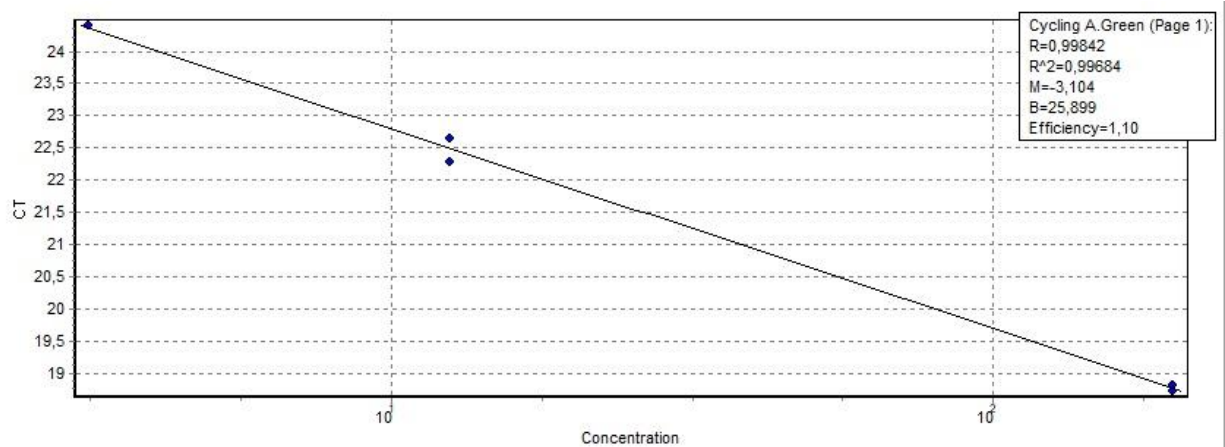


Abb. 76 Enzym 3 DEG8 BK qPCR Effizienz

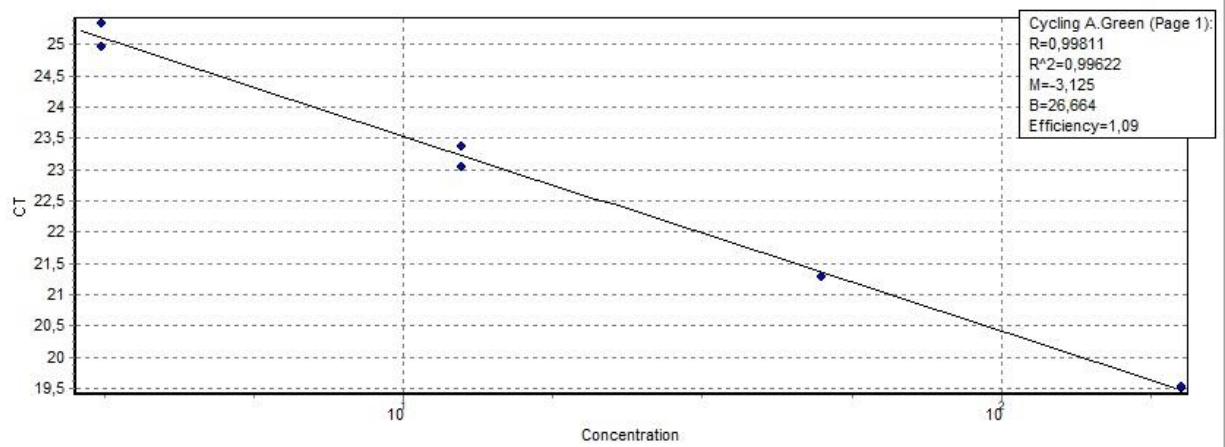


Abb. 77 Enzym 3 BO11/18 BK qPCR Effizienz

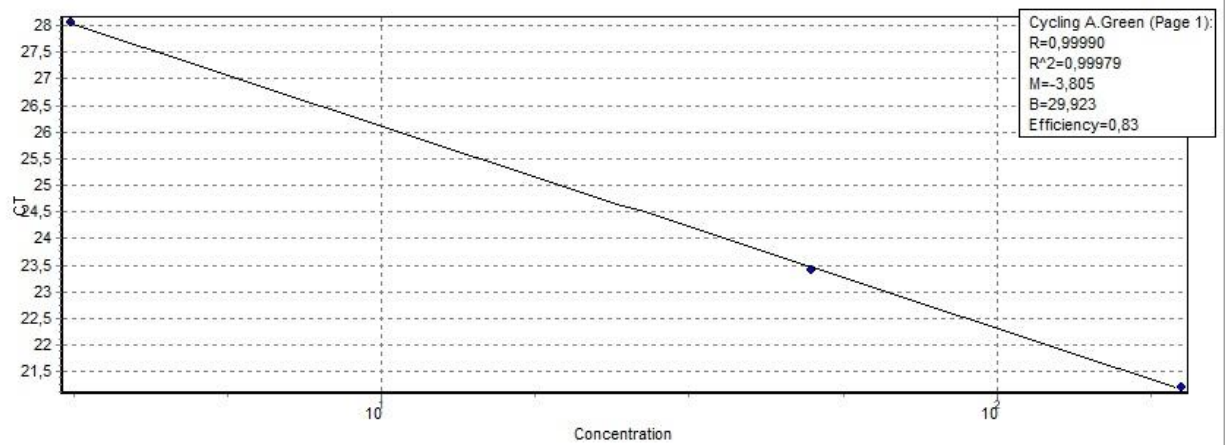


Abb. 78 Enzym 3 DEG8 ZB qPCR Effizienz

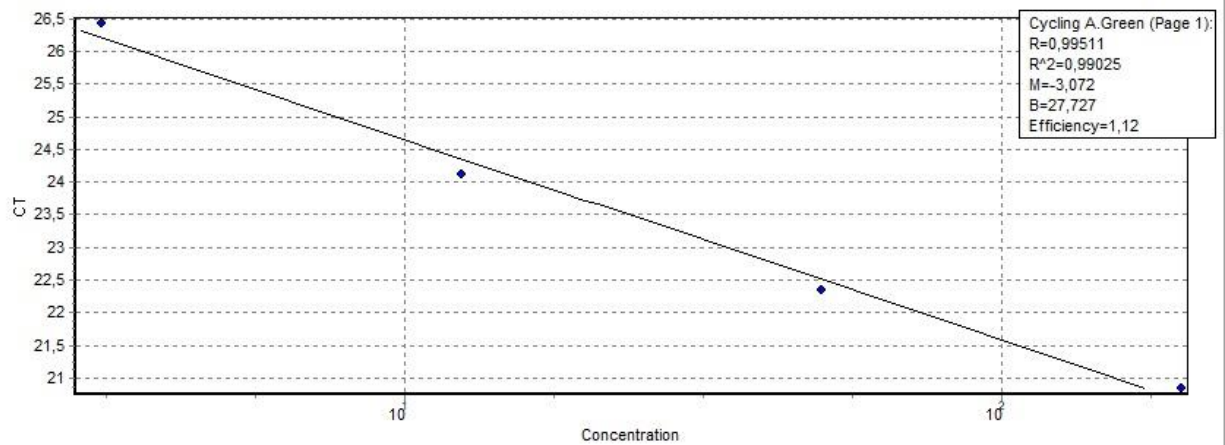


Abb. 79 Enzym 3 BO11/18 ZB qPCR Effizienz

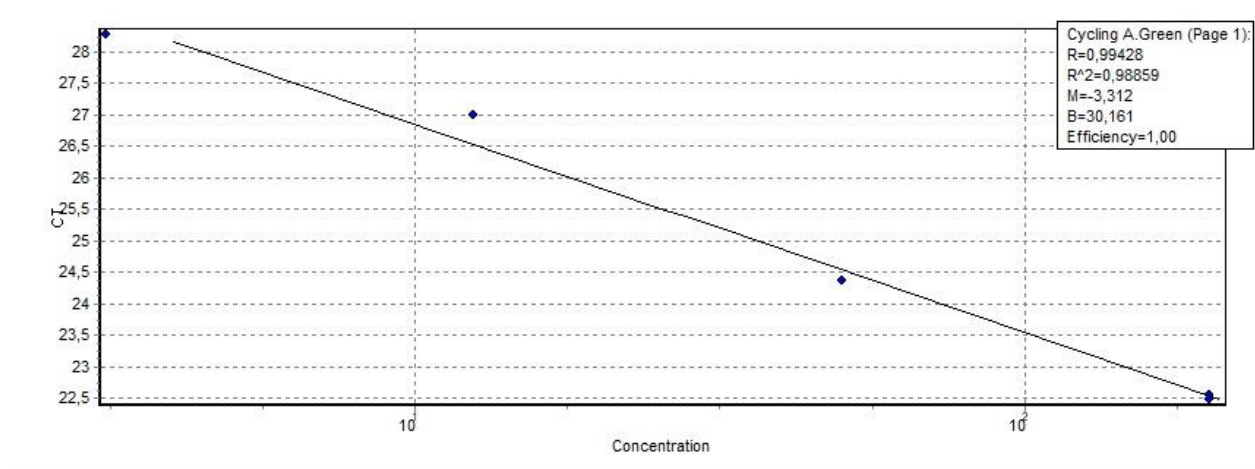


Abb. 80 Enzym 3 DEG8 Blätter qPCR Effizienz

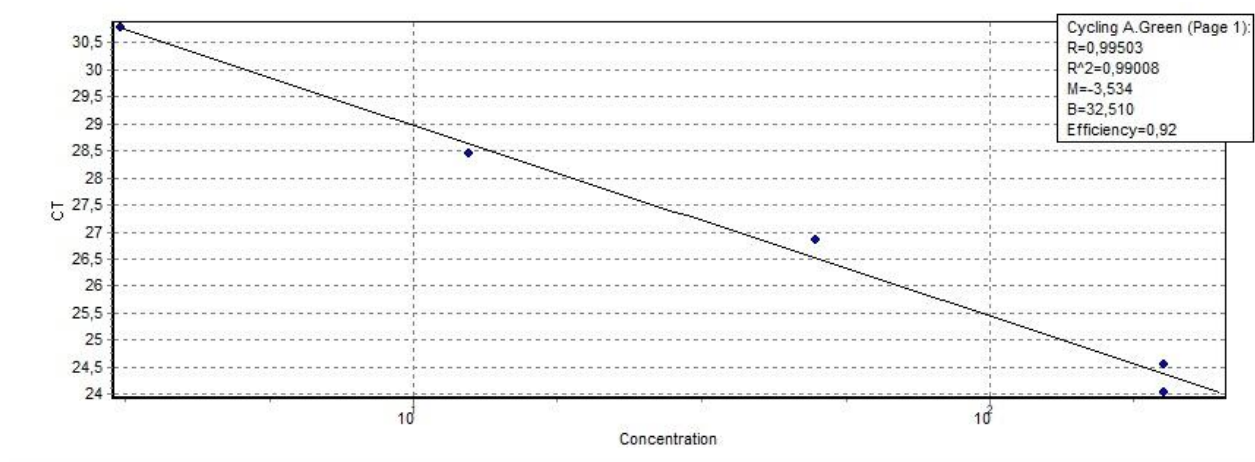


Abb. 81 Enzym 3 BO11/18 Blätter qPCR Effizienz

5.3.4 qPCR Effizienz Flavonolsynthase (4FLS)

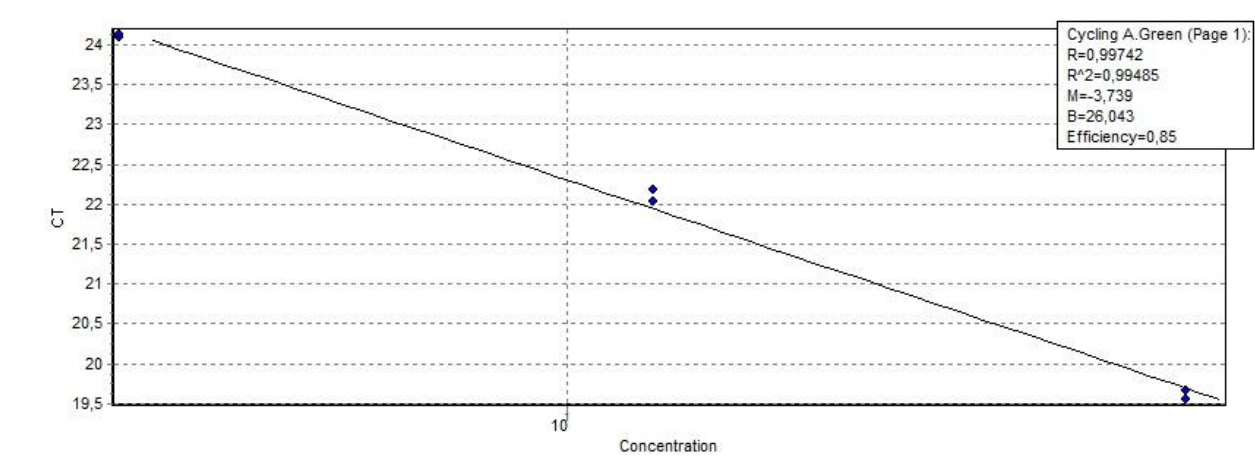


Abb. 82 Enzym 4 DEG8 BK qPCR Effizienz

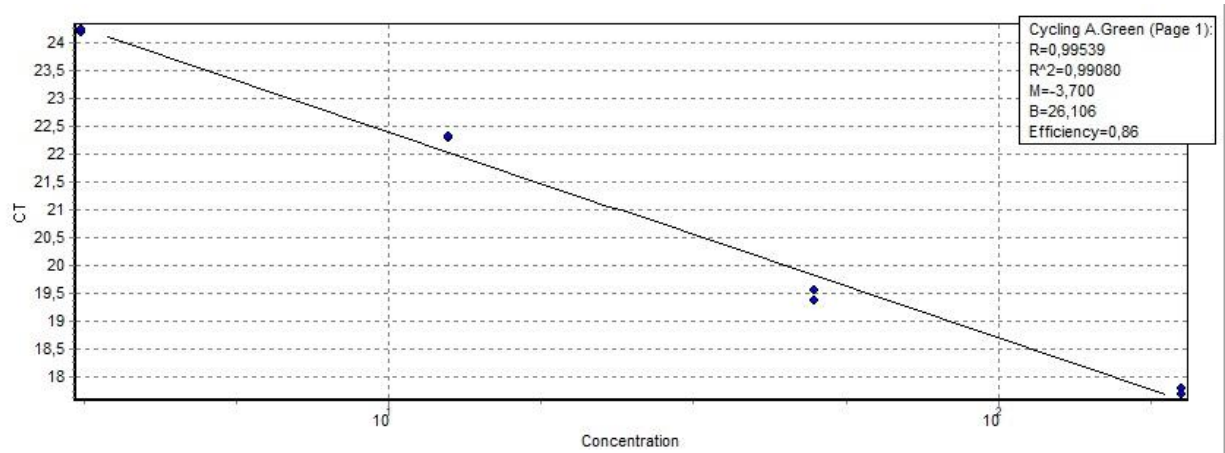


Abb. 83 Enzym 4 BO11/18 BK qPCR Effizienz

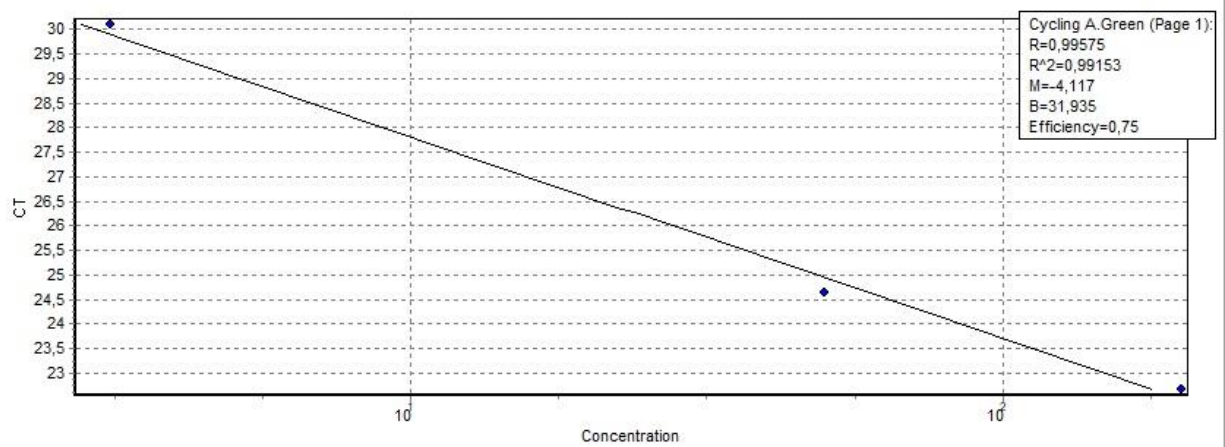


Abb. 84 Enzym 4 DEG8 ZB qPCR Effizienz

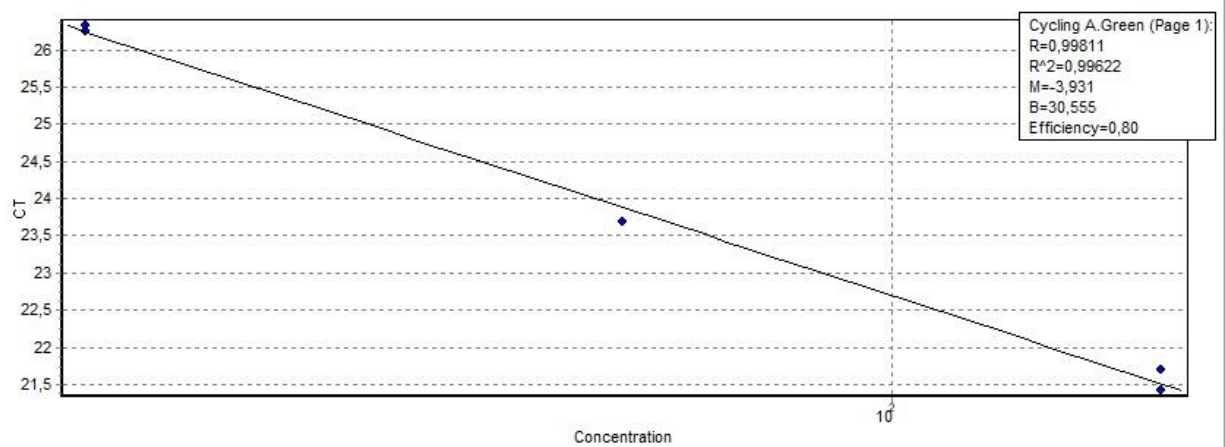


Abb. 85 Enzym 4 BO11/18 ZB qPCR Effizienz

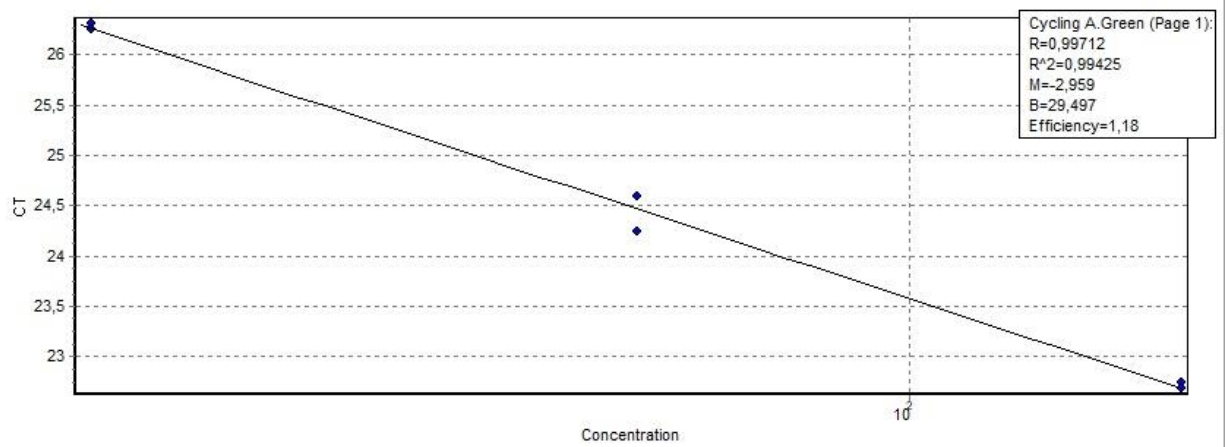


Abb. 86 Enzym 4 DEG8 Blätter qPCR Effizienz

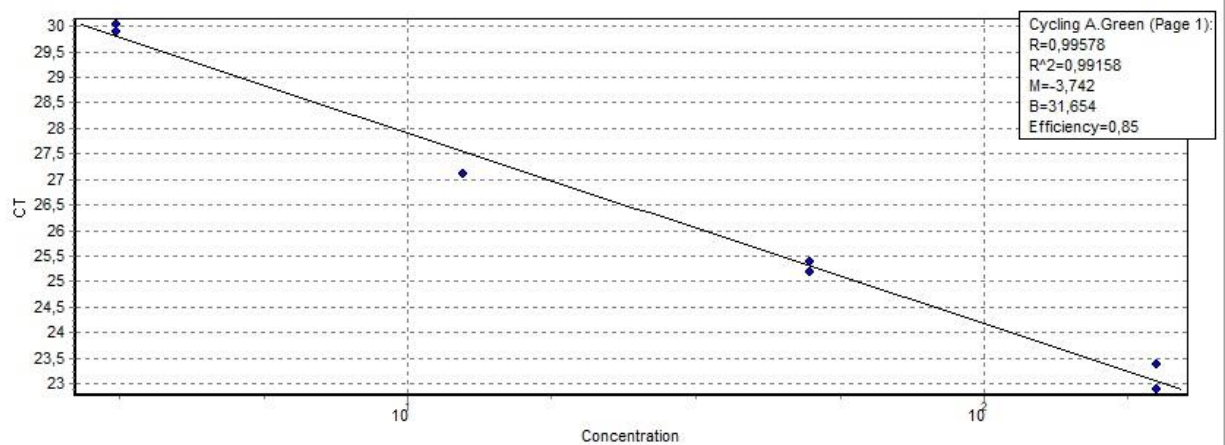


Abb. 87 Enzym 4 BO11/18 Blätter qPCR Effizienz

5.3.5 qPCR Effizienz Flavonsynthase (5bFNS)

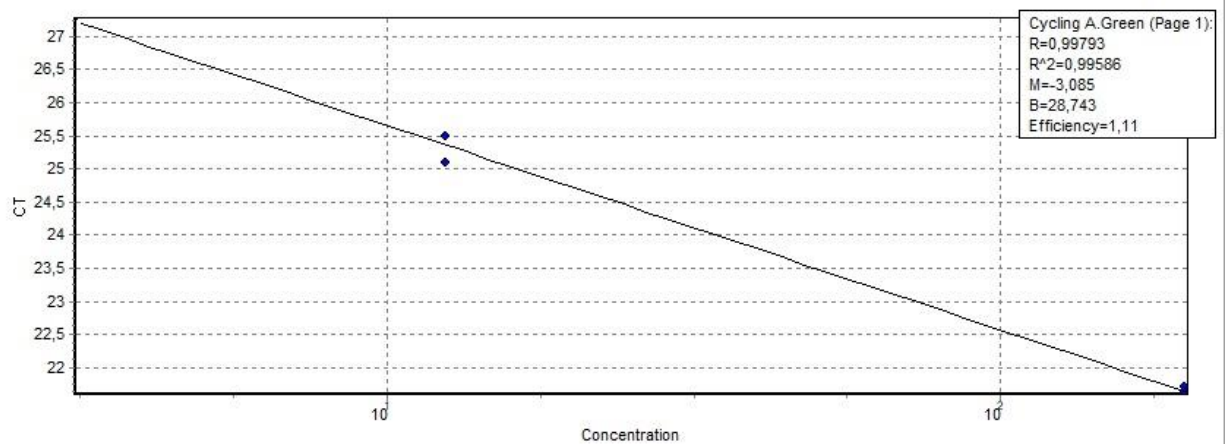


Abb. 88 Enzym 5 DEG8 BK qPCR Effizienz

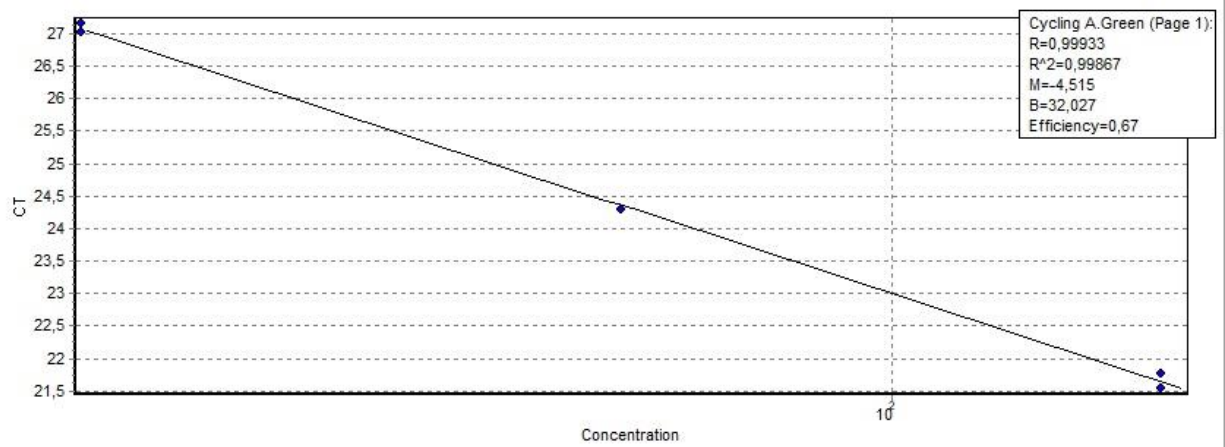


Abb. 89 Enzym 5 BO11/18 BK qPCR Effizienz

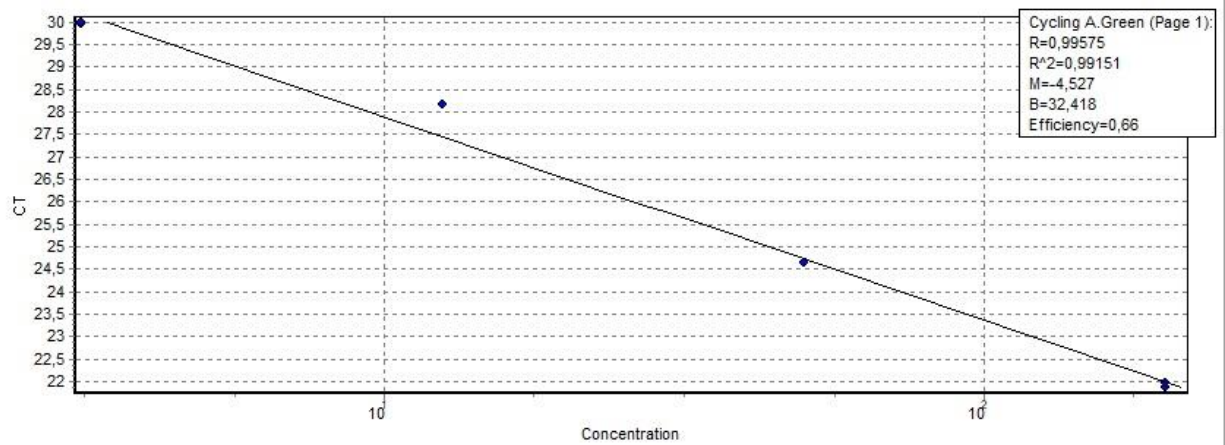


Abb. 90 Enzym 5 DEG8 ZB qPCR Effizienz

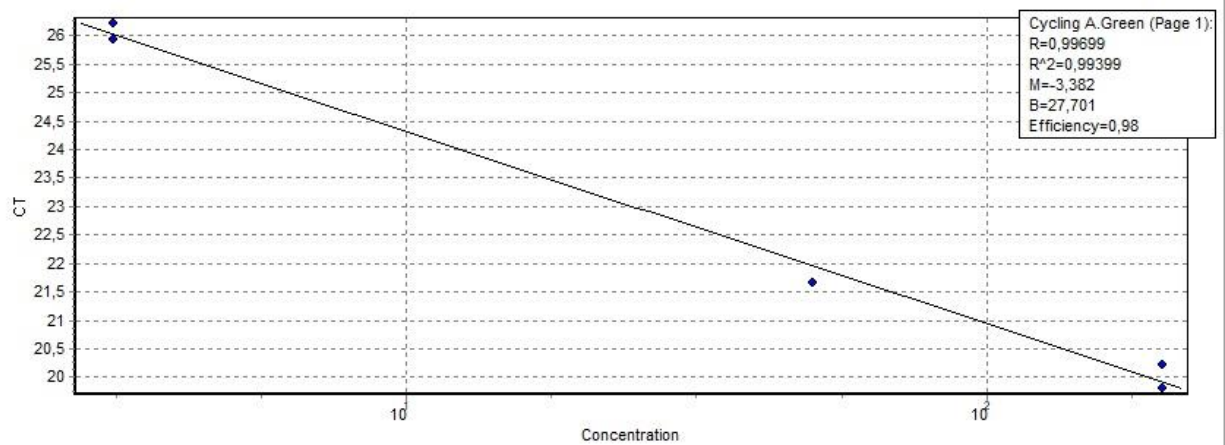


Abb. 91 Enzym 5 BO11/18 ZB qPCR Effizienz

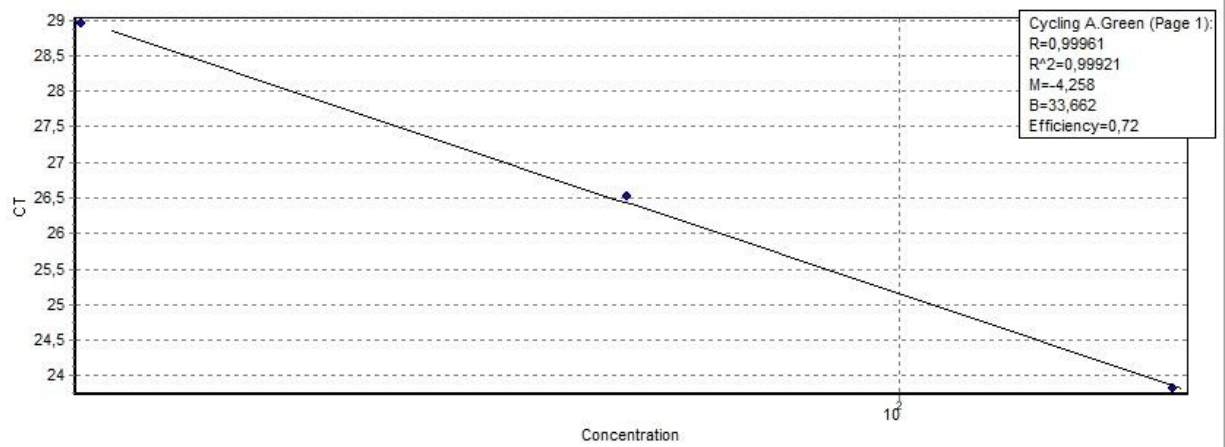


Abb. 92 Enzym 5 DEG8 Blätter qPCR Effizienz

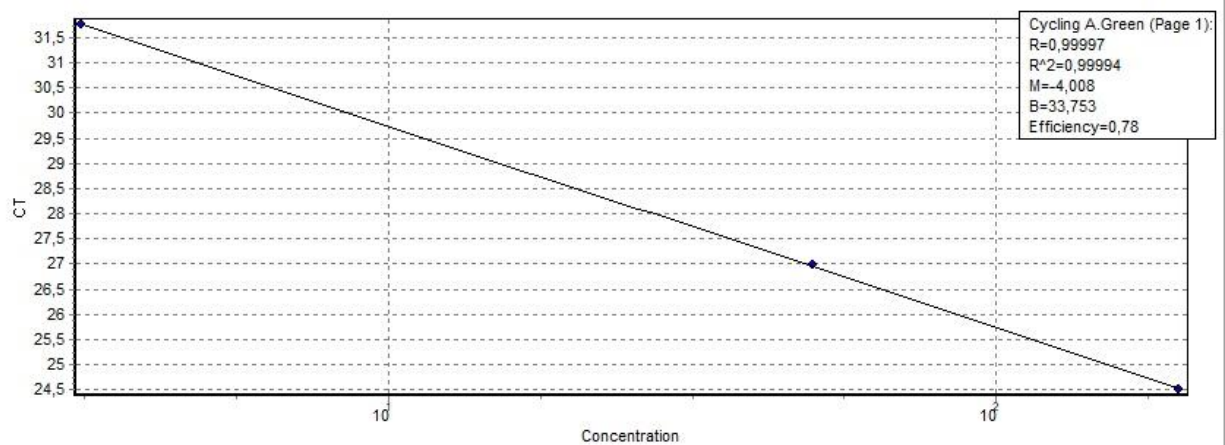


Abb. 93 Enzym 5 BO11/18 Blätter qPCR Effizienz

5.3.6 qPCR Effizienz Glycosyltransferase 1 (6GT1)

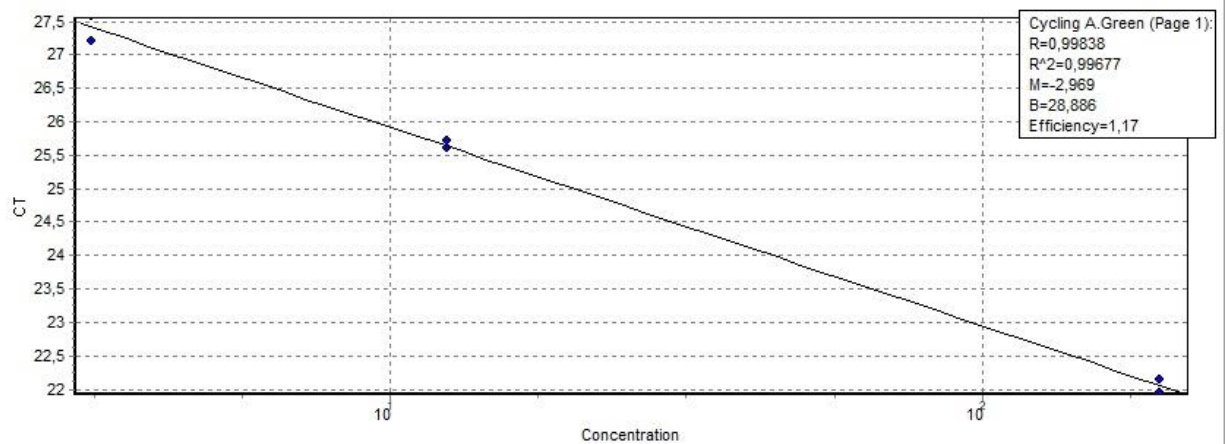


Abb. 94 Enzym 6 DEG8 BK qPCR Effizienz

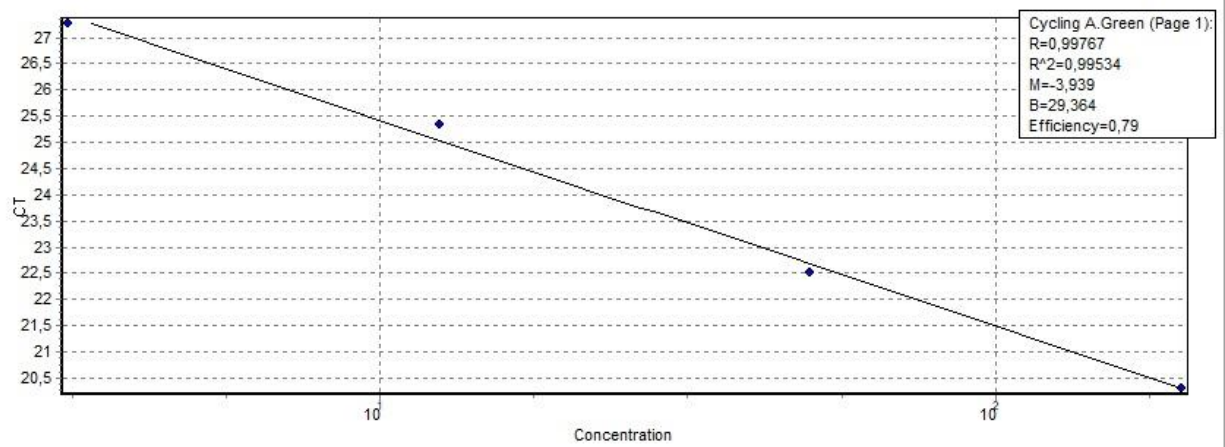


Abb. 95 Enzym 6 BO11/18 BK qPCR Effizienz

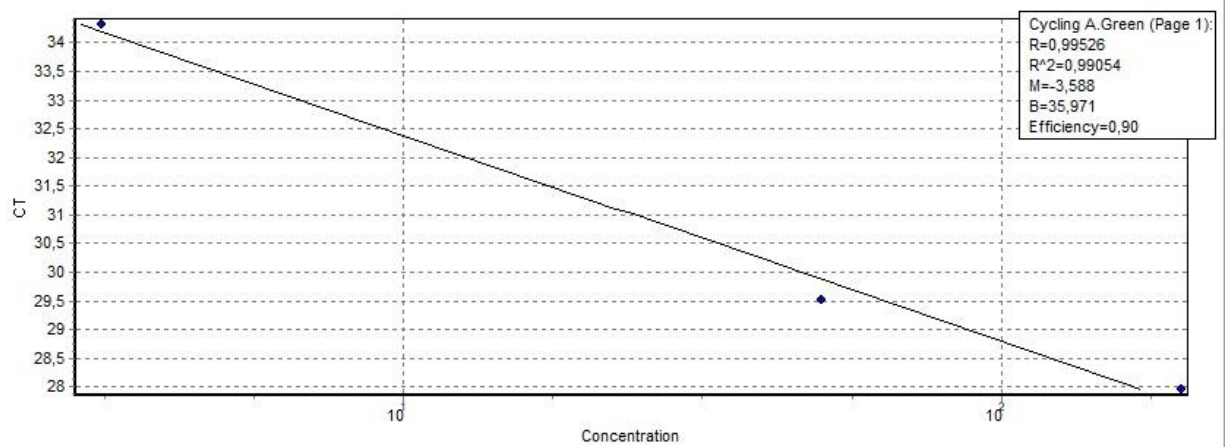


Abb. 96 Enzym 6 DEG8 ZB qPCR Effizienz

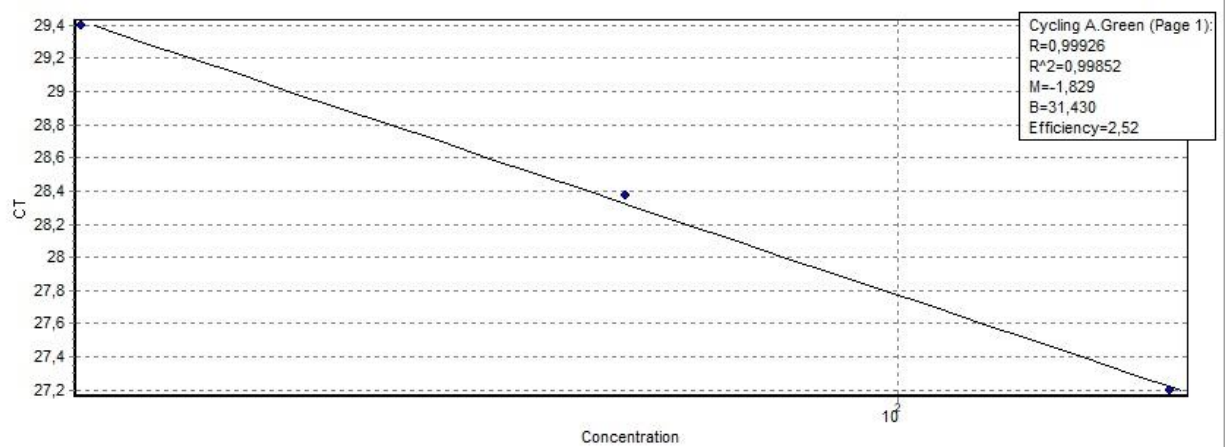


Abb. 97 Enzym 6 BO11/18 ZB qPCR Effizienz

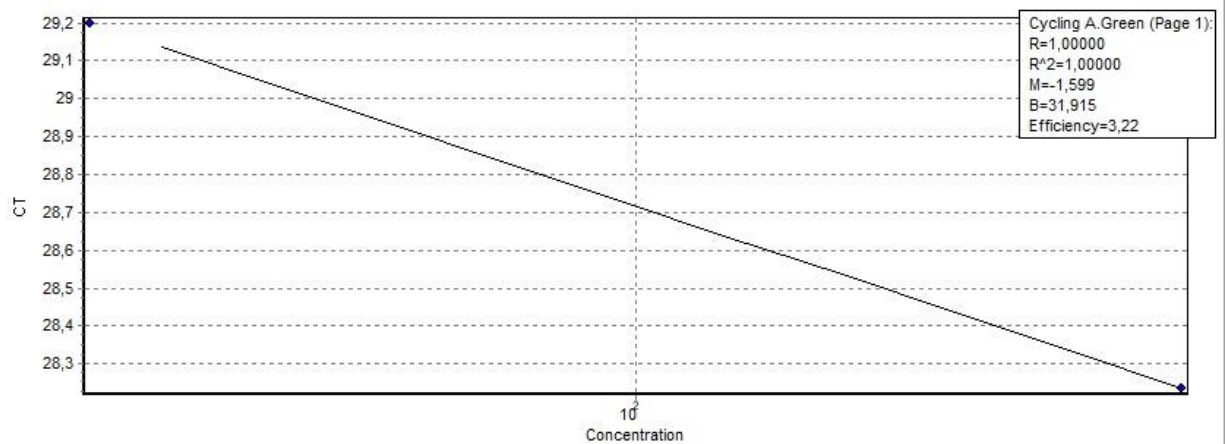


Abb. 98 Enzym 6 DEG8 Blätter qPCR Effizienz

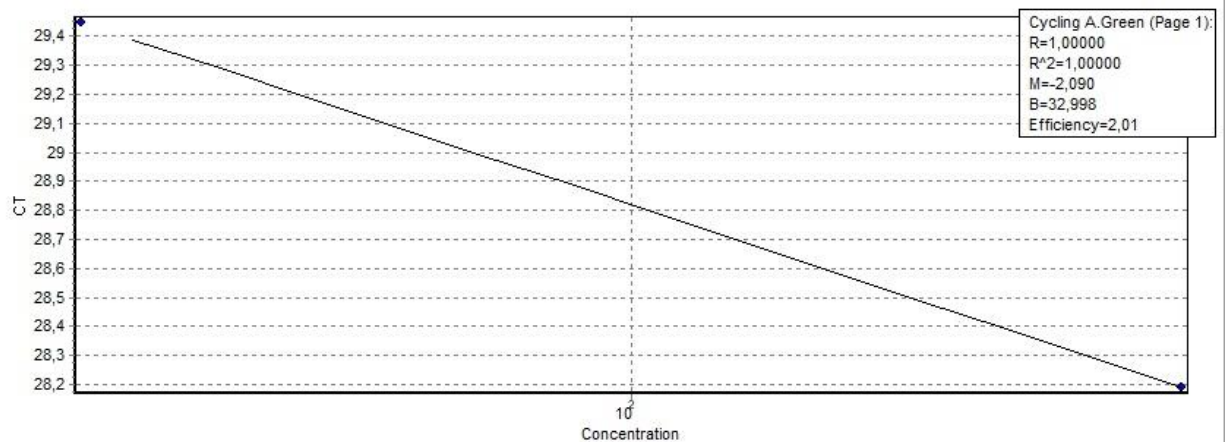


Abb. 99 Enzym 6 BO11/18 Blätter qPCR Effizienz

5.3.7 qPCR Effizienz Glycosyltransferase 2 (7GT2)

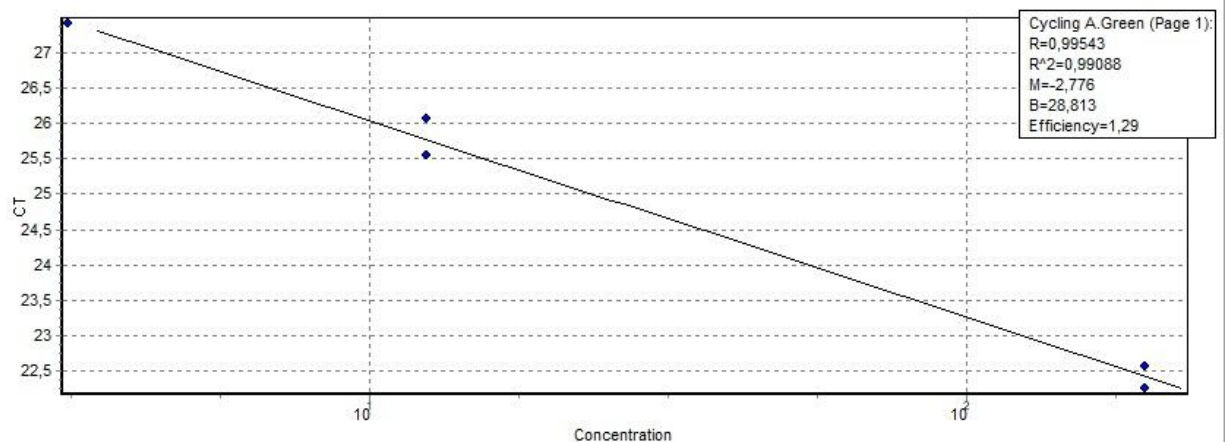


Abb. 100 Enzym 7 DEG8 BK qPCR Effizienz

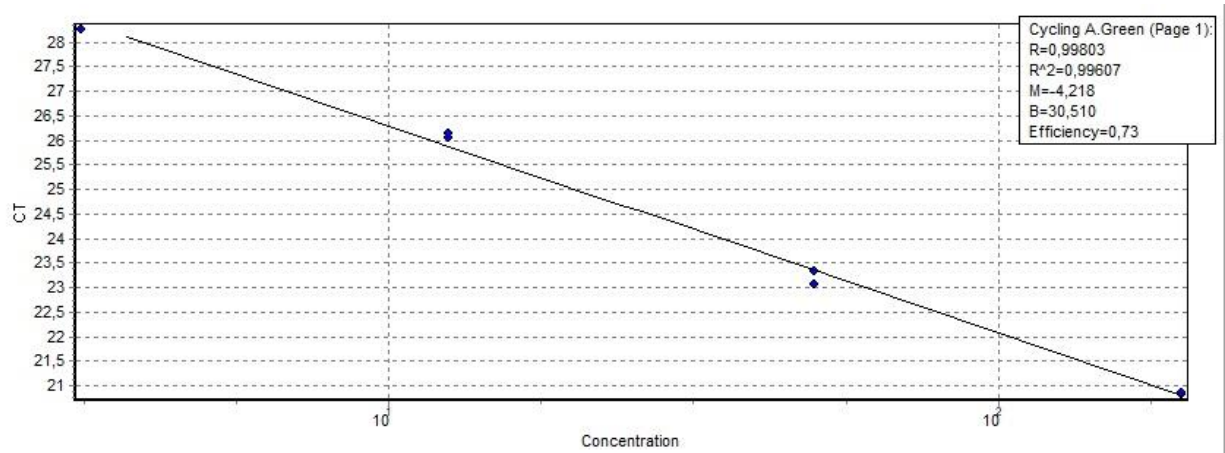


Abb. 101 Enzym 7 BO11/18 BK qPCR Effizienz

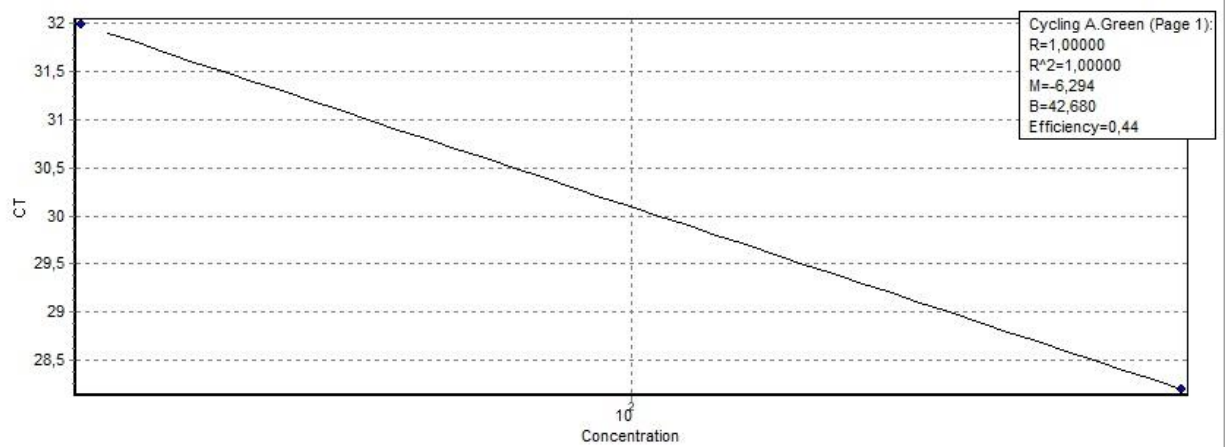


Abb. 102 Enzym 7 DEG8 Blätter qPCR Effizienz

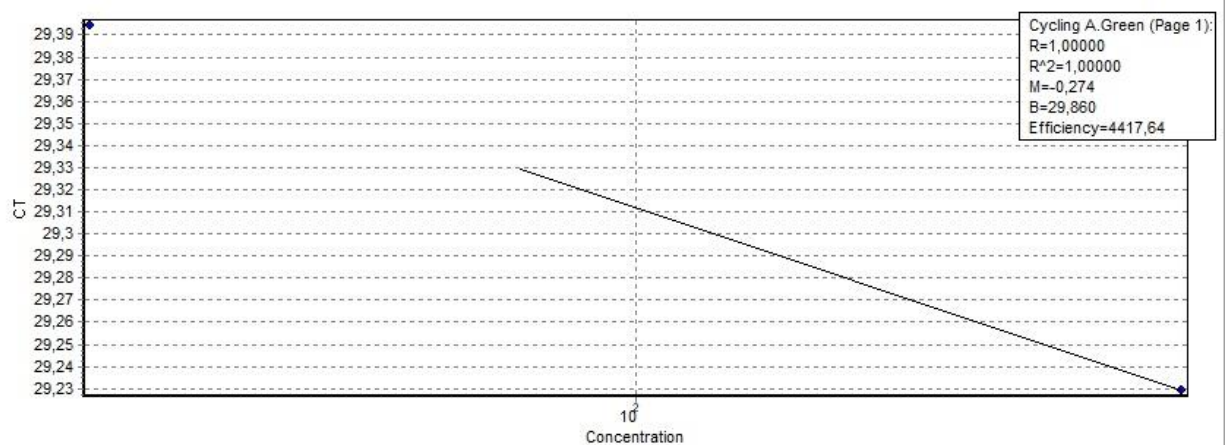


Abb. 103 Enzym 7 BO11/18 Blätter qPCR Effizienz

5.3.8 qPCR Effizienz Glycosyltransferase 3 (8GT3)

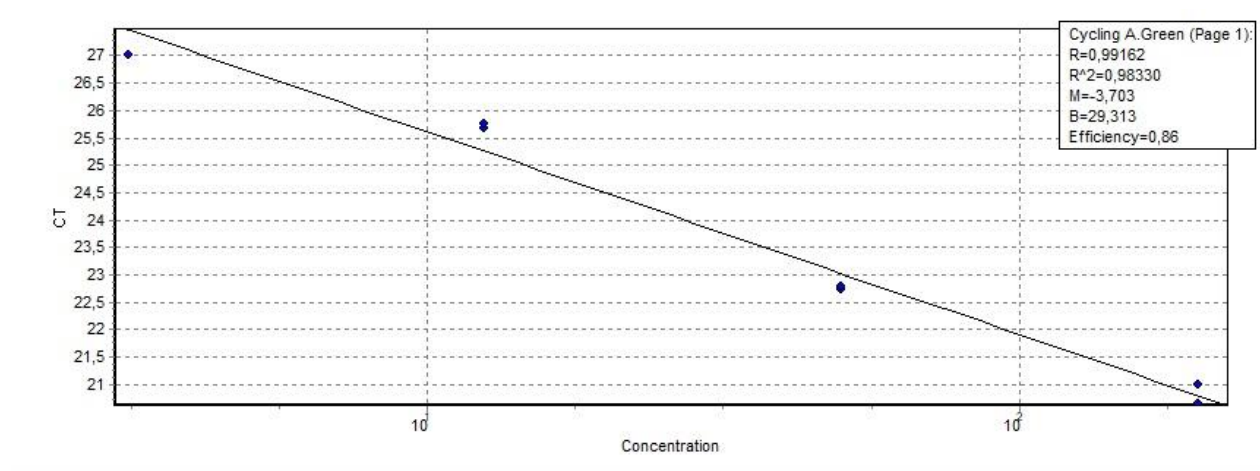


Abb. 104 Enzym 8 BO11/18 BK qPCR Effizienz

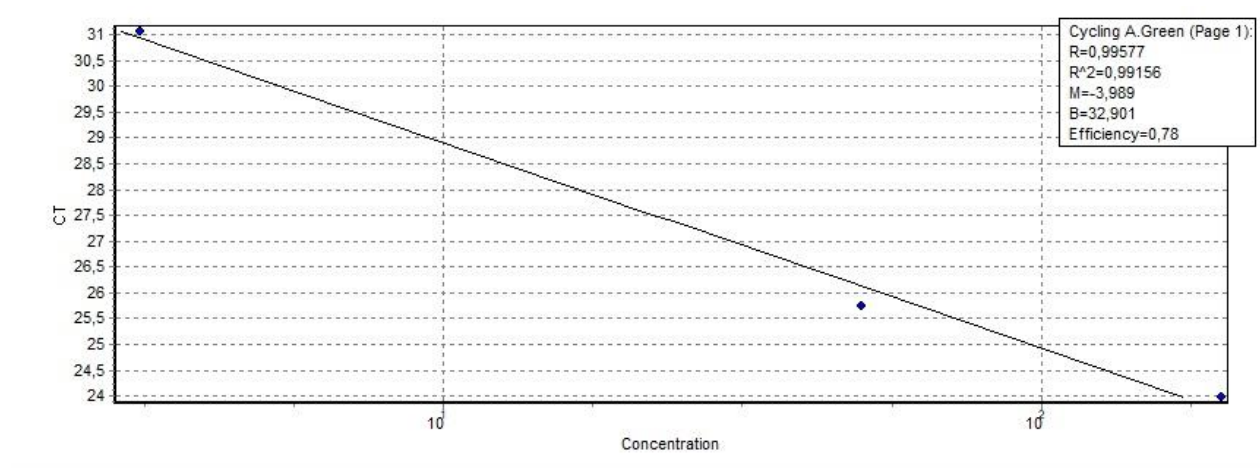


Abb. 105 Enzym 8 DEG8 ZB qPCR Effizienz

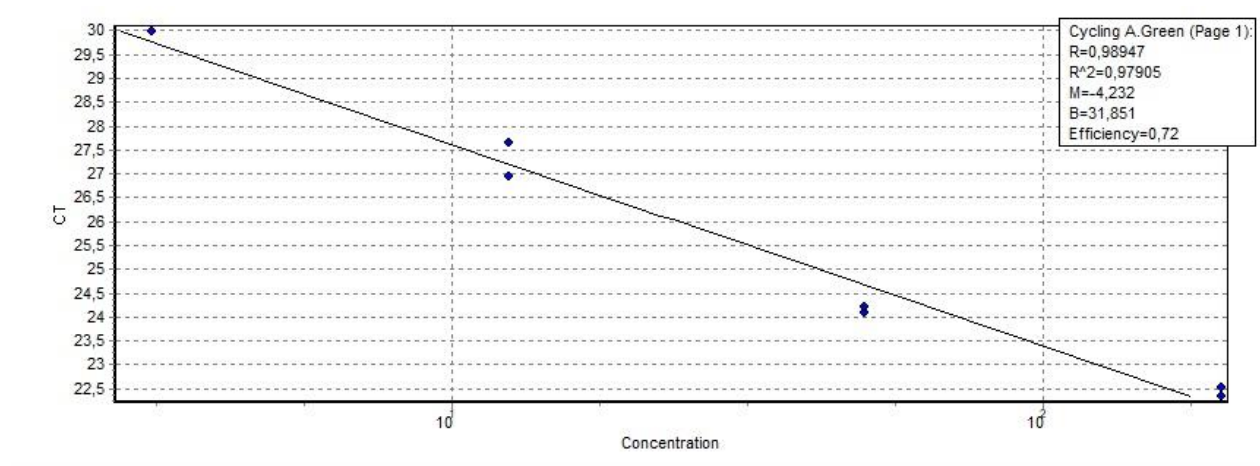


Abb. 106 Enzym 8 BO11/18 ZB qPCR Effizienz

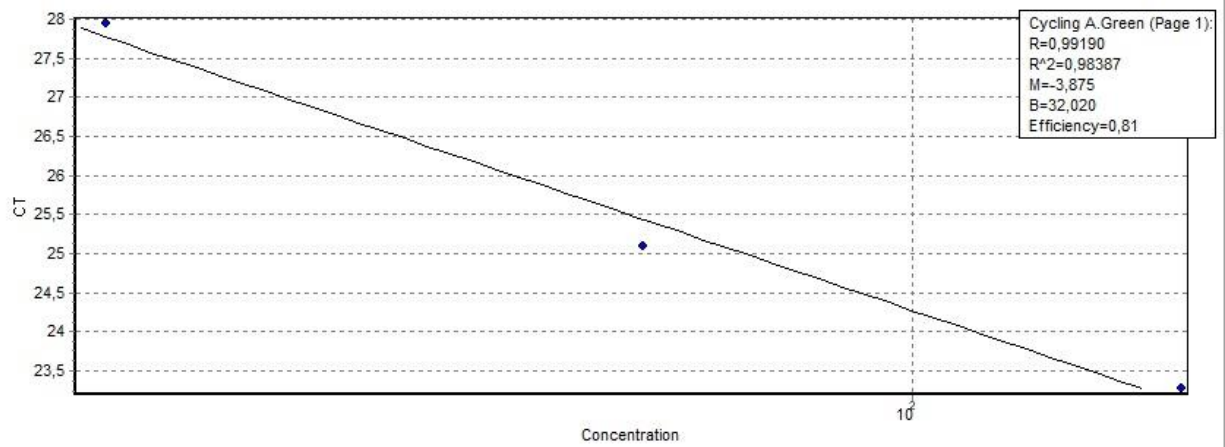


Abb. 107 Enzym 8 DEG8 Blätter qPCR Effizienz

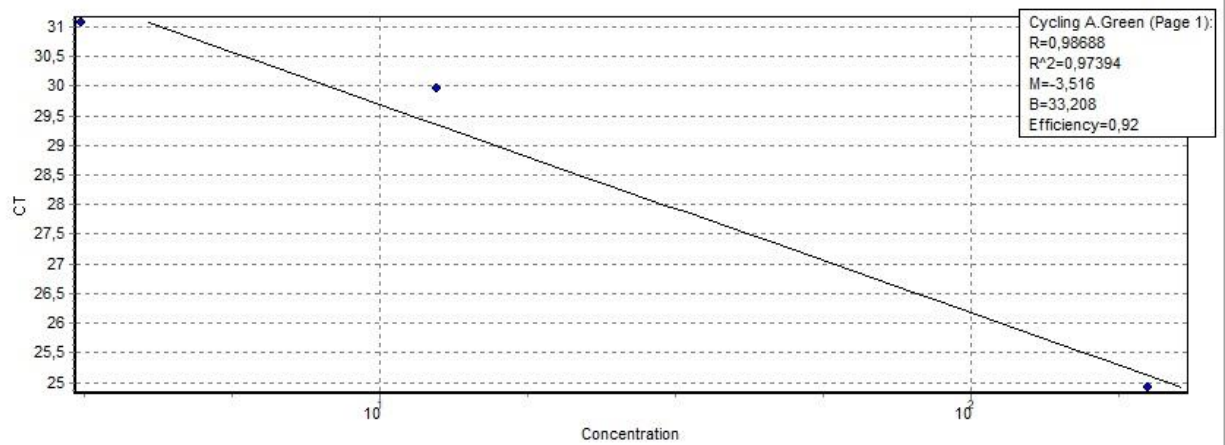


Abb. 108 Enzym 8 BO11/18 Blätter qPCR Effizienz

5.3.9 qPCR Effizienz Transkriptionsfaktor MYB (9MYB)

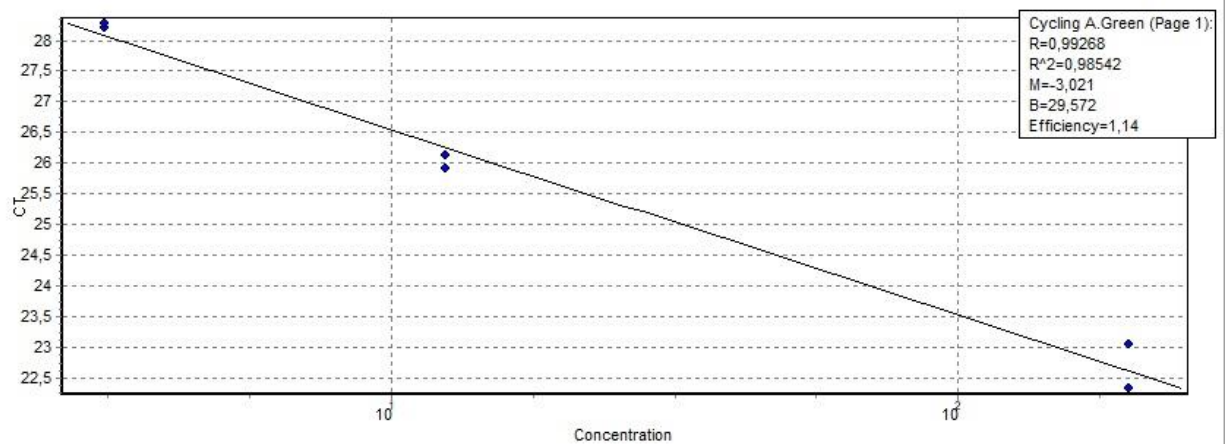


Abb. 109 Enzym 9 DEG8 BK qPCR Effizienz

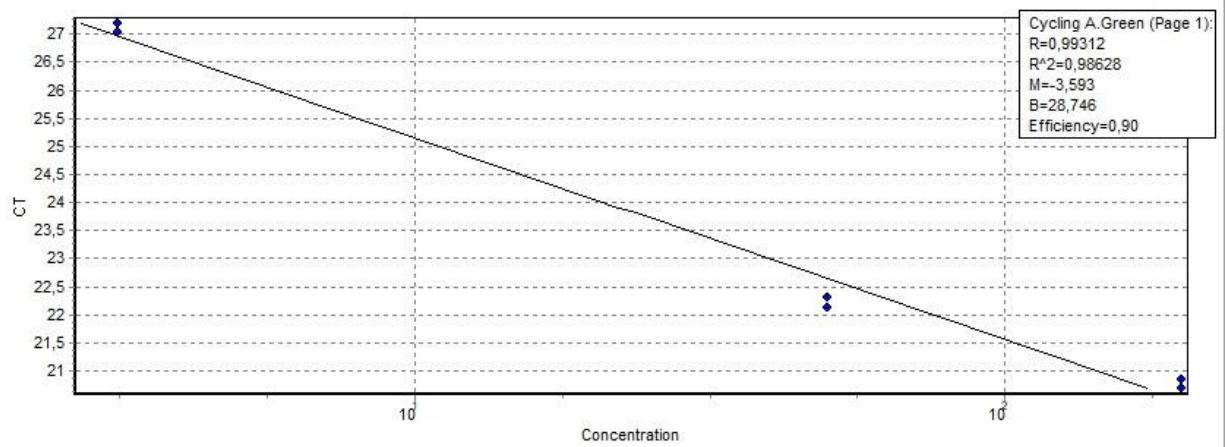


Abb. 110 Enzym 9 BO11/18 BK qPCR Effizienz

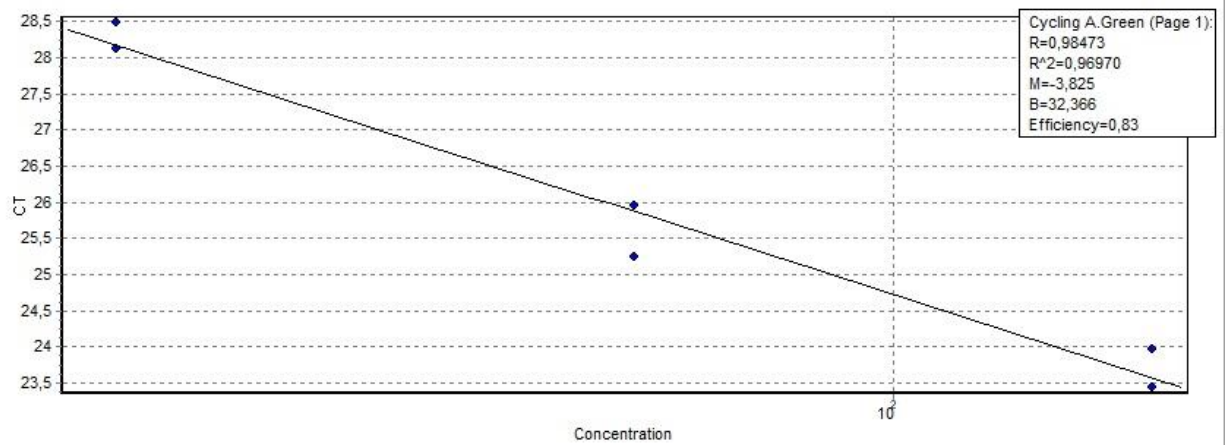


Abb. 111 Enzym 9 DEG8 ZB qPCR Effizienz

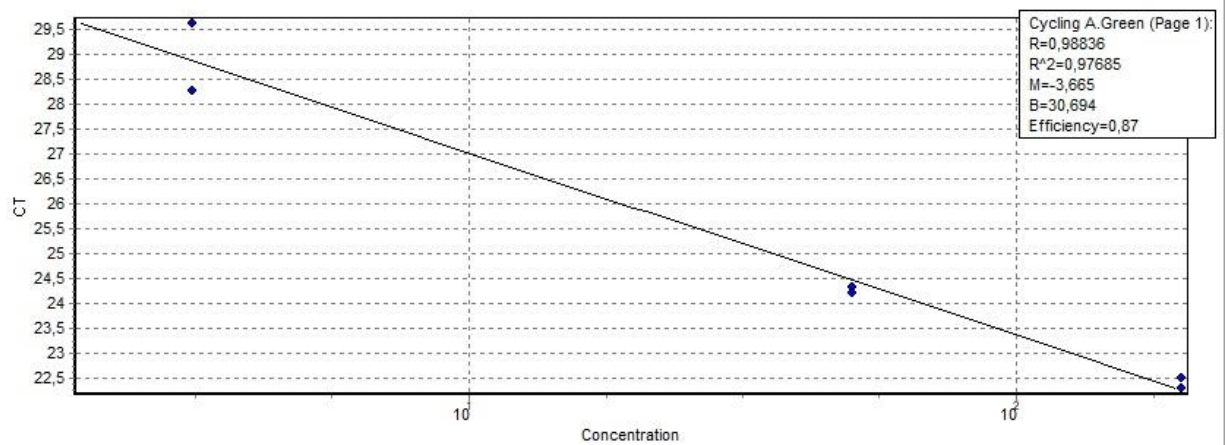


Abb. 112 Enzym 9 BO11/18 ZB qPCR Effizienz

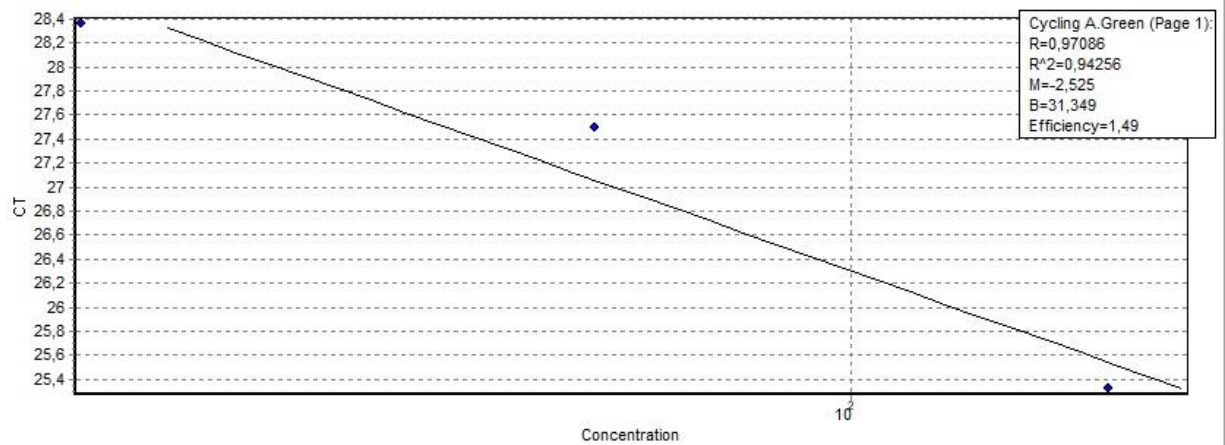


Abb. 113 Enzym 9 BO11/18 Blätter qPCR Effizienz

5.3.10 qPCR Effizienz Transkriptionsfaktor WD40 (10WD40)

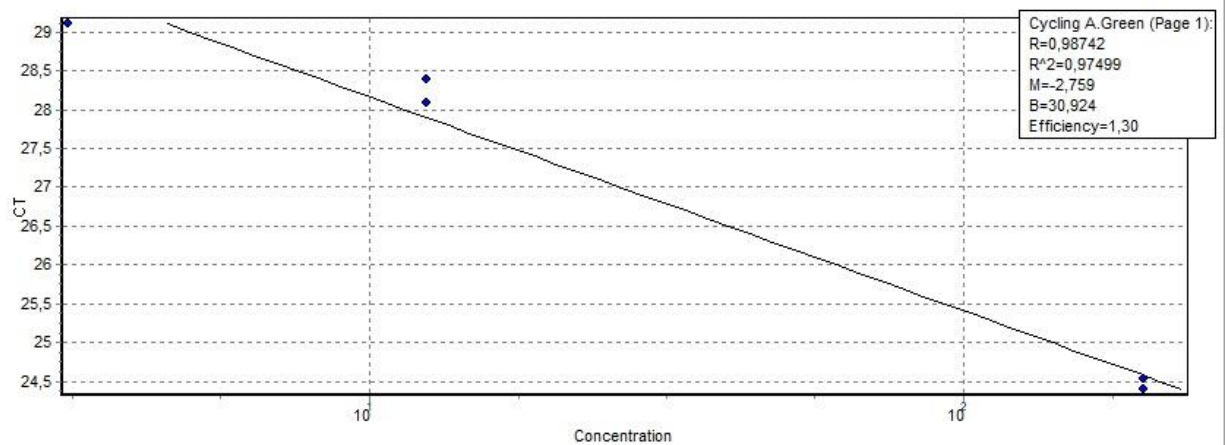


Abb. 114 Enzym 10 DEG8 BK qPCR Effizienz

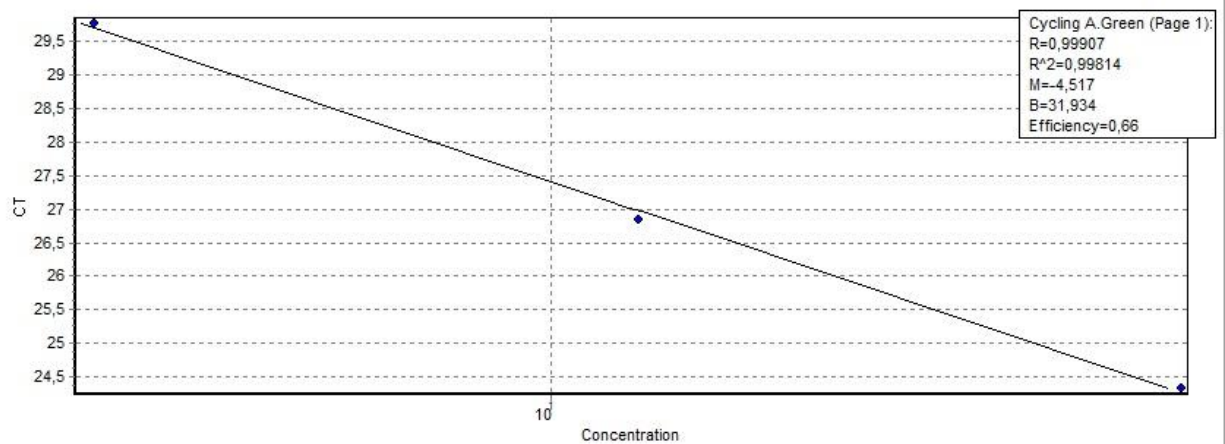


Abb. 115 Enzym 10 BO11/18 BK qPCR Effizienz

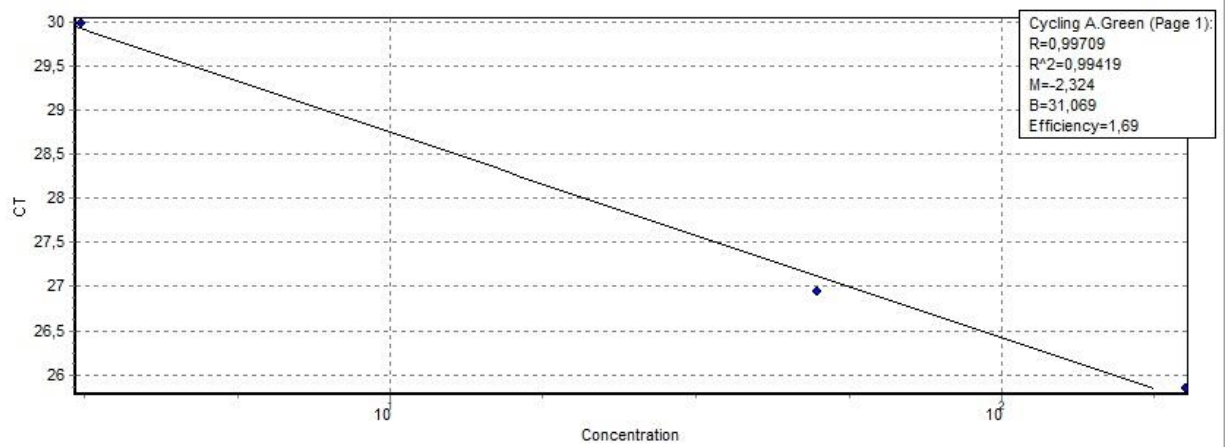


Abb. 116 Enzym 10 BO11/18 ZB qPCR Effizienz

5.4.11 qPCR Effizienz housekeeping Gen (26SrRNA)

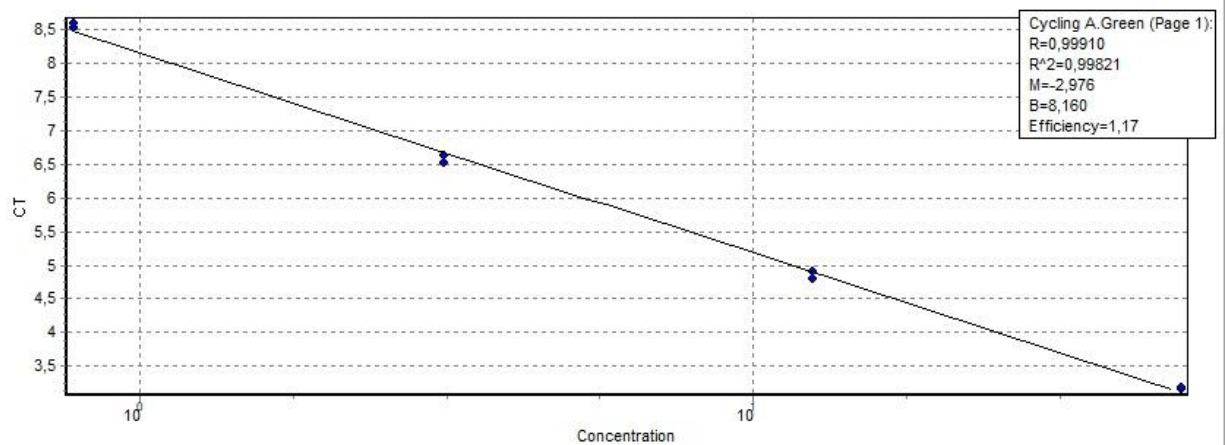


Abb. 117 housekeeping Gen DJBK qPCR Effizienz

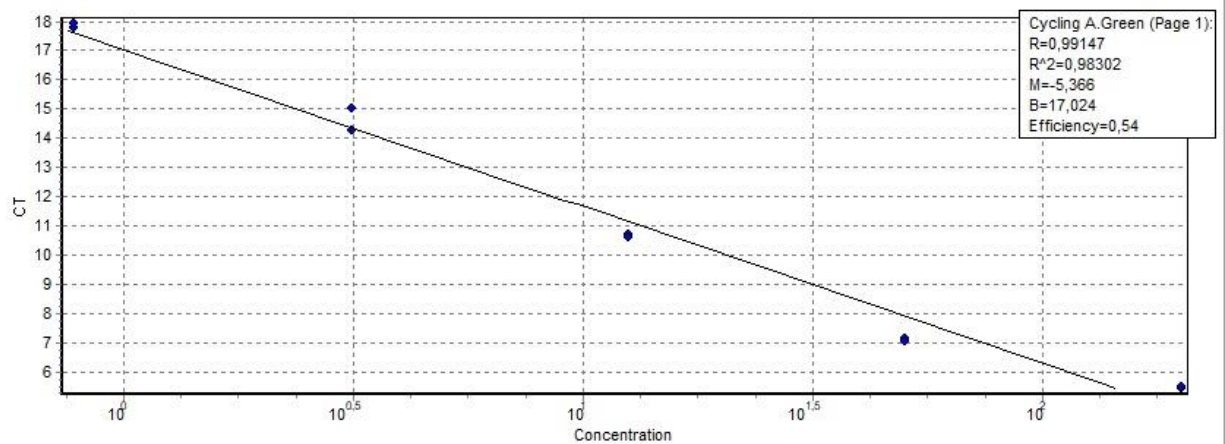


Abb. 118 housekeeping Gen DMBK qPCR Effizienz

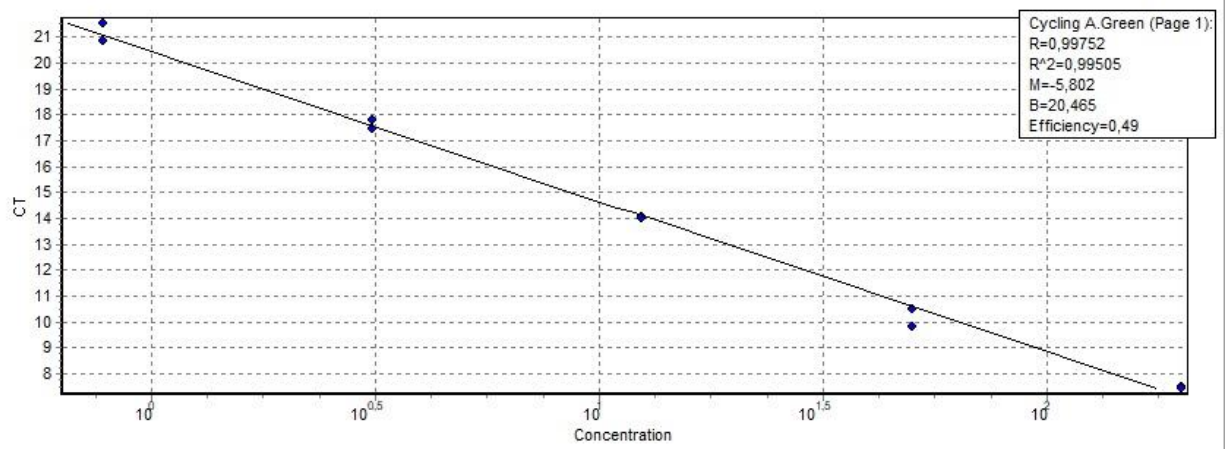


Abb. 119 housekeeping Gen DABK qPCR Effizienz

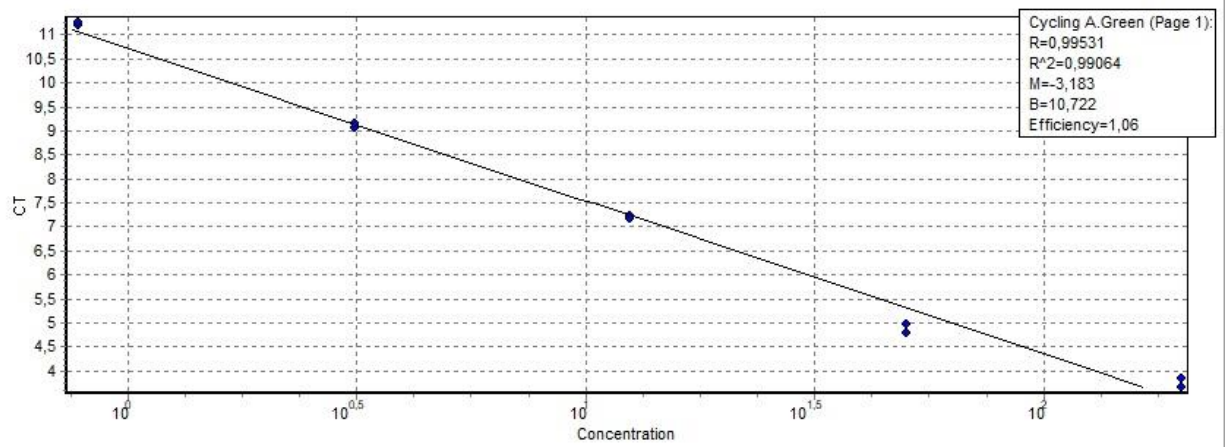


Abb. 120 housekeeping Gen DJZB qPCR Effizienz

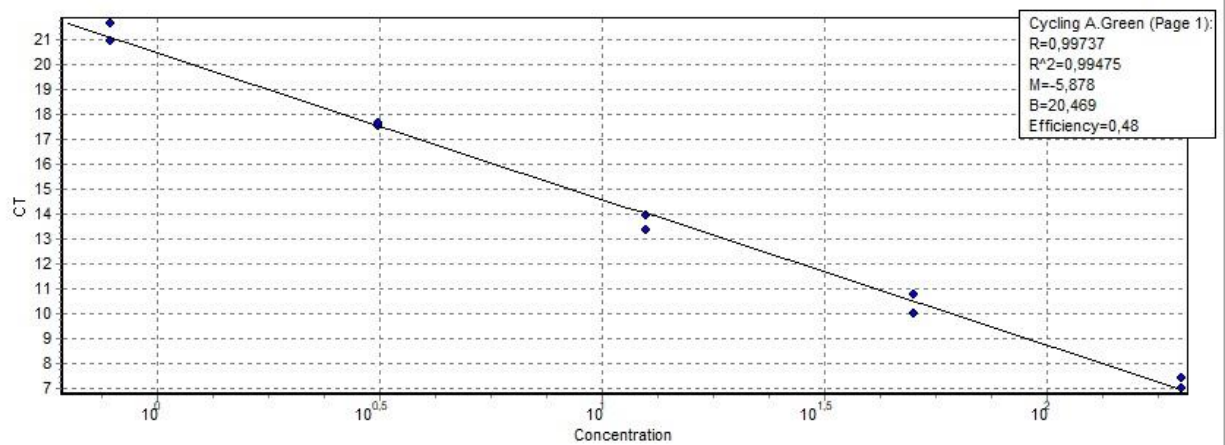


Abb. 121 housekeeping Gen DMZB qPCR Effizienz

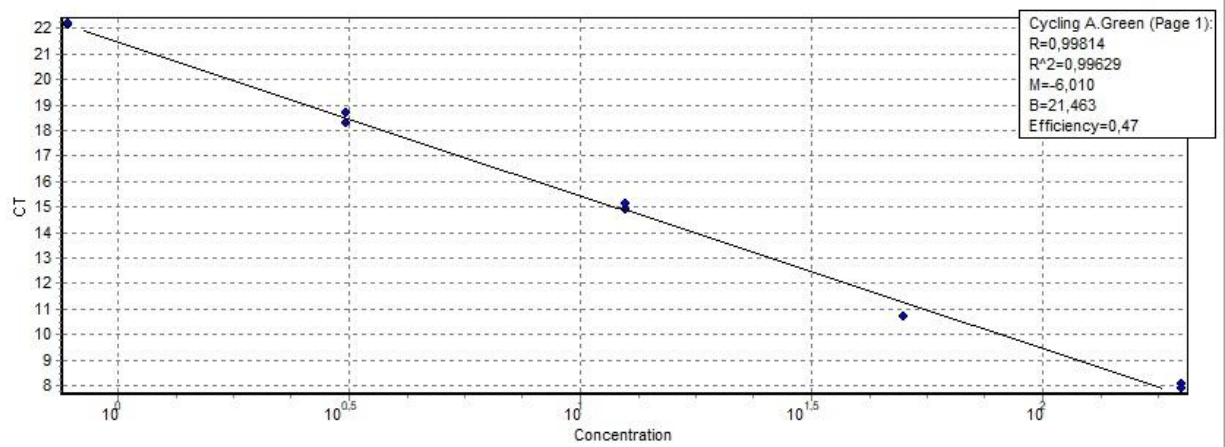


Abb. 122 housekeeping Gen DAZB qPCR Effizienz

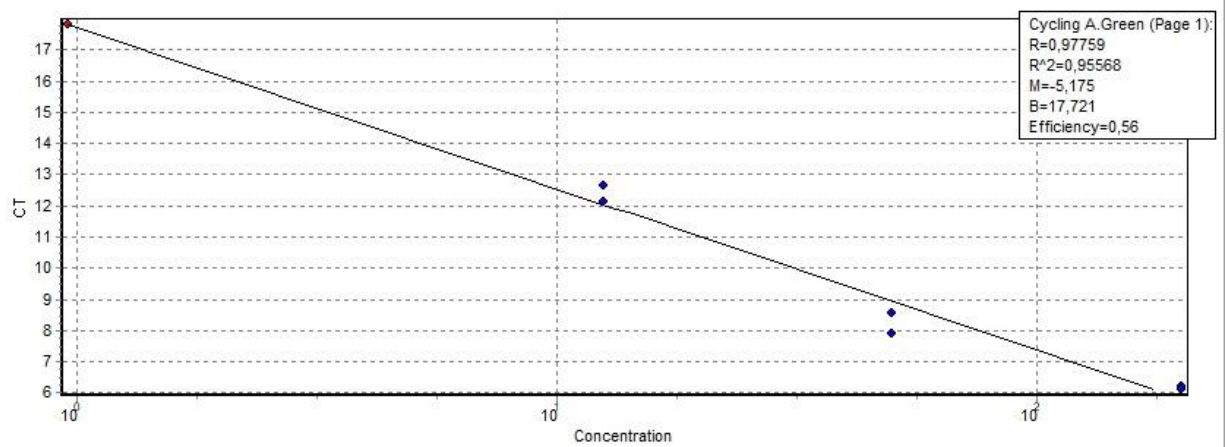


Abb. 123 housekeeping Gen DBL qPCR Effizienz

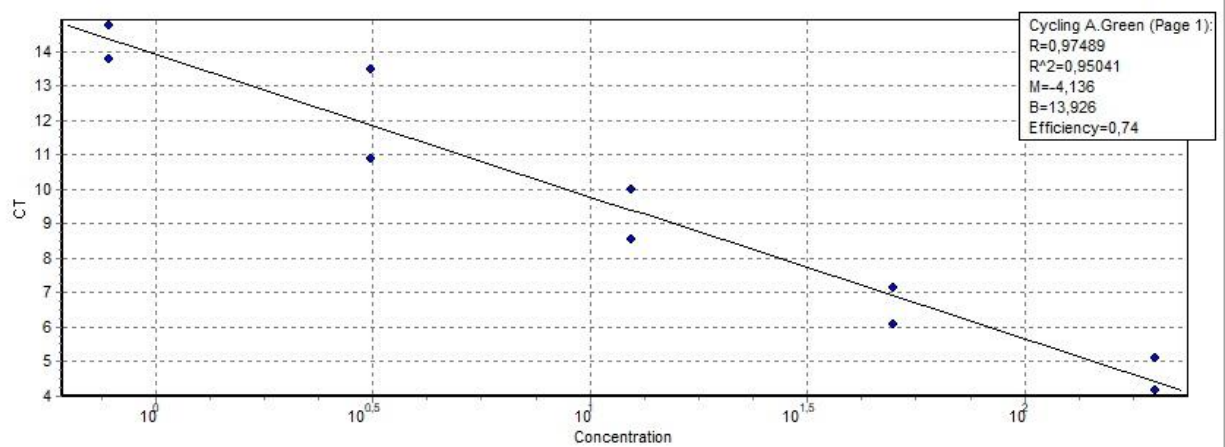


Abb. 124 housekeeping Gen BJBK qPCR Effizienz

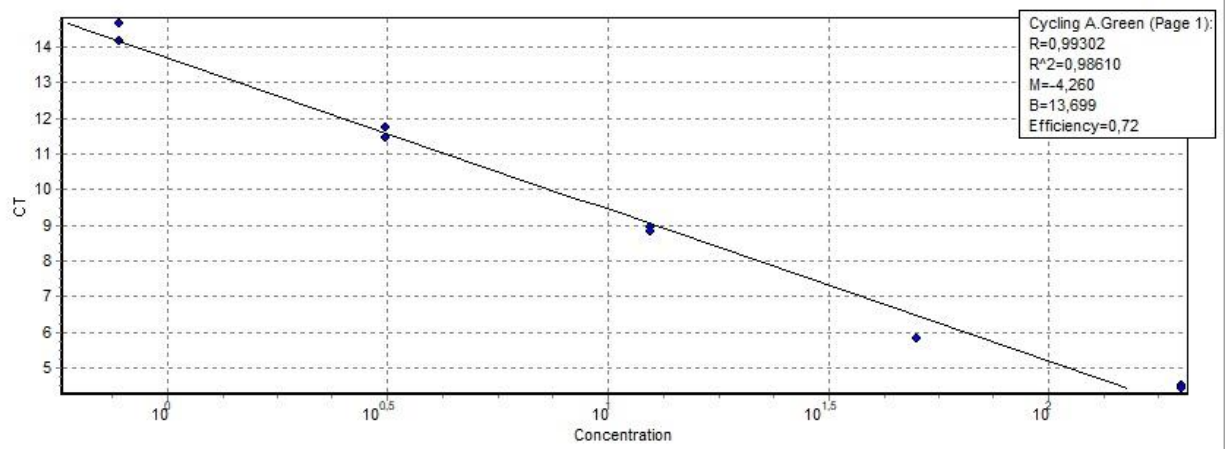


Abb. 125 housekeeping Gen BMBK qPCR Effizienz

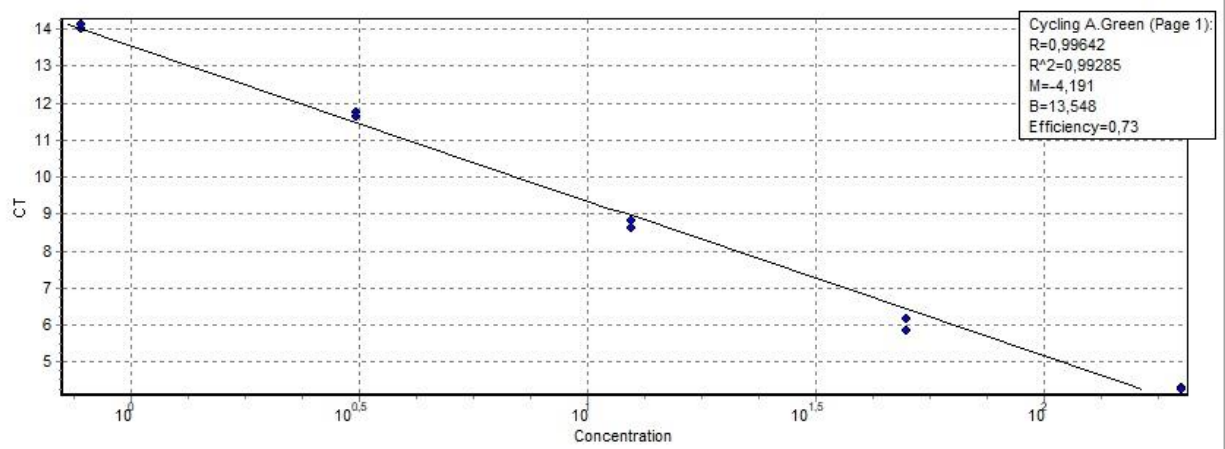


Abb. 126 housekeeping Gen BABK qPCR Effizienz

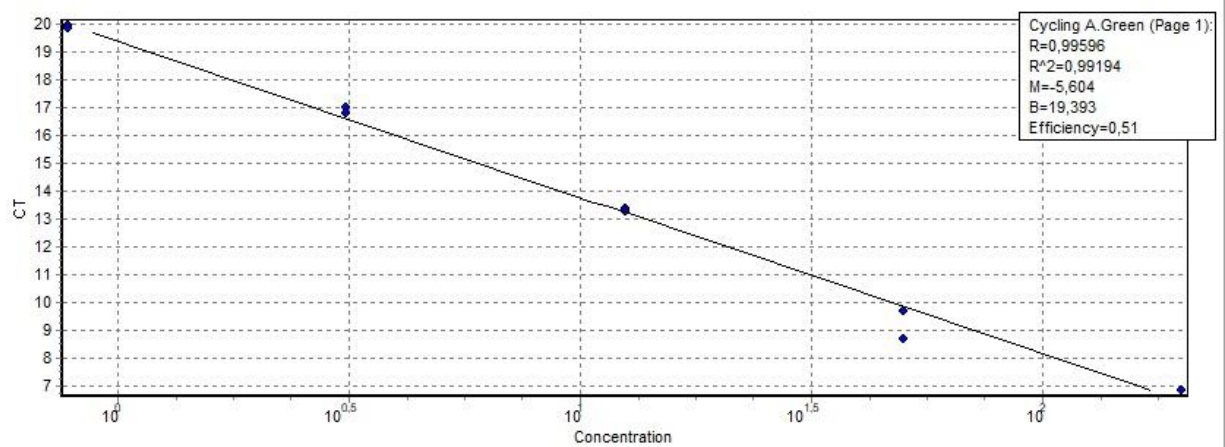


Abb. 127 housekeeping Gen BJZB qPCR Effizienz

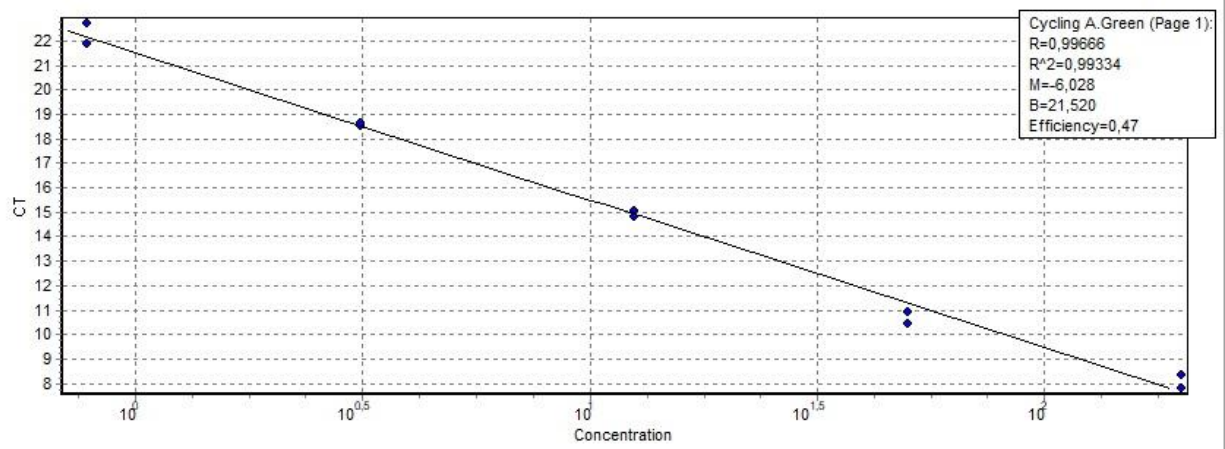


Abb. 128 housekeeping Gen BMZB qPCR Effizienz

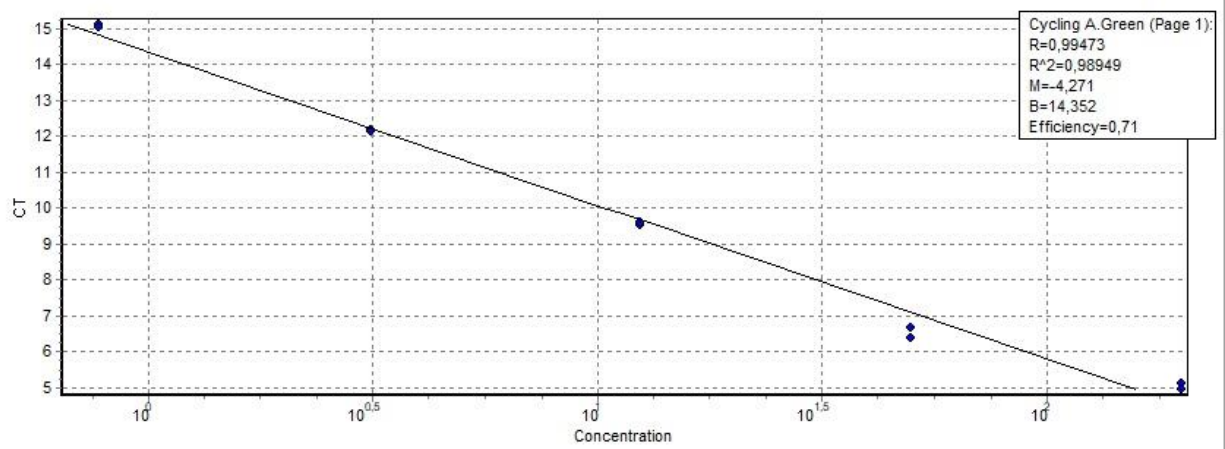


Abb. 129 housekeeping Gen BAZB qPCR Effizienz

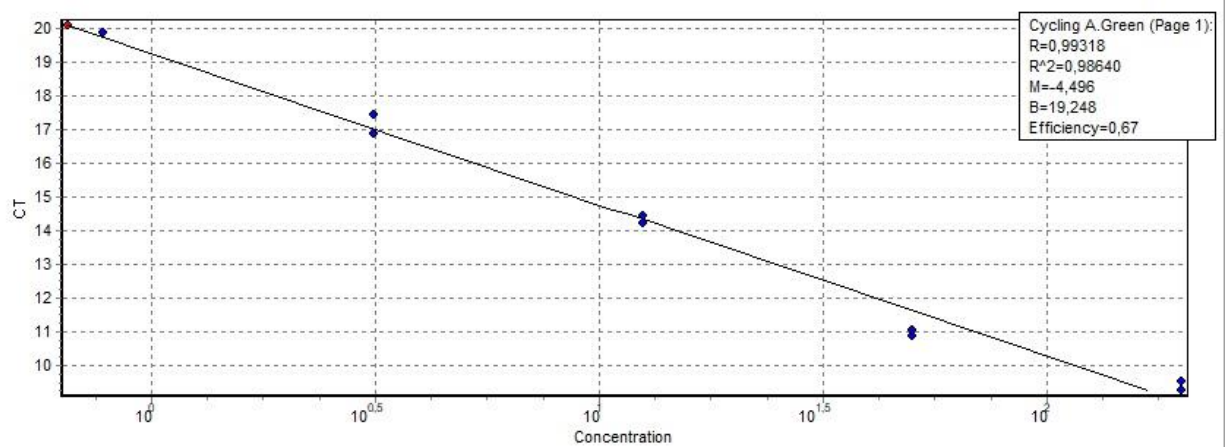


Abb. 130 housekeeping Gen BBL qPCR Effizienz

6 Literaturverzeichnis

- 1 Blaschek, et. Al: Wichtl – Teedrogen und Phytopharmaka: Matricariae flos 405-408 (2015)
- 2 Europäisches Arzneibuch: Monographie Kamillenblüten Matricariae flos 2968-2970 (8. Ausgabe 2015)
- 3 Abb. 1 Bisabolol: [https://de.wikipedia.org/wiki/\(%E2%80%93\)-%CE%B1-Bisabolol#/media/Da-tei:\(%E2%80%93\)-alpha-Bisabolol_Structural_Formula_V1.svg](https://de.wikipedia.org/wiki/(%E2%80%93)-%CE%B1-Bisabolol#/media/Da-tei:(%E2%80%93)-alpha-Bisabolol_Structural_Formula_V1.svg) (November 2021)
- 4 Abb. 2 Chamazulen: https://de.wikipedia.org/wiki/Chamazulen#/media/Datei:7-ethyl-1,4-dimethylazulene_200.svg (November 2021)
- 5 Habermehl G, Hammann P, Krebs H, Ternes W: Naturstoffchemie: 7 Flavonoide 467-483 (3 Auflage 2008)
- 6 Abb. 3 Flavan: https://www.researchgate.net/figure/The-molecular-structure-of-the-flavan-nucleus-Substituents-present-on-ring-C-define_fig1_309519634 (November 2021)
- 7 Abb. 4 Flavanon: https://de.wikipedia.org/wiki/Flavonoide#/media/Datei:Flavanone_num.svg (November 2021)
- 8 Abb. 5 Flavanonol: https://en.wikipedia.org/wiki/Flavanonol#/media/File:Flavanonol_num.svg (November 2021)
- 9 Abb. 6 Flavon: https://de.wikipedia.org/wiki/Flavone#/media/Datei:Flavon_num.svg (November 2021)
- 10 Abb. 7 Flavonol: https://en.wikipedia.org/wiki/Flavonols#/media/File:Flavonol_num.svg (November 2021)
- 11 Abb. 8 Apigenin: <https://de.wikipedia.org/wiki/Apigenin#/media/Datei:Apigenin.svg> (November 2021)
- 12 Abb. 9 Quercetin: <https://de.wikipedia.org/wiki/Quercetin#/media/Datei:Quercetin.svg> (November 2021)
- 13 Apigenin-7-Glucosid: <https://www.medchemexpress.com/Apigenin-7-glucoside.html> (November 2021)
- 14 Glykosyl-Vitexin: <https://de.m.wikipedia.org/wiki/Datei:Vitexin.png> (November 2021)
- 15 Anderson M, Markham K, Clifford M, Brown J.E.: Flavonoids Chemistry, Biochemistry and Applications: 6 Dietary Flavonoids and Health – Broadening the Perspective 331-339 (2006)
- 16 Mulinacci, N., Romani, A., Pinelli, P. et al. Characterization of Matricaria recutita L. Flower extracts by HPLC-MS and HPLC-DAD analysis. Chromatographia 51, 301–307 (2000)

- 17 Frank R, Schilcher H: Chamomile Industrial Profiles: Chapter 4.1.2: Active Chemical Constituents of *Matri-
caria chamomilla* L. Syn. *Chamomilla recutita* L Flavonoids 64-69 (2005)
- 18 Yonekura-Sakakibara K, Higashi Y, Nakabayashi R: Frontiers in plant science: The Origin and Evolution of Plant
Flavonoid Metabolism (August 2019)
- 19 Knippers R: Molekulare Genetik: Kap. 13 Transkription von Eukaryoten-Genen. Signaltransduktion und Regu-
lation genetischer Aktivität 369 (9. Auflage 2006)
- 20 Knippers R: Molekulare Genetik: Transkription, Translation und der genetische Code 49 (2006)
- 21 Jansohn M: Gentechnische Methoden – Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologi-
sche Labor: Kap. 4.1 Arbeiten mit RNA 131-136 (4. Auflage, 2007)
- 22 Jansohn M: Gentechnische Methoden – Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologi-
sche Labor: Kap. 4.4 Qualitätskontrolle und Lagerung der RNA-Präparation 149-151 (4. Auflage, 2007)
- 23 Knippers R: Molekulare Genetik: Kap. 10 Klonieren und Sequenzieren – Genombibliotheken 308-311 (9. Auf-
lage 2006)
- 24 Jansohn M: Gentechnische Methoden – Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologi-
sche Labor: 5.2.3.3 Quantifizierung von Zielnukleinsäuren 178-179 (4. Auflage, 2007)
- 25 ThermoFisher Scientific: Real Time PCR (qPCR Basics) [https://www.thermofisher.com/at/en/home/life-sci-
ence/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/essentials-real-time-pcr.html](https://www.thermofisher.com/at/en/home/life-sci-
ence/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/essentials-real-time-pcr.html) (Ok-
tober 2021)
- 26 Cepin, U: Biosistemika Blog: Understanding qPCR efficiency and why it can exceed 100% (11/2017)
- 27 Bustin A, Benes V, Garson J, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl M, Shipley G: Clini-
cal Chemistry, Volume 55, Issue 4: The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative
Real-Time PCR Experiments 611-622 (April 2009)
- 28 ThermoFisher Scientific: [https://www.thermofisher.com/at/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-
time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/absolute-vs-relative-quantification-real-time-pcr.html#4](https://www.thermofisher.com/at/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-
time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/absolute-vs-relative-quantification-real-time-pcr.html#4) (No-
vember 2021)
- 29 R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Compu-
ting, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/> (2021)

30 RStudio Team R. Studio: Integrated Development Environment for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/> (2020)

31 Steinhilber D, Dominik A: Instrumentelle Analytik – Kurzlehrbuch und kommentierte Originalfragen für Pharmazeuten: Kap 14 Grundlagen der Chromatographie 138-149 (2. Auflage 2002)

32 Ehlers E: Analytik II – Kurzlehrbuch Quantitative und instrumentelle pharmazeutische Analytik: 12.5.2 Methoden der Flüssigchromatographie 432-434 (9. Auflage 1999)

33 Kashchenko, N.I.; Olennikov, D.N. Russian Journal of Bioorganic Chemistry: 43, 783-789 (2017)

34 Xie, X.Y., Chen, F.F.; Shi, Y.P. Simultaneous Determination of Eight Flavonoids in the flowers of *Matricaria chamomilla* by High Performance Liquid Chromatography. Journal of AOAC International 97 778-783 (2014)

35 Statistikguru Hauptkomponentenanalyse: <https://statistikguru.de/spss/hauptkomponentenanalyse/einstieg-2.html> (November 2021)

36 Hein S: UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE FLAVONOIDE UND SAPONINE IN VERBASCUM–ARTEN, INSBESONDERE IN DEN BLÜTEN VON VERBASCUM PHLOMOIDES (1959)

37 Zhang S, Yang J, Hongquan L, Chiang V, Fu Y: Cooperative Regulation of Flavonoid and Lignin Biosynthesis in Plants; Critical Reviews in Plant Sciences, 40:2, 109-126 (2021)

38 Xiaojuan Yin, Tiantian Wang, Min Zhang, Yibing Zhang, Muhammad Irfan, Lijing Chen & Li Zhang: Role of core structural genes for flavonoid biosynthesis and transcriptional factors in flower color of plants, Biotechnology & Biotechnological Equipment, 35:1, 1214-1229 (2021)

39 Knott J: Biochemische Untersuchungen zur Flavonoidbiosynthese bei Rose und Kartoffel (2003)

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Kamillenpflanze der Sorte "Bona", Individuum "BO11/18"	6
Abb. 2 α -Bisabolol ³	6
Abb. 3 Chamazulen ⁴	6
Abb. 4 Grundkörper Flavan ⁶	8
Abb. 5 Flavanon ⁷	8
Abb. 6 Flavanonol ⁸	8
Abb. 7 Flavon ⁹	8
Abb. 8 Flavonol ¹⁰	8
Abb. 9 Flavon Apigenin ¹¹	9
Abb. 10 Flavonol Quercetin ¹²	9
Abb. 11 Apigenin-7-Glucosid ¹³	9
Abb. 12 Glycosyl Vitexin ¹⁴	9
Abb. 13 Phenolische Inhaltsstoffe von Kamillenblüten ¹⁶	10
Abb. 14 Flavonoidsynthese in Pflanzen ¹⁸	12
Abb. 15 Blütenköpfe in verschiedenen Reifestadien (links: junges Reifestadium, mittig: mittleres Reifestadium, rechts: altes Reifestadium)	15
Abb. 16 beispielhafte qPCR-Effizienzbestimmung (1CHS BK)	20
Abb. 17 Agarosegel RNA-Qualität 1	24
Abb. 18 Agarosegel RNA-Qualität 2	24
Abb. 19 Genexpression Chalconsynthase (RB ... Röhrenblüten, ZB ... Zungenblüten, LB ... erstes Laubblatt)	25
Abb. 20 Genexpression Chalconisomerase (RB ... Röhrenblüten, ZB ... Zungenblüten, LB ... erstes Laubblatt) ...	26
Abb. 21 Genexpression Flavanon-3-hydroxylase (RB ... Röhrenblüten, ZB ... Zungenblüten, LB ... erstes Laubblatt)	27
Abb. 22 Genexpression Flavonolsynthese (RB ... Röhrenblüten, ZB ... Zungenblüten, LB ... erstes Laubblatt)	28
Abb. 23 Genexpression Flavonsynthese (RB ... Röhrenblüten, ZB ... Zungenblüten, LB ... erstes Laubblatt)	29
Abb. 24 Genexpression Glycosyltransferase 1 (RB ... Röhrenblüten, ZB ... Zungenblüten, LB ... erstes Laubblatt)	30
Abb. 25 Genexpression Glycosyltransferase 2 (RB ... Röhrenblüten, ZB ... Zungenblüten, LB ... erstes Laubblatt)	30
Abb. 26 Genexpression Glycosyltransferase 3 (RB ... Röhrenblüten, ZB ... Zungenblüten, LB ... erstes Laubblatt)	31
Abb. 27 Genexpression Transkriptionsfaktor MYB (RB ... Röhrenblüten, ZB ... Zungenblüten, LB ... erstes Laubblatt)	32
Abb. 28 Genexpression Transkriptionsfaktor WD40 (RB ... Röhrenblüten, ZB ... Zungenblüten, LB ... erstes Laubblatt)	32
Abb. 29 PCA-Biplot aller Proben (die großen Kreise zeigen die Positionen der Gruppenzentroide an)	34
Abb. 30 PCA-Biplot der Röhrenblüten (die großen Kreise zeigen die Positionen der Gruppenzentroide an)	34
Abb. 31 PCA-Biplot der Zungenblüten (die großen Kreise zeigen die Positionen der Gruppenzentroide an)	35
Abb. 32 PCA-Biplot Blätter (die großen Kreise zeigen die Positionen der Gruppenzentroide an)	35

Abb. 33 Gesamtflavonoidgehalte der beiden Individuen und einzelnen Fraktionen in Relation zum jungen Blatt von DEG8 (RB ... Röhrenblüten, ZB ... Zungenblüten, LB ... Laubblätter)	36
Abb. 34 Flavongehalt der beiden Individuen und einzelnen Fraktionen (RB ... Röhrenblüten, ZB ... Zungenblüten, LB ... Laubblätter)	37
Abb. 35 Gehalt an Apigenin + Apigeninglykoside der beiden Individuen und einzelnen Fraktionen (RB ... Röhrenblüten, ZB ... Zungenblüten, LB ... Laubblätter)	38
Abb. 36 Gehalt an Luteolin und Luteolinglykoside der beiden Individuen und einzelnen Fraktionen (RB ... Röhrenblüten, ZB ... Zungenblüten, LB ... Laubblätter)	39
Abb. 37 Flavonoide mit max. UV bei 328nm der beiden Individuen und einzelnen Fraktionen (RB ... Röhrenblüten, ZB ... Zungenblüten, LB ... Laubblätter)	40
Abb. 38 Nicht gruppierbare Flavonoide der beiden Individuen und einzelnen Fraktionen (RB ... Röhrenblüten, ZB ... Zungenblüten, LB ... Laubblätter)	41
Abb. 39 PCA-Biplot Flavonoide, Farbe nach Genotyp	42
Abb. 40: PCA-Biplot Flavonoide, Farbe nach Typ des Blattes (LB ... junges Laubblatt, RB ... Röhrenblüten, ZB ... Zungenblüten)	43
Abb. 41 Heatmap der Korrelationen zwischen den Kandidatengen (Var1) und den Flavonoiden (Var2) in den Röhrenblüten	44
Abb. 42 Heatmap der Korrelationen zwischen den Kandidatengen (Var1) und den Flavonoiden (Var2) in den Zungenblüten	45
Abb. 43 Protokoll cDNA Synthese	50
Abb. 44 Protokoll cDNA Synthese 2	51
Abb. 45 Enzym 2 DEG8 qPCR log	52
Abb. 46 Enzym 2 BO11/18 qPCR log	52
Abb. 47 Enzym 2 DEG8 linear	52
Abb. 48 Enzym 2 BO 11/18 qPCR linear	52
Abb. 49 Enzym 3 DEG8 qPCR log	53
Abb. 50 Enzym 3 BO11/18 qPCR log	53
Abb. 51 Enzym 3 DEG8 qPCR linear	53
Abb. 52 Enzym 3 BO11/18 qPCR linear	53
Abb. 53 Enzym 4 DEG8 qPCR log	54
Abb. 54 Enzym 4 BO11/18 qPCR log	54
Abb. 55 Enzym 4 DEG8 qPCR linear	54
Abb. 56 Enzym 4 BO11/18 qPCR linear	54
Abb. 57 Enzym 5 DEG8 qPCR log	55
Abb. 58 Enzym 5 BO11/18 qPCR log	55
Abb. 59 Enzym 5 DEG8 qPCR linear	55
Abb. 60 Enzym 5 BO11/18 qPCR linear	55
Abb. 61 Enzym 8 DEG8 qPCR log	56
Abb. 62 Enzym 8 BO11/18 qPCR log	56
Abb. 63 Enzym 8 DEG8 qPCR linear	56
Abb. 64 Enzym 8 BO11/18 qPCR linear	56
Abb. 65 Enzym 1 DEG8 BK qPCR Effizienz	57
Abb. 66 Enzym 1 DEG8 ZB qPCR Effizienz	57

Abb. 67 Enzym 1 BO11/18 ZB qPCR Effizienz.....	57
Abb. 68 Enzym 1 DEG8 Blätter qPCR Effizienz	58
Abb. 69 Enzym 1 BO11/18 Blätter qPCR Effizienz	58
Abb. 70 Enzym 2 DEG8 BK qPCR Effizienz	58
Abb. 71 Enzym 2 BO11/18 BK qPCR Effizienz.....	59
Abb. 72 Enzym 2 DEG8 ZB qPCR Effizienz	59
Abb. 73 Enzym 2 BO11/18 ZB qPCR Effizienz.....	59
Abb. 74 Enzym 2 DEG8 Blätter qPCR Effizienz	60
Abb. 75 Enzym 2 BO11/18 Blätter qPCR Effizienz	60
Abb. 76 Enzym 3 DEG8 BK qPCR Effizienz	60
Abb. 77 Enzym 3 BO11/18 BK qPCR Effizienz.....	61
Abb. 78 Enzym 3 DEG8 ZB qPCR Effizienz	61
Abb. 79 Enzym 3 BO11/18 ZB qPCR Effizienz.....	61
Abb. 80 Enzym 3 DEG8 Blätter qPCR Effizienz	62
Abb. 81 Enzym 3 BO11/18 Blätter qPCR Effizienz	62
Abb. 82 Enzym 4 DEG8 BK qPCR Effizienz	62
Abb. 83 Enzym 4 BO11/18 BK qPCR Effizienz.....	63
Abb. 84 Enzym 4 DEG8 ZB qPCR Effizienz	63
Abb. 85 Enzym 4 BO11/18 ZB qPCR Effizienz.....	63
Abb. 86 Enzym 4 DEG8 Blätter qPCR Effizienz	64
Abb. 87 Enzym 4 BO11/18 Blätter qPCR Effizienz	64
Abb. 88 Enzym 5 DEG8 BK qPCR Effizienz	64
Abb. 89 Enzym 5 BO11/18 BK qPCR Effizienz.....	65
Abb. 90 Enzym 5 DEG8 ZB qPCR Effizienz	65
Abb. 91 Enzym 5 BO11/18 ZB qPCR Effizienz.....	65
Abb. 92 Enzym 5 DEG8 Blätter qPCR Effizienz	66
Abb. 93 Enzym 5 BO11/18 Blätter qPCR Effizienz	66
Abb. 94 Enzym 6 DEG8 BK qPCR Effizienz	66
Abb. 95 Enzym 6 BO11/18 BK qPCR Effizienz.....	67
Abb. 96 Enzym 6 DEG8 ZB qPCR Effizienz	67
Abb. 97 Enzym 6 BO11/18 ZB qPCR Effizienz.....	67
Abb. 98 Enzym 6 DEG8 Blätter qPCR Effizienz	68
Abb. 99 Enzym 6 BO11/18 Blätter qPCR Effizienz	68
Abb. 100 Enzym 7 DEG8 BK qPCR Effizienz	68
Abb. 101 Enzym 7 BO11/18 BK qPCR Effizienz.....	69
Abb. 102 Enzym 7 DEG8 Blätter qPCR Effizienz	69
Abb. 103 Enzym 7 BO11/18 Blätter qPCR Effizienz	69
Abb. 104 Enzym 8 BO11/18 BK qPCR Effizienz.....	70
Abb. 105 Enzym 8 DEG8 ZB qPCR Effizienz	70
Abb. 106 Enzym 8 BO11/18 ZB qPCR Effizienz.....	70
Abb. 107 Enzym 8 DEG8 Blätter qPCR Effizienz	71
Abb. 108 Enzym 8 BO11/18 Blätter qPCR Effizienz	71
Abb. 109 Enzym 9 DEG8 BK qPCR Effizienz	71

Abb. 110 Enzym 9 BO11/18 BK qPCR Effizienz.....	72
Abb. 111 Enzym 9 DEG8 ZB qPCR Effizienz	72
Abb. 112 Enzym 9 BO11/18 ZB qPCR Effizienz.....	72
Abb. 113 Enzym 9 BO11/18 Blätter qPCR Effizienz	73
Abb. 114 Enzym 10 DEG8 BK qPCR Effizienz	73
Abb. 115 Enzym 10 BO11/18 BK qPCR Effizienz.....	73
Abb. 116 Enzym 10 BO11/18 ZB qPCR Effizienz.....	74
Abb. 117 housekeeping Gen DJBK qPCR Effizienz.....	74
Abb. 118 housekeeping Gen DMBK qPCR Effizienz.....	74
Abb. 119 housekeeping Gen DABK qPCR Effizienz.....	75
Abb. 120 housekeeping Gen DJZB qPCR Effizienz	75
Abb. 121 housekeeping Gen DMZB qPCR Effizienz.....	75
Abb. 122 housekeeping Gen DAZB qPCR Effizienz	76
Abb. 123 housekeeping Gen DBL qPCR Effizienz	76
Abb. 124 housekeeping Gen BJBK qPCR Effizienz	76
Abb. 125 housekeeping Gen BMBK qPCR Effizienz	77
Abb. 126 housekeeping Gen BABK qPCR Effizienz	77
Abb. 127 housekeeping Gen BJZB qPCR Effizienz	77
Abb. 128 housekeeping Gen BMZB qPCR Effizienz	78
Abb. 129 housekeeping Gen BAZB qPCR Effizienz	78
Abb. 130 housekeeping Gen BBL qPCR Effizienz.....	78