

**Phytochemische und molekulare Untersuchungen zur Regulation
der Anthocyanbiosynthese in verschiedenfarbigen
tetraploiden Kartoffelakzessionen (*Solanum tuberosum* L.)
und die Rolle der Flavonoid-3',5'-hydroxylase**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Anne Oertel

Kiel, 2020

Erster Gutachter: PD Dr. Hans-Peter Mock

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Dietrich Ober

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Januar 2020

Zum Druck genehmigt: 17. Januar 2020

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Anthocyane	1
1.1.1. Struktur und Eigenschaften	1
1.1.2. Funktionen	5
1.1.3. Anthocyanbiosynthese	6
1.1.4. Regulation der Anthocyanbiosynthese	8
1.1.4.1. Regulatorische Funktion der Schlüsselenzyme	9
1.1.4.2. Regulation durch transkriptionelle Kontrollmechanismen	9
1.2. Anthocyanhaltige Kartoffeln als Modellorganismus	10
1.2.1. Kartoffel – <i>Solanum tuberosum</i> L.	11
1.2.1.1. Ursprung und Taxonomie	11
1.2.1.2. Kartoffelgenom	12
1.2.1.3. Die Kartoffel als Grundnahrungsmittel	13
1.2.2. Anthocyane in Kartoffelknollen	13
1.3. Flavonoid-3',5'-hydroxylase (F3'5'H)	16
1.3.1. Die F3'5'H als Schlüsselenzym der Anthocyanbiosynthese	16
1.3.2. Mechanismus, Aktivität und Regulation der F3'5'H	16
1.3.3. <i>Solanum tuberosum</i> Flavonoid-3',5'-hydroxylase (StF3'5'H)	19
1.4. Zielsetzung	22
2. Material und Methoden	24
2.1. Pflanzenmaterial	24
2.1.1. Kartoffelakzessionen	24
2.1.2. Anzuchtbedingungen und Knollenernte	24
2.1.3. Aufarbeitung des Knollenmaterials	26
2.2. Methoden zur phytochemischen Charakterisierung verschiedener Kartoffelgewebe	27
2.2.1. Extraktion von Anthocyanen und anderen Polyphenolen	27
2.2.2. LC-UV/MS Metabolitprofilanalyse	28
2.2.3. LC-MS/MS Metabolitprofilanalyse	29
2.3. Molekularbiologische Standardmethoden	31
2.3.1. Präparation von genomischer DNA aus Blattmaterial	31
2.3.2. Isolierung von Gesamt-RNA aus Kartoffelknollengewebe	32
2.3.3. Bestimmung der Konzentration und Qualität von Nukleinsäuren	33
2.3.4. Reverse Transkription	33

2.3.5.	PCR	33
2.3.5.1.	<i>Touch down</i> -PCR	33
2.3.5.2.	qRT-PCR	34
2.3.5.3.	Verwendete Oligonukleotide	37
2.3.6.	Agarosegelelektrophorese	38
2.3.7.	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	40
2.3.8.	Sequenzierung einzelner <i>Stf3</i> '5 <i>h</i> -Allele	40
2.3.9.	Southern Blot	41
2.4.	Methoden zur Proteinanalyse	42
2.4.1.	Proteinextraktion	42
2.4.2.	Proteinquantifizierung	43
2.4.3.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	43
2.4.4.	Anfärbung von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen	44
2.4.5.	Nachweis von Proteinen durch Western Blot-Hybridisierung	44
2.4.6.	LC-MS Proteinanalyse	46
2.4.7.	<i>In silico</i> -Analyse von Proteinen	49
3.	Ergebnisse	50
3.1.	Untersuchung der phytochemischen Diversität anthocyanhaltiger Kartoffelsorten	50
3.1.1.	Nachweis gewebe- und kultivarspezifischer Polyphenolmuster mittels LC-UV/MS	52
3.1.2.	Auswahl von Genotypen mit den größten Unterschieden im Anthocyanprofil zur quantitativen LC-MS/MRM Profilanalyse	53
3.1.3.	Etablierung einer LC-MS/MRM-Methode zur Analyse komplex dekoriertes Kartoffelanthocyane	55
3.1.3.1.	Allgemeine Faktoren der MRM-Methodenentwicklung	56
3.1.3.2.	Metabolitannotation durch Auswahl indikativer molekularer Ionen zur LC-MS/MRM-Analyse	56
3.1.4.	Bestätigung gewebe- und kultivarspezifischer Polyphenolmuster und Indikation spezifischer Korrelationen zwischen Anthocyanen und anderen Polyphenolen mittels LC-MS/MRM	59
3.1.5.	Nachweis signifikanter Korrelationen zwischen Polyphenolen	62
3.2.	Evaluierung molekularer Unterschiede der Anthocyanbiosynthese in verschiedenfarbigen Kartoffeln – Untersuchungen zur Rolle der Flavonoid-3',5'-hydroxylase (F3'5'H)	65
3.2.1.	Identifizierung allelischer Varianten des <i>Stf3</i> '5 <i>h</i> -Gens in repräsentativen, kontrastierenden Kartoffelknollenphänotypen	65
3.2.1.1.	Auswahl repräsentativer Phänotypen zur genomischen Analyse des <i>Stf3</i> '5 <i>h</i> -Locus	66

3.2.1.2. Isolierung und Charakterisierung einzelner <i>Stf3'5'h</i> -Allele	67
3.2.1.3. <i>In silico</i> -Untersuchung transkriptionsregulatorischer Bereiche des <i>Stf3'5'h</i> -Locus hinsichtlich allelbezogener Unterschiede	72
3.2.1.4. <i>In silico</i> -Analyse putativer, allelbezogener <i>StF3'5'H</i> -Proteinvarianten	73
3.2.2. Bestimmung der Kopienzahl des <i>Stf3'5'h</i> -Gens in kontrastierenden Kartoffelknollenphänotypen	77
3.2.3. Nachweis quantitativer Unterschiede der <i>Stf3'5'h</i> -Transkriptexpression zwischen verschiedenen Kartoffelknollengeweben	78
3.2.3.1. Auswahl von repräsentativem Kartoffelknollenmaterial zur <i>Stf3'5'h</i> -Expressionsanalyse	79
3.2.3.2. Vergleichende, quantitative Expressionsanalyse des <i>Stf3'5'h</i> -Gens in sieben ausgewählten Kartoffelakzessionen mittels qRT-PCR	82
3.2.4. Nachweis des <i>StF3'5'H</i> -Proteins in verschiedenfarbigen Knollengeweben ausgewählter Kartoffellinien	84
3.2.4.1. Immunodetektion des <i>StF3'5'H</i> -Proteins mittels Western Blot-Analyse	85
3.2.4.2. LC-MS-basierter Nachweis der <i>StF3'5'H</i> in blau-violettem und rotem Kartoffelknollengewebe	88
3.2.5. Identifizierung von Proteinen mit unterschiedlicher Beteiligung an Anthocyanbiosynthese oder -akkumulation in verschiedenfarbigen Kartoffelknollen	91
3.2.6. Analyse der Abundanz von Dihydroflavonolvorstufen für die Synthese verschiedener Anthocyantypen	96
3.2.7. LC-MS-Analyse von Anthocyanen und indirekter Nachweis von <i>StF3'5'H</i> -Aktivität in Trieben gelber Kartoffelknollen	97
4. Diskussion	99
4.1. Ein hohes Maß phytochemischer Diversität bedingt die phänotypische Vielfalt der Knollengewebe von <i>Solanum tuberosum</i>	99
4.1.1. Kartoffelgenotypen zeigen eine hohe Variabilität der Anthocyanakkumulation	99
4.1.2. Identifizierung bisher nicht für Kartoffelknollen bekannter Anthocyane	101
4.1.3. Bestimmte Kartoffelanthocyane zeigen eine Gewebetypspezifität	102
4.1.4. Die Abundanz bestimmter Kartoffelknollenpolyphenole korreliert mit Gewebetyp und Färbung	102
4.1.5. Umweltbedingungen und Vererbungsregeln können Anthocyanmuster in farbigen Kartoffeln beeinflussen	104
4.2. Die Diversität regulatorischer Mechanismen der Anthocyanbiosynthese innerhalb der Spezies <i>Solanum tuberosum</i>	106
4.2.1. Wie ausgeprägt ist die Schlüsselfunktion der Flavonoid-3',5'-hydroxylase in der Anthocyanbiosynthese von Kartoffelknollen?	109
4.2.1.1. Mehrere Genloci und eine Vielzahl verschiedener Allele des <i>Stf3'5'h</i> -Gens existieren im Genom tetraploider <i>S. tuberosum</i> -Spezies	110

4.2.1.2. Keine signifikanten Anzeichen für eine unterschiedliche direkte F3'5'H-Regulation auf DNA-Ebene in farblich kontrastierenden Kartoffelknollengeweben	112
4.2.1.2.1. Sequenzpolymorphismen akkumulieren vornehmlich in nichtkodierenden Bereichen des <i>Stf3'5'h</i> -Locus	112
4.2.1.2.2. Somatische Mutationen bestimmen die Heterozygotie des <i>Stf3'5'h</i> -Gens	114
4.2.1.2.3. Beeinflussen regulatorische <i>Stf3'5'h</i> -Polymorphismen oder -Dosiseffekte die Farbvarianz von Kartoffelknollen?	116
4.2.1.3. Beobachtung einer möglichen genotypspezifischen Regulation der <i>StF3'5'H</i> auf DNA-Ebene	117
4.2.1.4. Entwicklungs-, Gewebe- und Genotypabhängigkeit des <i>Stf3'5'h</i> -Transkriptlevels in Kartoffelknollen	120
4.2.1.5. Unterschiede in der <i>Stf3'5'h</i> -Transkriptabundanz verschiedener Kartoffelknollenproben zeigen keinen offensichtlichen Bezug zu deren Anthocyankomposition und Färbung	123
4.2.1.6. Die Regulation der <i>StF3'5'H</i> in anthocyanhaltigen Kartoffelknollen findet vermutlich auf einer der Transkription nachgeschalteten Ebene statt	124
4.2.1.7. Auch rote Kartoffelknollengewebe beinhalten funktionale F3'5'H-Proteine	126
4.2.2. Welche anderen Einflussgrößen bestimmen die Regulation der Synthese blauer/violetter Anthocyane in Kartoffelknollen?	128
4.2.2.1. Vermutung der Konkurrenz zwischen <i>StF3'5'H</i> und vorgeschalteten Enzymen im Anthocyan- beziehungsweise Flavonoidbiosyntheseweg	129
4.2.2.2. Möglicher Einfluss <i>StF3'5'H</i> -nachgeschalteter Enzyme auf die Akkumulation blauer/violetter Anthocyane	131
4.2.2.3. Komplexe Wechselwirkungen im Flavonoidbiosyntheseweg beeinflussen die differenzielle Ausprägung der Anthocyanprofile in Kartoffelknollen	135
5. Zusammenfassung	137
6. Summary	139
7. Ausblick	141
I. Abkürzungsverzeichnis	143
II. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	145
III. Literaturverzeichnis	147
IV. Appendix	158
Eidesstattliche Erklärung	179

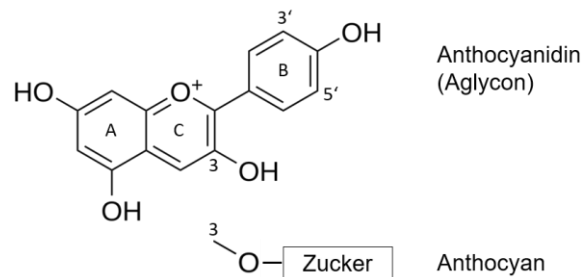
1. Einleitung

1.1. Anthocyane

1.1.1. Struktur und Eigenschaften

Grundstruktur

Anthocyane sind glycosidische, wasserlösliche Pigmente, die einer Vielzahl an Früchten und Blüten eine rote, blaue oder violette Färbung verleihen (Strack 1994). Die gute Wasserlöslichkeit ist bedingt durch einen glycosidisch gebundenen Zuckerrest, wohingegen die Färbung auf den zuckerfreien Teil des Moleküls, das chromophore Anthocyanidin (Aglycon), zurückzuführen ist (Castaneda-Ovando *et al.* 2009) (Abb. 1). Dieses besitzt das für Flavonoide typische $C_6C_3C_6$ -Kohlenstoffgerüst sowie die resonierende Struktur des Flavyliumkations, die dem Molekül die Absorption von Licht im sichtbaren Bereich zwischen 450 nm und 650 nm ermöglicht (Pauling 1939).



Anthocyanidin	Substituent	Farbe
Pelargonidin	-	orange-rot
Cyanidin	3'-OH	rot
Peonidin	3'-OCH ₃	pink
Delphinidin	3'-OH, 5'-OH	blau
Petunidin	3'-OCH ₃ , 5'-OH	violett
Malvidin	3'-OCH ₃ , 5'-OCH ₃	lila

Abb. 1: Pigmentvariation durch verschiedene Hydroxylierungs- und Methylierungsmuster am B-Ring des Flavonoidgerüsts. A: Phloroglucin-Ring; B: Hydrochinon-Ring; C: Pyrylium-Ring.

Von den 27 bekannten, natürlichen Anthocyanidinen (Andersen und Jordheim 2013) kommen hauptsächlich sechs in der freien Natur vor. Diese sind Pelargonidin, Cyanidin, Peonidin, Delphinidin, Petunidin und Malvidin (Strack *et al.* 1992) (Abb. 1). Anthocyanidine

sind aufgrund ihrer Instabilität jedoch nur selten in freier Form zu finden (Sigurdson *et al.* 2018). Sekundäre Modifikationen des Anthocyanidingrundgerüsts, wie das Anfügen von Zuckern, Methyl- und Acylgruppen, erhöhen die Stabilität dieser Moleküle. Es entstehen so die stabileren, frei in der Pflanzenzelle vorkommenden Anthocyane.

Sekundäre Modifikationen

Anthocyanpigmente sind pflanzliche Sekundärmetabolite, gehören zur Gruppe der Flavonoide und weisen eine hohe Diversität auf. Bislang konnten etwa 700 Anthocyane identifiziert werden, die sich in ihrem grundlegenden Hydroxylierungs- und Methylierungsmuster (Abb. 1), in der Form der Glycosylierung und Acylierung und folglich in ihrer Färbung unterscheiden (He und Giusti 2010). Die Varianz dieser Pigmentarten entsteht durch sekundäre Modifikationen, wie in erster Instanz der Hydroxylierung, katalysiert durch verschiedene Enzyme (Abb. 2). Solche strukturellen Modifikationen beeinflussen die Stabilität und Reaktivität der Anthocyane, sowie deren chromatische Eigenschaften. Zudem haben derartige Modifikationen Auswirkungen auf die Fähigkeit dieser Pigmente zur Interaktion mit anderen Molekülen (z. B. Kopigmentierung, oder Komplexierung mit Metallionen) und deren Bioverfügbarkeit in der Ernährung (Tanaka und Brugliera 2007; Fournier-Level *et al.* 2011).

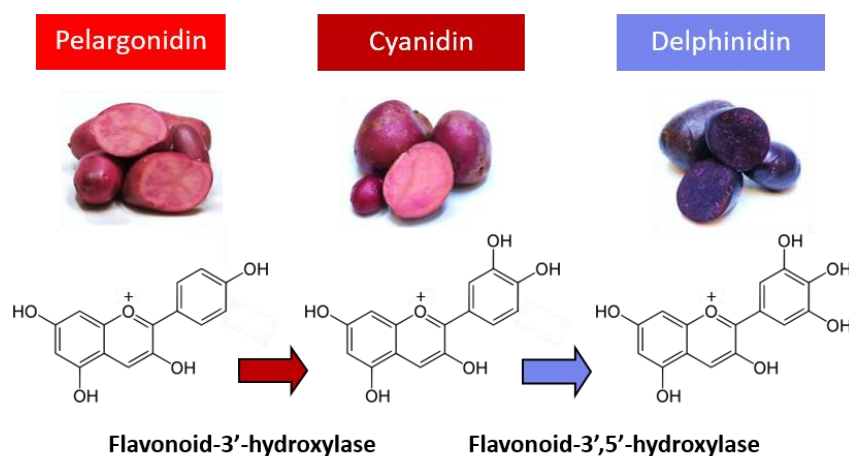


Abb. 2: Variationen im Farbspektrum, hervorgerufen durch sekundäre Modifikationen wie der Hydroxylierung durch verschiedene Enzyme, welche die chromatischen Eigenschaften der Pigmente beeinflussen.

Methylierung

In der Natur liegen hauptsächlich nur drei Typen von Anthocyanidinen in methylierter Form vor. Diese sind Peonidin (3'-OCH₃), Petunidin (3'-OCH₃) und Malvidin (3'-OCH₃, 5'-OCH₃), welchen die Methylierung am Hydrochinon-Ring (B-Ring) des Molekülgerüsts gemein ist (Andersen und Jordheim 2006) (Abb. 1). Die Methylierung des B-Ringes erhöht dessen Stabilität, reduziert dabei die Reaktivität der Anthocyanidine bzw. der Anthocyane und erhöht gleichfalls deren Wasserlöslichkeit (Dangles *et al.* 1993). Die Substitution von Methylgruppen am Anthocyanmolekül erfolgt durch Anthocyanidinglycosid-O-methyltransferasen (AGMT; auch Anthocyan-O-methyltransferase) (Huguene *et al.* 2009).

Glycosylierung

Uridindiphosphat (UDP) -abhängige Glycosyltransferasen (UGTs) katalysieren die Übertragung von Zuckerresten eines UDP-Zuckers auf das Anthocyanidinmolekül. Die Glycosylierung an der OH-Gruppe in Position 3 des C-Ringes, mit einem oder mehreren Zuckerresten, ist dabei am häufigsten und zudem ubiquitär verbreitet (Abb. 1). UGTs weisen ein breites Substratspektrum auf. In diversen Pflanzenspezies erfolgt die Substitution von Monosacchariden wie Glukose, Galactose, Rhamnose, Arabinose, Xylose oder Disacchariden wie Rutinose (Disaccharid aus Rhamnose und Glukose), Sambubiose (Disaccharid aus Xylose und Glukose) oder Sophorose (β -1,2-verknüpfte Glukose). Darunter tritt die Glycosidbildung mit Glukose, mit etwa 90 %, am häufigsten auf (Fischer und Glomb 2015). Glycosylierung steigert die Anthocyanstabilität (Jones und Vogt 2001; Borkowski *et al.* 2005) und erhöht die Polarität und somit auch die Löslichkeit des Anthocyanmoleküls (Timberlake und Bridle 1966; Jones und Vogt 2001). Frühere Studien zeigten darüber hinaus die Bedeutung der Glycosylierungsreaktion beim Transport der Anthocyane in die Vakuole als Speicherort (Ono *et al.* 2006) sowie bei der Anthocyanakkumulation (Boss *et al.* 1996) auf.

Acylierung

Acylierung der Glycosylgruppe des Anthocyanmoleküls bewirkt eine zusätzliche Erhöhung der Molekülstabilität und erfolgt zumeist an der C3-Position des Zuckers (Harborne 1964; Saito *et al.* 1988; Suzuki *et al.* 2002). Das Anfügen von Acylgruppen, übertragen von Acyl-Coenzym A auf die Hydroxylgruppe des Glycosylrestes, erfolgt durch Esterbrückenbindung und wird durch Anthocyanacyltransferasen katalysiert (Springob *et al.* 2003). Es gibt dabei zwei Arten von Acyl-Substitutionen: aromatische und aliphatische Acylierung (Andersen und

Jordheim 2010; Zhang *et al.* 2014). Die Zuckerreste sind üblicherweise acyliert mit aromatischen Phenolcarbonsäuren, wie *p*-Cumarsäure (4-Hydroxyzimtsäure), Kaffeesäure (3,4-Dihydroxyzimtsäure), Ferulasäure (4-Hydroxy-3-methoxyzimtsäure), Sinapinsäure (trans-3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure), oder mit aliphatischen Dicarbonsäuren wie Malonsäure und Essigsäure (Shahidi und Naczk 2004; Fischer und Glomb 2015). Aliphatische Acylierung erhöht zudem die Polarität und somit die Löslichkeit der Anthocyanpigmente in wässriger Lösung (Heller und Forkmann 1994). Darüber hinaus wurde der aliphatischen Acylierung eine Bedeutung bei der Aufnahme der Anthocyane in die Vakuole zugeschrieben (Hopp und Seitz 1987), ebenso wie eine Schutzfunktion der so gespeicherten Glycoside gegen die enzymatische Degradation durch Glycosidasen in der Vakuole (Suzuki *et al.* 2002).

Einfluss von pH-Wert, Kopigmentierung und Metallkomplexierung

Neben der Molekülstruktur, resultierend aus verschiedenen Substitutionen, werden Unterschiede im Farbspektrum der Anthocyane auch durch den umgebenden pH-Wert bestimmt. Eine Verschiebung des pH-Wertes in wässrigem Medium führt zur Veränderung der Farbe der Anthocyanmoleküle, bedingt durch die Änderung im Protonierungsmuster (Clifford 2000; Watzl *et al.* 2002). Dies verursacht eine strukturelle Transformation des Moleküls und beeinflusst somit dessen chromatische Eigenschaften, Funktionalität und Stabilität. Innerhalb intakter Pflanzenzellen werden die im Cytosol synthetisierten Anthocyane in die Vakuole transportiert und dort akkumuliert und gespeichert. Je nach Spezies und Gewebe besitzt das Innere der Vakuole einen pH-Wert von etwa 2,5 bis 5,5 (Müller *et al.* 1996). Somit besteht in dem als Reservoir dienenden Kompartiment natürlicherweise ein saures Milieu, in welchem die Anthocyane ihre Funktion als Pigmente erfüllen oder bis zum weiteren Gebrauch in einer stabilen Form eingelagert sind. Die Farbe und Stabilität der Anthocyane wird zudem durch die Kopigmentierung mit anderen phenolischen Substanzen und durch die Komplexierung mit Metallionen wie Eisen-, Aluminium- oder Magnesiumionen beeinflusst (Brouillard 1982; Yoshida *et al.* 2009). Dabei unterliegen wiederum die Kopigmentierung und die Ausbildung von Metallkomplexen dem Einfluss der chemischen Struktur der Anthocyane, des pH-Wertes, der Temperatur und der Konzentrationsverhältnisse von Pigment und Kopigment bzw. Metallion (Jurd und Asen 1966; Mazza und Brouillard 1990; Gauche *et al.* 2010; Sun *et al.* 2010).

1.1.2. Funktionen

Weltweit besteht ein stetig zunehmendes Interesse an Anthocyanen (Bridle und Timberlake 1997; Appelhagen *et al.* 2018), das von wissenschaftlicher Seite unter anderem durch zahlreiche Funktionen begründet ist, die diese Pigmente in der Pflanze erfüllen. Anthocyane sind v. a. durch ihre antioxidative Kapazität an der Abwehr diverser biotischer (Mikroorganismen, Herbivoren) und abiotischer (z. B. Kälte, Trocken- und Salzstress) Stressfaktoren beteiligt (Chalker-Scott 1999; Harborne und Williams 2000; Wegener und Jansen 2007). Sie binden freie Radikale und verhindern dadurch die Entstehung von oxidativem Stress. Darüber hinaus können diese Pigmente die pflanzliche DNA und Proteine gegen UV-induzierte Schädigung schützen, indem sie zusätzlich zur Absorption von Licht im sichtbaren Bereich (zwischen 450 nm und 650 nm) auch Licht im ultravioletten Bereich zwischen 270 nm und 290 nm absorbieren und somit die Funktion eines Schutzschildes übernehmen (Pauling 1939; Steyn *et al.* 2002). Des Weiteren dienen die Anthocyanpigmente der Sicherung des Fortbestandes und der Arterhaltung, indem sie dabei helfen, potenzielle Bestäuber und zur Samenverbreitung beitragende Tiere mittels prächtiger Blüten- und Fruchtfarben anzulocken (Xie *et al.* 2015).

Anthocyane sind potenziell förderlich für die menschliche Gesundheit (He und Giusti 2010; Lila 2004), woraus sich ebenfalls aus medizinischer und ernährungsphysiologischer Sicht ein breites Interesse an diesen sekundären Pflanzenstoffen entwickelt hat. Für eine Reihe von Anthocyanen konnten antioxidative, antikarzinogene (Bagchi *et al.* 2004; Butelli *et al.* 2008) und antiinflammatorische (Ohgami *et al.* 2005) Aktivitäten gezeigt werden, ebenso wie eine mögliche unterstützende Wirkung in der Diabetesvorsorge und -behandlung (Tsuda 2016) und eine positive Förderung der Herzgesundheit (Mazza 2007). Daraus ergibt sich ein beachtliches Potential für industrielle und medizinische Anwendungen (Appelhagen *et al.* 2018). So wurden beispielsweise bereits einige Nutzpflanzen dahingehend weiterentwickelt, dass sie einen erhöhten Gehalt der gesundheitsfördernden Pigmente aufweisen und somit über einen gesteigerten Nährwert verfügen (Espley *et al.* 2007; Butelli *et al.* 2008; Chiu *et al.* 2010). Die gesundheitsfördernden Eigenschaften sowie die mit der Verwendung synthetischer Farbstoffe einhergehenden Bedenken (Oplatowska-Stachowiak und Elliott 2017) bedingen unter anderem den wachsenden Nutzen von Anthocyanen als natürliche Farbstoffe in der Nahrungsmittel- und Kosmetikindustrie (Sigurdson *et al.* 2017).

1.1.3. Anthocyanbiosynthese

Pflanzen produzieren eine große Anzahl unterschiedlicher Sekundärmetabolite, welche bei der Interaktion mit deren Umwelt spezifische Funktionen erfüllen. Die Flavonoide, die vom Phenylpropanoidstoffwechsel abstammen, bilden dabei mit mehr als 5000 natürlich vorkommenden Verbindungen eine Hauptgruppe der Sekundärmetabolite (Pichersky *et al.* 2006). Anthocyane stellen darunter die bedeutendste und größte Gruppe der Flavonoide dar. Den Ausgangspunkt für den Phenylpropanoidstoffwechsel (Abb. 3) bildet Phenylalanin, das im Shikimatweg synthetisiert wird (Herrmann 1995; Vogt 2010). Alle Phenylpropanoide entstammen dabei einer initialen Deaminierung von Phenylalanin, bei der das C₆C₃-Molekülgerüst bereitgestellt wird.

Die Vorstufen für die Synthese sämtlicher Flavonoide sind 4-Cumaroyl-CoA, das sich vom Phenylalanin ableitet, und das aus der Fettsäuresynthese hervorgehende Malonyl-CoA (Abb. 3). Die Biosynthese der Anthocyanfarbstoffe findet im Cytosol statt, im Speziellen an der cytoplasmatischen Oberfläche des endoplasmatischen Retikulums (Burbulis und Winkel-Shirley 1999; Sun *et al.* 2012). Im ersten Schritt der Anthocyanbiosynthese katalysiert das Enzym Chalkonsynthase (CHS) die sequenzielle Kondensation und einen intramolekularen Ringschluss von 4-Cumaroyl-CoA und drei Molekülen Malonyl-CoA (drei Acetat-Einheiten), wobei Naringenin-Chalkon entsteht. Dieses wird durch die Chalkonisomerase (CHI) weiter cyclisiert zum Flavanon Naringenin, das durch die Flavanon-3-hydroxylase (F3H) zu Dihydrokaempferol (DHK, auch Aromadendrin genannt) umgewandelt wird. DHK kann anschließend durch die Flavonoid-3'-hydroxylase (F3'H) zu Dihydroquercetin (DHQ, oder Taxifolin) oder durch die Flavonoid-3',5'-hydroxylase (F3'5'H) zu Dihydromyricetin (DHM, auch Ampelopsin) hydroxyliert werden. Die F3'5'H kann außerdem die Umwandlung von DHQ in DHM katalysieren. Demnach wird der Typ der gebildeten Anthocyane maßgeblich durch die Enzymaktivitäten der beiden P450-Monooxygenasen F3'H und F3'5'H bestimmt. Abschließend werden die drei farblosen Dihydroflavonole DHK, DHQ und DHM in drei enzymatischen Reaktionen in Anthocyane umgewandelt. Dafür erfolgt zunächst die Reduktion zu den entsprechenden Leukoanthocyanidinen Leukopelargonidin, Leukocyanidin und Leukodelphinidin durch die Dihydroflavonol-4-reduktase (DFR). Anschließend werden die farblosen Leukoanthocyanidine durch das Enzym Anthocyanidinsynthase (ANS) zu den entsprechenden orange-roten (Pelargonidin), roten (Cyanidin) und blauen (Delphinidin) Anthocyanidinen oxidiert (Schijlen *et al.* 2004). Diese Anthocyanidine werden nachfolgend

an Position 3 des C-Rings des Flavonoidgerüsts zu Anthocyanen glycosyliert (siehe Abb. 1). Diese Reaktion wird in den meisten Fällen durch eine UDP-Glucose-3-O-Flavonoidglycosyltransferase (GFG) katalysiert. Die so gebildeten Anthocyanidin-3-glycoside werden in vielen Spezies, darunter auch *Solanum tuberosum*, weiterführend durch Glycosylierung, Methylierung und Acylierung modifiziert (siehe auch Abschnitt 1.1.1.).

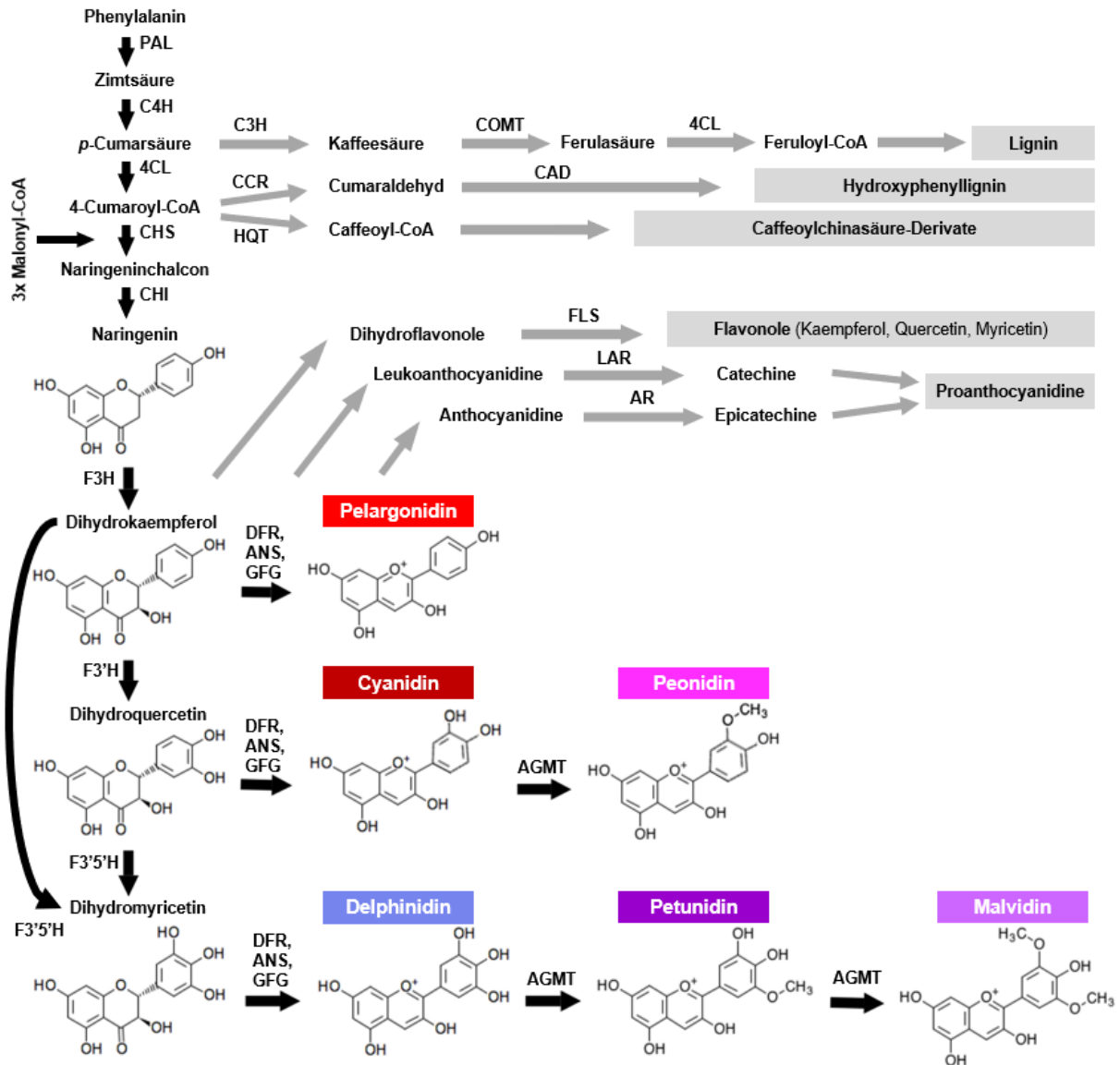


Abb. 3: Schematische Übersicht des generellen Phenylpropanoidstoffwechsels. Schwarze Pfeile kennzeichnen den Pfad des Anthocyanbiosynthesewegs. *AGMT*, Anthocyanidinglycosid-O-methyltransferase; *AR*, Anthocyanidinreduktase; *ANS*, Anthocyanidinsynthase; *CAD*, Cinnamylaldehyd-Dehydrogenase; *CCR*, Cinnamoyl-CoA-Reduktase; *C3H*, p-Cumarat-3-hydroxylase; *C4H*, Zimtsäure-4-hydroxylase; *CHI*, Chalkonisomerase; *CHS*, Chalkonsynthase; *4CL*, 4-Cumaroyl-CoA-Ligase; *COMT*, Kaffeesäure-O-Methyltransferase; *DFR*, Dihydroflavonol-4-reduktase; *F3H*, Flavanon-3-hydroxylase; *F3'H*, Flavonoid-3'-hydroxylase; *F3'5'H*, Flavonoid-3',5'-hydroxylase; *FLS*,

Flavonolsynthase; *GFG*, UDP-Glucose-3-*O*-Flavonoidglycosyltransferase; *HQT*, Hydroxycinnamoyl-CoA-Chinasäuretransferase; *LAR*, Leukoanthocyanidinreduktase; *PAL*, Phenylalanin-Ammonium-Lyase. Strukturformeln der Metabolite entstammen der KEGG Datenbank (Kanehisa *et al.* 2015).

1.1.4. Regulation der Anthocyanbiosynthese

Die grundlegenden Reaktionen im Anthocyanbiosyntheseweg sind den meisten Pflanzen gemein (Abb. 3). Dennoch können die Pigmentierungsmuster zwischen verschiedenen Spezies sowie auch innerhalb einer Spezies sehr vielfältig sein. So können beispielsweise Petunien (*Petunia* sp.) keine Pelargonidinpigmente produzieren (Forkmann und Ruhnau 1987). Mais (*Zea mays*) und Löwenmaul (*Antirrhinum majus*) hingegen sind nicht in der Lage, delphinidinbasierte Anthocyane zu bilden (Holton und Cornish 1995) und die Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana*) produziert ausschließlich cyanidinbasierte Anthocyane (Dong *et al.* 2001). Die hier aufgeführten Pflanzenspezies weisen eine verminderte Bandbreite in der Farbgebung auf und enthalten eher geringfügig substituierte Anthocyane mit vergleichsweise einfacher Molekülstruktur. Innerhalb der Spezies *Solanum tuberosum*, die als Modellorganismus im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht, finden sich hingegen alle sechs Hauptanthocyanidine (Abb. 1) mit komplexen Glycosylierungs- und Acylierungsmustern (Lewis *et al.* 1998; Naito *et al.* 1998; Rodriguez-Saona *et al.* 1998) (siehe auch Abschnitt 1.2.2.). Kartoffelknollen zeigen daher ein breites Farbspektrum, von orange-rot, über pink, bis hin zu tief violetten, fast schwarzen Knollen (Abb. 2). Es existieren demnach einige bedeutende regulatorische Unterschiede im Bezug auf die Typen akkumulierter Anthocyane, ebenso wie im Grad ihrer sekundären Modifikationen.

Die generelle Regulation der Anthocyanbiosynthese erfolgt, bedingt durch die jeweilige Funktion dieser Pigmente (siehe auch Abschnitt 1.1.2.), in Abhängigkeit diverser interner (entwicklungsbedingte Veränderungen) und externer (biotische und abiotische Faktoren) Stimuli (Chalker-Scott 1999; Harborne und Williams 2000; Wegener und Jansen 2007). Sind Pflanzen bestimmten Stressfaktoren ausgesetzt, werden die Produkte des Shikimatwegs vermutlich vorrangig zur Produktion abwehrassoziierter, phenolischer Verbindungen, wie u. a. den Anthocyanen, umgeleitet (Abdulrazzak *et al.* 2006; Schoch *et al.* 2006). Die Anthocyanbiosynthese unterliegt dabei der Kontrolle durch ein komplexes regulatorisches Netzwerk, das verschiedene Faktoren beinhaltet und unterschiedliche Ebenen der Regulation

umfasst. Eine Reihe von Strukturgenen kodieren für Enzyme der Anthocyanbiosynthese (Abb. 3), die vermutlich vor allem durch ihre Menge und Aktivität zur Regulation der Pigmentsynthese beitragen und ihrerseits von übergeordneten regulatorischen Genen kontrolliert werden. Diese regulatorischen Gene wiederum kodieren für Transkriptionsfaktoren, welche die Expression der Strukturgene kontrollieren und somit die Intensität und das Muster (Zell- und Gewebespezifität) der Anthocyanbiosynthese beeinflussen (Albert *et al.* 2014).

1.1.4.1. Regulatorische Funktion der Schlüsselenzyme

Am Beispiel des Schlüsselenzyms Dihydroflavonol-4-reduktase (DFR) ist im Folgenden beschrieben, in welchem Maße die Strukturgene der Anthocyanbiosynthese, bzw. deren Genprodukte, die Akkumulation der Anthocyane beeinflussen können. Petunien beispielsweise besitzen drei unterschiedliche DFR-Gene (*dfrA*, *dfrB* und *dfrC*), von denen jedoch nur das *dfrA*-Gen transkribiert wird (Beld *et al.* 1989). Das gebildete DFR-Enzym katalysiert vorrangig die Umwandlung von DHM zu Leukodelphinidin, während DHQ lediglich ein schwaches Substrat darstellt. Das geringer hydroxylierte DHK kann hingegen nicht als Substrat genutzt werden, weshalb Petunien nicht in der Lage sind, pelargonidinbasierte Anthocyane zu bilden (Forkmann und Ruhnau 1987; Dong *et al.* 2001). Nur ein einziger Aminosäureaustausch in der Substratbindestelle der Petunien-DFR kann jedoch deren Substratspezifität stark verändern (Johnson *et al.* 2001). Die DFR-Enzyme der meisten Pflanzen können alle drei Dihydroflavonole als Substrat nutzen und daher sowohl rötliche pelargonidin- und cyanidinbasierte, als auch bläuliche delphinidinbasierte Anthocyane produzieren. So ist es beispielsweise bei *Solanum tuberosum* der Fall (siehe auch Abschnitt 1.2.2.). Die Synthese der drei verschiedenen Anthocyanidine wird daher in diesen Spezies vermutlich hauptsächlich durch die Aktivität der beiden Hydroxylasen F3'H und F3'5'H bestimmt (Johnson *et al.* 2001).

1.1.4.2. Regulation durch transkriptionelle Kontrollmechanismen

Die Anthocyanbiosynthese ist im Pflanzengewebe oftmals räumlich und zeitlich begrenzt. Die Regulation der beteiligten Strukturgene und Transkriptionsfaktoren wird dabei durch verschiedene Einflüsse stimuliert (Jackson *et al.* 1992; Albert *et al.* 2014). Ein abgestimmtes,

regulatorisches Netzwerk ermöglicht die Anpassung der Anthocyanproduktion an diverse interne Signale (u. a. entwicklungspezifische und zirkadiane Hormon- und Metabolitlevel) und externe Umwelteinflüsse (z. B. Starklicht, UV-Strahlung, verschiedene biotische Stressoren) durch Kontrolle der Expression der Anthocyanbiosynthesegene (Vom Endt *et al.* 2002).

Dieses komplexe, regulatorische Netzwerk setzt sich aus einer Vielzahl von Proteinen zusammen und wurde beispielsweise in der für die Anthocyanerforschung bedeutendsten Modellpflanze Petunie als sogenannter MBW-Komplex (Mol *et al.* 1998; Baudry *et al.* 2004; Koes *et al.* 2005; Albert *et al.* 2014) identifiziert und charakterisiert (Gerats 1985; de Vetten *et al.* 1997; Quattrocchio *et al.* 1998; Spelt *et al.* 2000; Albert *et al.* 2011; Albert *et al.* 2014). Studien in Petunie und Löwenmaul lieferten Hinweise auf die Präferenz des MBW-Komplexes zur Aktivierung später regulatorischer Gene der Anthocyanbiosynthese, die sich im Syntheseweg nach der F3H anschließen (Gerats 1985; Martin *et al.* 1991; Albert *et al.* 2014). Zudem ist bekannt, dass einige an der Anthocyanbiosynthese beteiligte Transkriptionsfaktoren eine gewebespezifische Aktivität aufweisen (Quattrocchio *et al.* 1998). Dies ist vermutlich ebenfalls auf die gezielte Anpassung an bestimmte Entwicklungsstadien/-prozesse bzw. Umwelteinflüsse zurückzuführen und nimmt Einfluss auf das Akkumulationsmuster der Anthocyane (Huits *et al.* 1994).

Die grundlegenden Merkmale dieses regulatorischen Netzwerkes im Asteriden-Modell der Petunie sind vergleichbar mit denen des Rosiden-Modells von *A. thaliana* und sind daher wahrscheinlich unter den Eudikotyledonen weit verbreitet (Albert *et al.* 2014). Sowohl hierarchische, als auch Rückkopplungsmechanismen zwischen verschiedenen Proteinen des MBW-Aktivierungskomplexes scheinen dabei wichtige Merkmale der Regulation der Anthocyanbiosynthese darzustellen.

1.2. Anthocyanhaltige Kartoffeln als Modellorganismus

Anthocyane kommen in einer Vielzahl verschiedener Pflanzenfamilien vor, wo sie in unterschiedlichen Geweben bzw. Organen akkumulieren, wie z. B. in Früchten, Blüten und Blättern (Strack 1994). Eines dieser Organe scheint hierbei von besonderer Bedeutung zu

sein. Dabei handelt es sich um die Kartoffelknolle, dem vegetativen Vermehrungsorgan von *Solanum tuberosum*. Hier finden sich kontrastierende Anthocyanprofile in verschiedenen Sorten nur einer Spezies. Dies ist u. a. ein wichtiger Aspekt, der die Kartoffelknolle als einen besonders gut geeigneten Modellorganismus zur Erforschung der Anthocyanbiosynthese auszeichnet. Einige weitere dieser Faktoren sind in den folgenden Abschnitten genauer beschrieben.

In Kartoffelknollen kommen neben den Anthocyanen auch weitere Pigmentklassen wie Carotinoide, Flavonole, Flavone und Chlorophylle vor (Harborne 1967; Wietschel und Reznik 1980a, 1980b; Hahlbrock 1981; Burton 1989; Stafford 1990; Andre *et al.* 2007a; Andre *et al.* 2007b; Hejtmánková *et al.* 2013). Im Fokus der vorliegenden Arbeit stehen allerdings ausschließlich die Anthocyane. Wenn im Weiteren von pigmentierten bzw. farbigen Kartoffelknollen die Rede ist, bezieht sich dies auf das Vorhandensein von Anthocyanen, unabhängig vom Gehalt anderer Pigmente.

1.2.1. Kartoffel – *Solanum tuberosum* L.

1.2.1.1. Ursprung und Taxonomie

Kartoffeln sind heimisch in den Anden, mit einem einzigen Ursprung in der Gegend von Süd-Peru und dem Nordwesten von Bolivien, wo sie bereits vor circa 7000-10.000 Jahren domestiziert wurden (Kiple und Ornelas 2000; Spooner *et al.* 2005). Erst im späten 16. Jahrhundert gelangte die Kartoffel nach Europa, von wo aus sie sich weltweit verbreitete (Hawkes 1992).

Die heutige Kulturkartoffel *S. tuberosum* gehört zur Gruppe der Asteriden und ist in die basale Ordnung der Lamiiden (auch Euasteriden I, Unterordnung Solanales) einzugruppieren (Lester *et al.* 1991; Hunziker 2001). Sie zählt zur Familie der Nachtschattengewächse (Solanaceae), welcher daneben weitere wichtige Nutzpflanzen, wie Tomate (*Solanum lycopersicum*), Aubergine (*Solanum melongena*) und verschiedene Paprikaspezies (*Capsicum spp.*) angehören. Ebenso finden sich ökonomisch bedeutsame Zierpflanzen in der Familie der Solanaceae, darunter die Petunie (Gattung *Petunia*). Kultivierte Kartoffeln und deren verwandte Wildarten gehören zur Gattung *Solanum*, mit 1000-2000 Spezies (PBI *Solanum* Project: <http://www.solanaceaesource.org/content/diversity-solanaceae>, aufgerufen August

2018). Weltweit existieren etwa 5000 Kultursorten der Kartoffel (International Potato Center, <http://cipotato.org/potato/>, aufgerufen Oktober 2018), mit bis zu zwanzig Spezies (Takeda *et al.* 1988; Mateus *et al.* 2002).

1.2.1.2. Kartoffelgenom

Das Auftreten von Polyploidie in Kartoffeln, mit einer Basisanzahl von 12 Chromosomen, wurde bereits 1927 von Smith beschrieben (Smith 1927). Unter den sieben hauptsächlich kultivierten Kartoffelarten (Machida-Hirano 2015) finden sich diploide ($2n = 2x = 24$; *S. stenotomum*, *S. phureja* und *S. ajanhuiri*), triploide ($2n = 3x = 36$; *S. chaucha* und *S. juzepczukii*), eine tetraploide ($2n = 4x = 48$; *S. tuberosum*) sowie eine pentaploide ($2n = 5x = 60$; *S. curtilobum*) Spezies (Hawkes 1990). Bei wilden Kartoffeln wurde zudem Hexaploidie ($2n = 6x = 72$) nachgewiesen (Spooner *et al.* 2005).

Die Kulturkartoffel *S. tuberosum* ist eine autotetraploide und in hohem Maße heterozygote Spezies, mit immenser allelischer Diversität (Howard 1970; Muth *et al.* 2008). Dies bedeutet, dass pro Zelle vier Kopien jedes der zwölf Chromosomen existieren und darüber hinaus oftmals beträchtliche Variationen unter den vier zusammengehörigen Kopien jedes Gens auftreten. Tetrasome Vererbung bedingt ein komplexes Muster der Segregation von Merkmalen (Howard 1970). Darüber hinaus unterliegt die Spezies *S. tuberosum* einer starken Inzuchtdepression (Simko *et al.* 2006; Uitdewilligen *et al.* 2013) und kultivierte Sorten weisen eine enorm hohe Mutationsbelastung auf (Potato Genome Sequencing Consortium 2011). Genetische Studien spezifischer Loci im Kartoffelgenom sind daher überaus komplex und schwer zu realisieren (Rickert *et al.* 2003).

Dem *Potato Genome Sequencing Consortium* (PGSC), einem internationalen Zusammenschluss aus 26 Forschungsgruppen, gelang 2011 die Entschlüsselung des Kartoffelgenoms, als erstes sequenziertes Genom in der Gruppe der Asteriden. Dabei erfolgte die Nutzung eines doppelhaploiden Kartoffelklons (*S. tuberosum* Gruppe Phureja, Klon DM1-3 516 R44, kurz DM), in welchem die Gene eines Genpaares identisch (homozygot) sind (Potato Genome Sequencing Consortium 2011). Die Genomassemblierung repräsentiert 726 Megabasen (86 %) des 844 Mb großen Kartoffelgenoms und beinhaltet 39.031 annotierte proteinkodierende Gene.

1.2.1.3. Die Kartoffel als Grundnahrungsmittel

Die Kartoffel bildet in vielen Teilen der Welt einen Grundpfeiler der Ernährung. Die derzeitige Weltjahresproduktion beträgt etwa 380 Millionen Tonnen, wovon circa 44 % auf Europa entfallen (FAOSTAT, <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>, Durchschnittswerte für 1986-2016). Die Kartoffel verfügt über eine hohe Anpassungsfähigkeit an ein breites Spektrum unterschiedlicher Böden und klimatischer Verhältnisse, ermöglicht eine kostengünstige und sichere Produktion auch unter Stressbedingungen oder bei verkürzten Anbauperioden und liefert hohe Ernteerträge (Talbert 1987; Niederhauser 1993). Es besteht eine allgemeine Akzeptanz der Kartoffel als Nahrungsmittel des alltäglichen Konsums sowie eine hervorragende Nährwertbilanz und eine enorme Sortenvielfalt. Die Kartoffel gilt zudem als sehr vielseitiges Lebensmittel, welches kommerziell sowohl als frische Ware, sowie in vielfältiger Weise als prozessiertes Produkt, beispielsweise in Form von Chips, Pommes frites, Stärke und Mehl, angeboten wird.

Kartoffelknollen stellen eine exzellente Quelle für Kohlenhydrate, Ballaststoffe, essentielle Aminosäuren, Vitamine (Vitamine C, B1, B3 und B6) und Mineralien wie Kalium, Phosphor und Magnesium dar (Andre *et al.* 2007a; United States Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service, National Nutrient Database for Standard Reference. Version 28, vollständiger Bericht 11352). Neben diesen essentiellen Nährstoffen beinhalten Kartoffeln auch eine Reihe antioxidativer, phenolischer Komponenten (Burlingame *et al.* 2009), darunter die in einigen Sorten vorkommenden Anthocyane. Abhängig vom Kultivar enthalten manche rote oder blau-violette Kartoffeln beachtliche Mengen dieser potenziell gesundheitsfördernden Pigmente (> 200 mg pro 100 g Frischmasse) (Lewis *et al.* 1998; Reyes *et al.* 2005).

1.2.2. Anthocyane in Kartoffelknollen

Diverse Literaturquellen deuten darauf hin, dass bereits die südamerikanischen Ursorten der Spezies *S. tuberosum* anthocyanhaltige Knollen bildeten (Dodds und Long 1955; Brown *et al.* 2003; Eichhorn und Winterhalter 2005; Brown *et al.* 2007; Hillebrand und Winterhalter 2009). Die Kartoffelknollen, als vegetative Reproduktionsorgane, sind durch den Gehalt der vielfältig protektiven Anthocyanmoleküle vermutlich auf natürliche Weise gegen vorherrschende schädliche Umwelteinflüsse, wie Kältestress (Chalker-Scott 1999),

Mikroorganismen und andere Pathogene oder Fraßfeinde (Wang *et al.* 1997; Harborne und Williams 2000; Innocenzi *et al.* 2004; Wegener und Jansen 2007) geschützt. Für eine Funktion der Anthocyane bei der Abwehr von Pathogenen oder Fraßfeinden der Knollenorgane spricht zudem, dass diese Pigmente in der Knollenschale (Periderm) sämtlicher anthocyanhaltiger Kartoffelknollen produziert werden, während das Knollenfleisch zusätzlich nur bei einem Teil der Sorten pigmentiert ist (De Jong *et al.* 2003). Das Periderm bildet, als protektives Gewebe, die Abgrenzung zur Umwelt und somit die erste Instanz in der Abwehr dieser biotischen Stressoren. Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit konnten Veränderungen des Anthocyangehaltes in den Knollen von Kartoffelpflanzen nach Pathogenbefall der Blätter festgestellt werden (Appendix Abb. A1). Diese Beobachtung gibt Anlass zu der Vermutung, dass in den Knollen akkumulierte Anthocyane auch als Reservoir für die Belieferung der oberirdischen Organe dienen könnten. In Anpassung an diverse Umweltbedingungen könnten somit, durch eine *source-sink*-Dynamik, Anthocyane vermutlich spezifisch und temporär an den Ort des Bedarfes transportiert werden.

Die heutzutage ökonomisch bedeutsamsten Kulturkartoffelsorten haben gelbes/weißes Fruchtfleisch, eine gelbe Schale und enthalten keine Anthocyane. Die Züchtung hoch ertragreicher Kultivare führte zur Verdrängung der ursprünglichen, insbesondere der pigmentierten Sorten (Eichhorn und Winterhalter 2005). Seit einigen Jahren jedoch erfreuen sich diese ursprünglichen Sorten zunehmender Beliebtheit. Die Erlangung der Kenntnisse um die gesundheitsfördernden Eigenschaften der Anthocyane (siehe Abschnitt 1.1.2.) in Verbindung mit einem steigenden Gesundheitsbewusstsein der Verbraucher führt dabei zu einer erhöhten Nachfrage farbiger Kartoffeln (Eichhorn und Winterhalter 2005; Reyes *et al.* 2005). Die Erforschung von Gehalt, Komposition und Regulation von Anthocyanpigmenten in Kartoffelknollen rückt daher immer mehr in den Fokus des wissenschaftlichen und industriellen Interesses.

Anthocyanhaltige Kartoffelsorten könnten eine bedeutende quantitative Quelle dieser alimentären, gesundheitsfördernden Pigmente darstellen (Ishii *et al.* 1996; Prior 2003). Es besteht bereits ein wachsendes Interesse an anthocyanreichen, farbigen Kartoffeln als sogenanntes *functional food* (funktionelles Lebensmittel), das v. a. von der Lebensmittelindustrie getrieben wird (Mattoo *et al.* 2010). Steigender Beliebtheit erfreut sich zudem die Nutzung anthocyanhaltiger Kartoffeln als Quelle natürlicher Farbstoffe für diverse

industrielle Anwendungen. Vor allem die Schale der Kartoffelknollen, die in der Lebensmittelproduktion in großer Menge als Abfallprodukt anfällt, bietet eine ressourcenschonende und besonders kostengünstige Quelle zur Anthocyanisolierung (Schieber und Saldaña 2009; Sepelev und Galoburda 2015).

Die Farben anthocyanhaltiger Kartoffelknollen werden grundsätzlich durch die Profile der sechs hauptsächlich natürlich vorkommenden Anthocyanidine bestimmt. Rote Kartoffeln enthalten hauptsächlich acylierte Pelargonidinderivate, darunter v. a. Pelargonidin-3-*p*-coumaroylrutinosid-5-glucosid (Naito *et al.* 1998; Rodriguez-Saona *et al.* 1998). Im Gegensatz dazu enthalten violette oder blaue Kartoffeln eine Mischung aus den 3-*p*-Coumaroylrutinosid-5-glucosiden von Petunidin, Malvidin und Peonidin (Lewis *et al.* 1998; Eichhorn und Winterhalter 2005; Hillebrand *et al.* 2009). Jedoch wurde die gewebespezifische Anthocyanzusammensetzung und deren Relation zur gesamten Polyphenolkomposition bisher nur wenig erforscht.

Pigmentierte Kartoffeln der Spezies *S. tuberosum* zeichnen sich durch eine hohe Variabilität in Anthocyan Gehalt und -zusammensetzung aus, die hauptsächlich auf genetische Unterschiede zurückzuführen ist und diese Sorten zu hervorragend geeigneten Modellen zur Untersuchung der Anthocyanbiosynthese macht. Derzeit sind für Kartoffeln bereits mindestens 27 an der Anthocyanbiosynthese beteiligte Gene bekannt (Stushnoff *et al.* 2010). Bereits durch eine frühe Studie in tetraploiden Kartoffeln zu Beginn des zwanzigsten Jahrhunderts gelang die Identifizierung von drei Genloci, *D* (*developer*), *R* (*red*) und *P* (*purple*), welche die Variation der Knollenfärbung maßgeblich mitbestimmen (Salaman 1910). *R* wird zur Produktion roter, pelargonidinbasierter Anthocyane benötigt, während *P* für die Synthese blauer und violetter, delphinidinbasierter Anthocyane erforderlich ist. Genlocus *D* ist hingegen für die gewebespezifische Akkumulation der Anthocyanpigmente in der Knollenschale verantwortlich. Die Anthocyanpigmentierung von Kartoffelfleisch wird durch den *Pf* (*pigmented flesh*)-Locus reguliert (Dodds und Long 1955; De Jong 1987; van Eck *et al.* 1994). Studien belegten, dass *D* für den R2R3-MYB-Transkriptionsfaktor *Stan2* (später in *Stan1* umbenannt) kodiert, der die Expression mehrerer Anthocyanstrukturgene in Kartoffelknollenschale reguliert (Jung *et al.* 2009). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass *R* für die Dihydroflavonol-4-reduktase (Zhang *et al.* 2009) und *P* für die Flavonoid-3',5'-hydroxylase (Jung *et al.* 2005) kodieren.

1.3. Flavonoid-3',5'-hydroxylase (F3'5'H)

1.3.1. Die F3'5'H als Schlüsselenzym der Anthocyanbiosynthese

Etliche Studien erbrachten bereits umfangreiche Erkenntnisse über die transkriptionelle Kontrolle der Anthocyanbiosynthese durch spezifische Transkriptionsfaktoren (Holton und Cornish 1995; Mol *et al.* 1998; Spelt *et al.* 2000; Spelt *et al.* 2002; Jung *et al.* 2009; Albert *et al.* 2014; Jun *et al.* 2015; Liu *et al.* 2016; Zhang *et al.* 2017) (siehe auch Abschnitt 1.1.4.). Bisher noch wenig erforscht ist hingegen die regulatorische Funktion der Schlüsselenzyme in der Anthocyanbiosynthese, welche im Einzelnen entscheidend für die Art der gebildeten Anthocyane und damit einhergehend für die Gewebefarbe verantwortlich sein können. Eines dieser Schlüsselenzyme, die Flavonoid-3',5'-hydroxylase (F3'5'H), scheint dabei einen besonders wichtigen Verzweigungspunkt darzustellen, der zur zusätzlichen Synthese von bläulichen delphinidinbasierten und violetten petunidin- und malvidinabstammigen Anthocyanen führt (Abb. 3).

1.3.2. Mechanismus, Aktivität und Regulation der F3'5'H

Mechanismus

Die F3'5'H gehört zur CYP75-Superfamilie der Cytochrom-P450-Enzyme (CYPs) Gruppe A und ist mit dem hydrophoben N-terminalen Ende in der Membran des endoplasmatischen Retikulums verankert (Sakaguchi *et al.* 1984; Nebert und Nelson 1991; Nelson 2009). Der C-terminale Bereich, der das katalytische Zentrum des Enzyms beinhaltet, ragt in das Cytoplasma, den Ort der Anthocyanbiosynthese. Cytochrom-P450-abhängige Flavonoidhydroxylasen (Monooxygenasen) katalysieren die Einführung von einer (F3'H) oder zwei (F3'5'H) Hydroxylgruppen an der 3'- bzw. 3'- und 5'-Position des B-Rings des Flavonoidgerüsts, wobei Letzteres charakteristisch für die chemische Struktur blauer/violetter Anthocyane ist (Abb. 1 und Abb. 4 a). Nur Pflanzen in denen das für die F3'5'H kodierende Gen exprimiert wird, sind in der Lage blaue/violette Pigmente zu produzieren, da diesen die 5'-Hydroxylierung zugrunde liegt (Olsen *et al.* 2010). Daher spielt die F3'5'H eine entscheidende Rolle in der Ausprägung der Färbung anthocyanhaltiger Pflanzenorgane.

Phylogenetische Analysen bekannter F3´H- und F3´5´H-Sequenzen höherer Pflanzen lassen darauf schließen, dass beide Hydroxylasen noch vor der Divergenz von Gymnospermen und Angiospermen aus einem gemeinsamen Vorläufergen hervorgingen (Seitz *et al.* 2006). Ein Genduplikationsereignis mit anschließender Neofunktionalisierung führte dabei wahrscheinlich zur divergenten Evolution beider Hydroxylaseklassen. Es wird vermutet, dass Angiospermen ursprünglich blaue/violette Blüten bildeten und während deren evolutionärer Entwicklung Farbwechsel von Blau zu Rot, infolge von Funktionsverlusten der *f3´5´h*-Gene, öfter stattfanden als Veränderungen von Rot zu Blau (Tanaka und Brugliera 2013).

Aktivität

Erstmals nachgewiesen wurde die F3´5´H-Aktivität von Stotz und Forkmann im Jahr 1982 in Mikrosomenpräparaten aus den blauen Blüten von *Verbena hybrida* (Gattung der Asteriden) die hauptsächlich delphinidinbasierte Anthocyane beinhalten. Im Zuge dieser Studie erwiesen sich sowohl Naringenin und DHK sowie deren 3´,4´-hydroxylierte Vorstufen Eriodictyol und DHQ als Substrate für die F3´5´H-katalysierten Hydroxylierungen zu 5´-OH-Eriodictyol und DHM. Letzteres bildet den direkten Vorläufer blauer/violetter Anthocyane. Die Studien von Stotz und Forkmann 1982 zeigten weiterhin, dass die 5´-Hydroxylierung strikt von NADPH als Kofaktor und von molekularem Sauerstoff abhängig ist.

Aktive Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen benötigen zwei Elektronen und müssen daher an einen Elektronen-Donor gekoppelt sein. Üblicherweise wird diese Funktion durch eine NADPH-Cytochrom-P450-Oxidoreduktase erfüllt (Renault *et al.* 2014). Im Fall der F3´5´H-Aktivität wird jedoch eines der beiden Elektronen durch ein Cytochrom b5 (Cyt b5) bereitgestellt. Cytochrom b5-Proteine sind membrangebundene (hauptsächlich mikrosomal, aber auch mitochondrial), ubiquitäre Hämoproteine, die als Elektronenüberträger für membrangebundene Oxygenasen fungieren (Porter 2002). Dieses Zusammenspiel von Cyt b5 und F3´5´H wurde erstmals in Petunie entdeckt (de Vetten *et al.* 1999) und dabei die Bedeutsamkeit des Cytochrom b5 für die volle Aktivität der Flavonoid-3´,5´-hydroxylase in einer Gattung der Solanaceae Familie erwiesen.

Regulation

Die genauen regulatorischen Mechanismen, die die Expression oder die Funktionsweise und Aktivität der F3´5´H kontrollieren, sind bislang wenig bekannt. Diverse abiotische Stressfaktoren, darunter Kälte, Trockenheit, Salzgehalt des Bodens und UV-B-Strahlung, sowie die pflanzeneigenen Hormone Abscisinsäure und Jasmonsäure als übergeordnete

regulatorische Instanz, können das Expressionsprofil von Flavonoidhydroxylase-kodierenden Genen beeinflussen (Jackson *et al.* 1992; Falginella *et al.* 2010; Albert *et al.* 2014; Liu *et al.* 2014). Diese internen und externen Einflüsse können somit auf vielfältige Weise auch die oftmals räumlich und zeitlich begrenzte Expression des $f3'5'h$ -Gens sowie dessen übergeordneter Transkriptionsfaktoren steuern (Jackson *et al.* 1992; Albert *et al.* 2014).

Einige Studien lieferten darüber hinaus Hinweise auf eine direkte Regulation des $f3'5'h$ -Strukturgens, welche bereits auf DNA-Ebene erfolgt und auf die Existenz mehrerer unterschiedlicher $f3'5'h$ -Genloci oder aber verschiedener Allele eines $f3'5'h$ -Gens zurückzuführen ist. In der Petunie (*Petunia hybrida* Hort.) beispielsweise existieren zwei Genloci, die für ein Cytochrom-P450-Protein mit F3'5'H-Aktivität kodieren, die Loci *hf1* und *hf2* (Wiering 1974; Holton *et al.* 1993). Beide Genloci kontrollieren die F3'5'H-Aktivität in Petunienblüten, wobei *hf1* in Corolla, Stigma und Pollen, *hf2* hingegen ausschließlich im oberen Bereich der Petalen agiert. Im Genom der Weinrebe (*Vitis vinifera*) wurden, in Abhängigkeit vom Kultivar, bis zu sechzehn Kopien des $f3'5'h$ -Gens nachgewiesen, die eine transkriptionelle Differenzierung bzw. Spezialisierung zwischen verschiedenen Organen und Entwicklungsstadien reifender Trauben aufweisen (Falginella *et al.* 2010). In beiden Spezies bewirken Unterschiede in den Sequenzen der $f3'5'h$ -Genkopien deren räumlich und/oder zeitlich getrennte Expressionsprofile. Die Erhöhung der $f3'5'h$ -Kopienzahl und die transkriptionelle Spezialisierung gehen dabei mit Veränderungen im Anthocyanprofil einher und erhöhen die regulatorische Komplexität der Anthocyanbiosynthese und Gewebefärbung (Falginella *et al.* 2010). Studien des $f3'5'h$ -Gens in *V. vinifera* und durch Gewebekulturen erzeugte Usambaraveilchenvariationen (*Saintpaulia* sp.) zeigten, dass Sequenzunterschiede eher in der Promotorregion auftreten als in den kodierenden Bereichen (Falginella *et al.* 2010; Sato *et al.* 2011). Dies bekräftigt wiederum die Annahme einer transkriptionellen Regulation. Durch Mutationen bedingte allelische Variationen des $f3'5'h$ -Gens in Teepflanzen (*Camellia sinensis*) und Sojabohnen (*Glycine max*) resultieren in einigen Fällen in verkürzten, oder anderweitig nichtfunktionalen F3'5'H-Proteinen (z. B. mit veränderter Substratbindekazität oder -spezifität) und führen so zu einer erhöhten phänotypischen Diversität innerhalb dieser Spezies (Guo und Qiu 2013; Sundaramoorthy *et al.* 2016; Jin *et al.* 2017). Der Mechanismus und die Ebene der F3'5'H-Regulation sind demnach sehr vielfältig und vermutlich in hohem Maße abhängig von der Spezies und dem spezifischen Genotyp.

1.3.3. *Solanum tuberosum* Flavonoid-3',5'-hydroxylase (*StF3'5'H*)

Die meisten Pflanzen verfügen lediglich über ein bis zwei Kopien des *f3'5'h*-Gens (Falginella *et al.* 2010). Auch für das *Stf3'5'h*-Gen in *S. tuberosum* ist nach bisherigem Stand der Forschung nur ein einziger Genlocus bekannt, der *P*-Locus (Jung *et al.* 2005), der auf Chromosom 11 lokalisiert ist (van Eck *et al.* 1993). Bisher wurden nur wenige Versuche der Sequenzierung des *Stf3'5'h*-Gens unternommen, die zudem nur auf der Analyse doppelhaploider (Potato Genome Sequencing Consortium 2011), diploider (Jung *et al.* 2005) oder triploider (Momose *et al.* 2010) Klone beruhen. Die dabei erhobenen Sequenzdaten wurden in Datenbanken (Spud DB (Kartoffeldatenbank der *Michigan State University*; Hirsch *et al.* 2014) und NCBI (*National Center for Biotechnology Information*)) veröffentlicht. Ausführliche Sequenzinformationen des *Stf3'5'h*-Gens in herkömmlichen tetraploiden Kulturkartoffelsorten waren hingegen bisher nicht bekannt und wurden erstmals im Rahmen dieser Arbeit erhoben.

Beruhend auf Analysen des diploiden Kartoffelklons W5281.2 durch Jung *et al.* (2005) kodiert das *Stf3'5'h*-Gen für ein Protein aus 509 Aminosäuren (NCBI-Akzession AY675558). Die Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung dieses Gens von genomischer DNA offenbarte zwei Allele mit mehr als 96 % Sequenzidentität, W5281.2 ist demnach heterozygot für *f3'5'h*. Beide Allele werden in den violetten Knollen von W5281.2 transkribiert, während nur eines der beiden Allele in rotem Kartoffelknollengewebe anderer Genotypen transkribiert wird. Letzteres wurde als rezessives, nichtfunktionales Allel beschrieben. Das ausschließlich in blau-violetter Gewebe transkribierte Allel stellt hingegen das dominante, funktionale *f3'5'h*-Allel dar. Jung und seine Kollegen vermuteten, dass es sich bei den im nichtfunktionalen Allel detektierten Sequenzunterschieden um Mutationen handelt, von denen zumindest eine die Proteinfunktion beeinträchtigt und letztlich eine auf Proteinebene in Erscheinung tretende Kontrolle der F3'5'H zur Folge hat. Diese von Jung *et al.* 2005 veröffentlichte Studie in diploiden Kartoffeln ist bislang die einzige, die auf eine Regulation des *Stf3'5'h*-Gens beruhend auf dessen allelischen Variationen hinweist. Somit ergibt sich ein interessanter Ansatzpunkt für die Untersuchung eines solchen regulatorischen Mechanismus der *StF3'5'H* in tetraploiden Kultursorten.

Abbildung 4 b zeigt ein Modell, das unter Berücksichtigung der verfügbaren Literatur vielfältige regulatorische Mechanismen veranschaulicht, die Einfluss auf die essenzielle Funktion der *StF3'5'H* im Syntheseweig blauer/violetter Anthocyane (Abb. 4 a) und auf die

Knollenfärbung nehmen könnten. Dabei ergeben sich aus der Darstellung verschiedener Ebenen der *StF3'5'H*-Regulation zugleich potenzielle Ansatzpunkte für deren molekularbiologische Untersuchung. Der obere Teil der Abbildung 4 b zeigt schematisch den regulären Ablauf der *Stf3'5'h*-Expression in blau-violetter Knollengewebe (wie beispielsweise bei Kultivar „Vitelotte“), der in der Bildung funktionsfähiger, aktiver *StF3'5'H*-Proteine resultiert. In diesem Fall werden nach einigen zwischengeschalteten Reaktionsschritten (u. a. katalysiert durch die DFR und die ANS) die blauen und violetten Pigmente produziert. Im unteren Abbildungsteil hingegen werden verschiedene denkbare Möglichkeiten aufgezeigt, welche die Funktion oder Aktivität des *StF3'5'H*-Enzyms beeinträchtigen und so zur Rotfärbung von Kartoffelknollen einiger Sorten beitragen könnten (wie z. B. bei Kultivar „Königspurpur“). Die *Stf3'5'h*-Transkript- und somit auch die letztliche Proteinmenge könnten in solchen Sorten beispielsweise durch Veränderungen auf genomischer Ebene negativ reguliert werden. So könnten Sequenzpolymorphismen in der Promotorregion bestimmter *Stf3'5'h*-Allele die Bindung von Transkriptionsfaktoren (TFs) blockieren (1) oder einschränken (2). Eine Beeinträchtigung auf transkriptioneller Ebene könnte auch daraus resultieren, dass die entsprechenden TFs selbst einer veränderten Regulation unterliegen (hier nicht dargestellt) und nicht oder nur mäßig an die DNA binden. In beiden Fällen würde die Bildung bläulicher, delphinidinbasierter Anthocyane vermutlich ausbleiben oder stark verringert werden, sodass rote Pigmente den Knollenphänotyp dominieren. Bei Sequenzveränderungen in kodierenden Bereichen von *Stf3'5'h*-Allelen (3) wäre die Transkription vermutlich nicht beeinträchtigt. Jedoch bestünde die Möglichkeit, dass diese Unterschiede auf genomischer Ebene auch Auswirkungen auf Proteinebene zeigen. Im Falle nicht-synonymer Substitution (Veränderung der AS-Sequenz) könnten Proteine mit veränderter Funktionalität entstehen, die entweder eine verringerte Enzymaktivität oder abweichende Substratspezifität aufweisen (4). Beim Auftreten synonyme oder nicht-synonymer Nukleotidsubstitutionen könnte es dennoch zur Synthese funktionsfähiger *StF3'5'H*-Proteine kommen (5). Hier könnten *StF3'5'H*-nachgeschaltete Enzyme wie DFR oder ANS die Produktion blauer/violetter Anthocyane negativ regulieren und die Rotfärbung des Gewebes begünstigen. Andererseits könnten synonyme Nukleotidsubstitutionen in proteinkodierenden sowie in nichtkodierenden DNA-Abschnitten (in Abb. 4 b nicht dargestellt) eine veränderte Transkription (z. B. durch alternative Spleißstellen) oder eine veränderte Translationsrate (durch eventuelle Beeinflussung der mRNA-Faltung) bedingen.

Auch dies könnte die Synthese des *Stf3'5'h*-Enzyms und die nachfolgende Produktion blauer/violetter Anthocyane verringern.

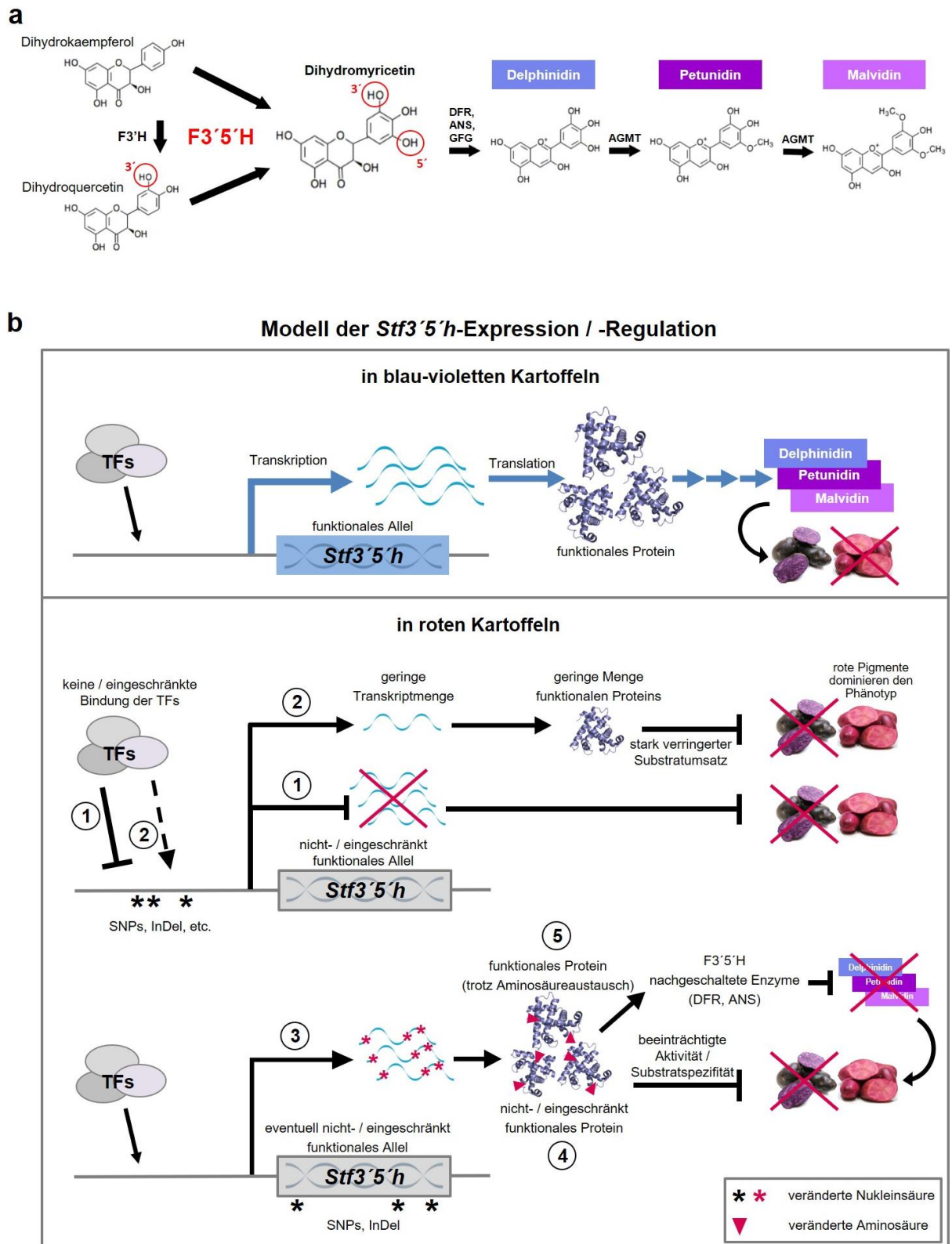


Abb. 4 Die Flavonoid-3',5'-Hydroxylase (F3'5'H) als Schlüsselenzym der Anthocyanbiosynthese. Die Hydroxylierung am 3'- und 5'-Kohlenstoffatom des B-Rings des Flavonoidgerüsts bildet die

Grundlage für die Synthese blauer und violetter Anthocyanpigmente (a). Dabei wird die 5'-Hydroxylierungsreaktion spezifisch durch die F3'5'H katalysiert. Ein Modell (b) veranschaulicht welche vielfältigen regulatorischen Mechanismen Einfluss auf die essenzielle Funktion der *StF3'5'H* im Synthesezweig blauer und violetter Anthocyane nehmen könnten: (1) z. B. SNPs oder InDel-Polymorphismen (*) im Promotor könnten die Bindung von Transkriptionsfaktoren (TFs) blockieren oder (2) einschränken und somit Einfluss auf die *Stf3'5'h*-Transkriptmenge nehmen. (3) Die Transkription von *Stf3'5'h*-Allelen mit Polymorphismen in kodierenden Bereichen könnte (4) im Falle nicht-synonymer Substitution (Veränderung der AS-Sequenz) in Proteinen mit veränderter Funktionalität resultieren und eine verringerte Enzymaktivität oder geänderte Substratspezifität bewirken. (5) Auch wenn funktionsfähige *StF3'5'H*-Proteine synthetisiert werden (eventuell infolge synonymer Substitutionen, oder trotz AS-Austausch), könnten nachgeschaltete Enzyme wie DFR oder ANS die Produktion blauer/violetter Anthocyane regulieren. Auch die Alleldosis (hier nicht dargestellt), die bei tetraploiden Kartoffeln wahrscheinlich eine Rolle spielt, kann Einfluss auf die Ausprägung des Phänotyps haben. *AGMT*, Anthocyanidinglycosid-*O*-methyltransferase; *ANS*, Anthocyanidinsynthase; *DFR*, Dihydroflavonol-4-reduktase; *GFG*, UDP-Glucose-3-*O*-Flavonoidglycosyltransferase. Strukturformeln der Metabolite entstammen der KEGG Datenbank (Kanehisa *et al.* 2015).

In *S. tuberosum*, als tetraploidem Organismus, könnten bis zu vier unterschiedliche Allele des *Stf3'5'h*-Gens vorliegen. Daher besteht neben den im Modell in Abb. 4 b dargestellten Regulationsebenen der *StF3'5'H* zudem die Möglichkeit eines Zusammenspiels dieser hypothetischen Mechanismen.

1.4. Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit lag in der Untersuchung des Stoffwechselzweiges der Anthocyanbiosynthese, der den Unterschied im Anthocyanprofil roter und blau-violetter Knollen in verschiedenen Kartoffelsorten bedingt.

Obwohl die meisten kommerziell genutzten Kartoffeln tetraploid sind, wurden bisherige genetische Studien zur Regulation der Anthocyanbiosynthese zum Großteil anhand diploider Spezies durchgeführt. Diese bieten aufgrund ihrer geringeren genetischen Komplexität zwar eine vereinfachte Handhabung, unterscheiden sich jedoch im System ihrer Anthocyanbiosynthese vermutlich maßgeblich von den verwandten tetraploiden Arten. Um dieses System in tetraploiden Spezies in seiner Vielfalt untersuchen zu können, sollten zunächst Sorten mit hoher Diversität im Anthocyanpektrum ausfindig gemacht werden.

Daher lautete die erste zentrale Frage, die im Rahmen dieser Arbeit beantwortet werden sollte:

- 1) Wie unterscheiden sich verschieden gefärbte Kartoffelakzessionen in Anthocyangehalt und -zusammensetzung?
 - ❖ Für die Erstellung dieser Anthocyanprofile sollten chromatographische und massenspektrometrische Ansätze zur Anwendung kommen.
 - ❖ Dabei sollten Knollenfleisch und -schale getrennt untersucht werden.

Doch was bedingt die Unterschiede im Anthocyanprofil roter und blau-violetter Kartoffelknollengewebe? Im komplexen Syntheseweg der Anthocyane kommt der Flavonoid-3',5'-hydroxylase (F3'5'H) eine Schlüsselrolle zu, da nur dieses Enzym die 5'-Hydroxylierung des Grundgerüsts der blauen bzw. violetten, delphinidinbasierten Anthocyane katalysieren kann. Die Hypothese dieser Studie war daher, dass die *StF3'5'H* in verschiedenfarbigen Kartoffelknollen unterschiedlich reguliert wird, was zu einer differenziellen Produktion delphinidinbasierter Pigmente führt. Um diese Hypothese zu verifizieren, sollten vergleichende Studien zur Regulation der *StF3'5'H* in verschieden gefärbten Kartoffelakzessionen durchgeführt werden. Im Hinblick darauf, dass es zahlreiche Ebenen der Regulation dieses Enzyms gibt, sollte folgendes untersucht werden:

- 2) Gibt es Hinweise auf genomischer, transkriptionaler oder auf Proteinebene der *StF3'5'H*, die für die Variationen im Anthocyanprofil ursächlich sein könnten?
 - ❖ Hierfür sollte die genomische Region des *Stf3'5'h*-Genlocus aus ausgewählten Kartoffelakzessionen amplifiziert, sequenziert und im Hinblick auf Mutationen und Polymorphismen vergleichend analysiert werden.
 - ❖ Parallel dazu sollte die Transkription des *Stf3'5'h*-Gens in den Knollen mittels quantitativer *real time* PCR untersucht werden.
 - ❖ Um das *StF3'5'H*-Protein in verschiedenfarbigen Knollen nachzuweisen sollte ein *StF3'5'H*-spezifischer Antikörper generiert und ein immunologischer Proteinnachweis durchgeführt werden. Zusätzlich sollten LC-MS-basierte Ansätze die Ergebnisse zur *StF3'5'H*-Abundanz verifizieren und ergänzen.

2. Material und Methoden

2.1. Pflanzenmaterial

2.1.1. Kartoffelakzessionen

Für diese Promotionsarbeit wurden ausschließlich Kartoffelpflanzen der Spezies *Solanum tuberosum* verwendet. Knollen von 57 farbigen Kultursorten wurden von der IPK-Genbank (Teilsammlungen Nord, Groß Lüsewitzer Kartoffel-Sortimente (GLKS)) bereitgestellt und sind in Appendix Tabelle A1 gelistet. Des Weiteren wurde der gelbknollige Kultivar „Gala“ (Akzession 88888, im Weiteren auch als Linie #58 bezeichnet) des GLKS als Kontrolllinie ohne Anthocyanpigmentierung genutzt.

Das analysierte Sortiment an Kartoffelakzessionen beinhaltet Nachkommen der Selbstung zweier Sorten, „Violettfleischige“ (Nachkommen A bis C) und „Blue Marker“ (Nachkomme A und B). Darüber hinaus wurden Nachkommen der Kreuzung von „Violettfleischige x Blue Marker“ (Nachkommen A bis D) in die Metabolitanalysen einbezogen. Im Fall der Nachkommen von „Violettfleischige“ und „Violettfleischige x Blue Marker“ wurde jeweils ein Genotyp zu zwei verschiedenen Vegetationsperioden in Groß Lüsewitz kultiviert (Appendix Tab. A1, Einträge A1 (2013) und Einträge A2 (2014)). Zusammen mit der Anpflanzung aller Kultivare 2015 an einem anderen Standort (Gatersleben) bot die Auswahl dieses Materials daher die Möglichkeit zur Untersuchung umweltbezogener und temporaler Einflüsse (Standort und Anbaujahr) für nahe verwandte Kultivare, sowie innerhalb einer Nachkommenschaft.

2.1.2. Anzuchtbedingungen und Knollenernte

Feldvermehrung

Der Anbau von Kartoffeln im Feld erfolgte nach bester landwirtschaftlicher Praxis an zwei verschiedenen Standorten: (1) für LC-UV/MS-Analysen in Groß Lüsewitz zu zwei Anbauperioden (2013 und 2014) und (2) für MRM-Analysen in Gatersleben (2015) (siehe auch Oertel *et al.* 2017). Mit Beginn einer jeden Wachstumsperiode im Mai erfolgte die Ernte

reifer Knollen nach etwa fünf bis sechs Monaten, nach Verwelken der krautigen Pflanzenteile.

Anbau im Gewächshaus

Die Anzucht von Knollen für molekularbiologische Untersuchungen erfolgte nahezu unter natürlichen Bedingungen, in Kleingewächshäusern ohne künstliche Beleuchtung und Temperierung (Abb. 5 a), etwa von Anfang Mai bis Ende Oktober. Um die Ernte von Knollen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung und während des weiteren Wachstums der Pflanzen zu ermöglichen, wurden jedoch alle Pflanzen im Topf angezogen. Die Nutzung von Kleingewächshäusern galt daher im Besonderen dem Schutz vor Wind und somit vor dem Umfallen der Topfpflanzen.

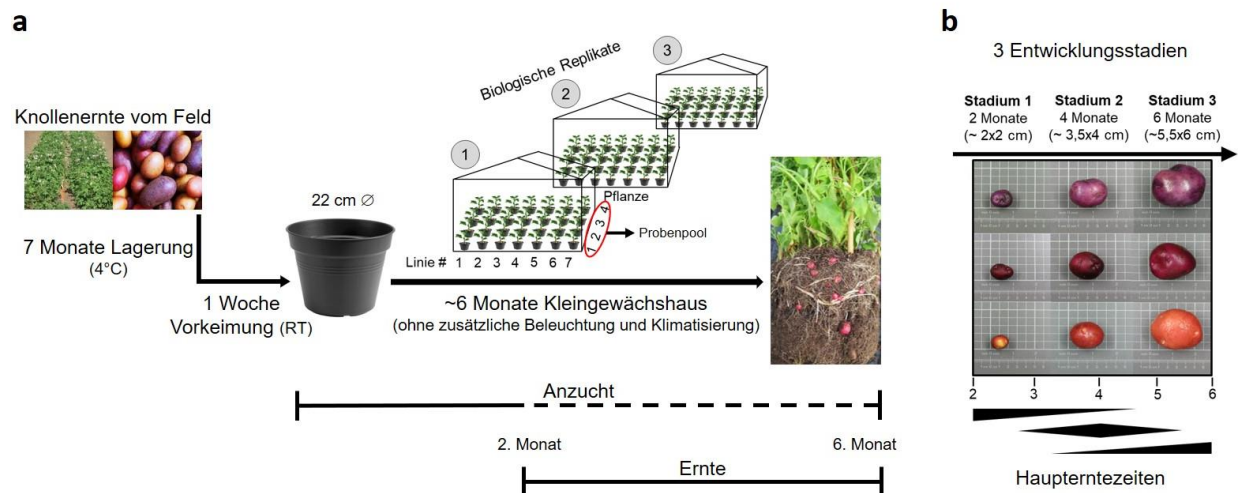


Abb. 5: Schema zum Gewächshausanbau (a) und der Ernte (b) von Kartoffelknollen unterschiedlicher Entwicklungsstadien für reproduzierbare molekularbiologische Analysen.

Der Anbau erfolgte in drei als biologische Replikate dienenden Wiederholungen in Form von separaten Gewächshausanpflanzungen (Abb. 5 a). Die Ernte verschiedener Knollenentwicklungsstadien wurde für jedes Gewächshaus gleichermaßen durchgeführt (Abb. 5 b). Die Selektion der Knollen orientierte sich entsprechend an verschiedenen Reifegraden, basierend auf Knollengröße und ungefähre Dauer der Kultivierung. Die Ernte junger Knollen, unmittelbar nach deren vollständiger Ausbildung (*Stadium 1*, Knollengröße ~2 x 2 cm) begann zwei Monate nach Pflanzung. Der Haupterntezeitpunkt eines intermediären Entwicklungsstadiums zwischen Knollenbildung und Reife (*Stadium 2*, ~3,5 x

4 cm) lag bei etwa vier Monaten. Erntereife, ausgewachsene Knollen (*Stadium 3*, ~5,5 x 6 cm) lagen einhergehend mit dem Vergehen des Krautes fünf bis sechs Monate nach Pflanzung vor. Die genaue Korrelation zwischen Reifegrad und Erntezeitpunkt ist sortenspezifisch. Die Anthocyankonzentration ist jedoch generell eher von der Knollengröße abhängig, als vom Zeitpunkt der Ernte oder dem Alter der Pflanze (Lewis *et al.* 1999).

2.1.3. Aufarbeitung des Knollenmaterials

Die Knollen eines jeweiligen Entwicklungsstadiums aller vier Pflanzen einer Linie, pro biologischem Replikat, wurden nach der Ernte als Probenpool (Olsen *et al.* 2010) zusammengefasst (Abb. 5). Dabei wurde darauf geachtet, Knollen von mindestens drei der vier Pflanzen pro Linie in etwa gleichen Verhältnissen in einem Probenpool zu vereinigen. Eine Poolprobe des Stadiums 1, 2 bzw. 3 enthielt jeweils ein entsprechendes Minimum an 20, 12 oder 10 Knollen. Somit konnte die Gewinnung einer genügenden Menge an Probenmaterial gewährleistet werden. Darüber hinaus entsteht so ein verlässlicherer Probensatz, in welchem eine jede Probe ein Gemisch aus mindestens 10 einzelnen Knollen von wenigstens drei Individuen darstellt.

Die Aufarbeitung der Knollen aus Feldvermehrung und Gewächshausanbau erfolgte unmittelbar nach der Ernte. Knollenfleisch und -schale wurden manuell sorgfältig voneinander getrennt, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Lyophilisierung bei -80 °C gelagert. Anschließend wurde das Material in einer Probenmühle (Tube Mill 100 control, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau) zu einem feinen, homogenen Pulver zermahlen und bis zum weiteren Gebrauch bei 4 °C, dunkel und trocken gelagert. Es erfolgte jeweils die Aufarbeitung der gesamten Knolle, da die Anthocyankonzentration in verschiedenen Sektoren (Stielende und apikales Ende) variieren kann (Lewis *et al.* 1999).

2.2. Methoden zur phytochemischen Charakterisierung verschiedener Kartoffelgewebe

Nachfolgende Methoden wurden bereits in Oertel *et al.* (2017) beschrieben.

2.2.1. Extraktion von Anthocyanen und anderen Polyphenolen

Alle verwendeten Lösungsmittel wurden von der Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen) in LC-MS-Qualität bezogen.

Extraktion aus lyophilisiertem Kartoffelknollengewebe (Fleisch und Schale)

Für die LC-UV/MS-basierte Metabolitprofilanalyse wurde Fleisch bzw. Schale von jeweils drei Knollen pro Linie zu einer Poolprobe vereint. Verwendet wurden erntereife Knollen aus dem Feldanbau (Abschnitt 2.1.2., *Feldvermehrung*). Die Herstellung von Extrakten erfolgte aus 100 mg lyophilisiertem, gemahlenem Material (Abschnitt 2.1.3.) unter Verwendung eines Gemisches aus 70 % Methanol und 2 % Ameisensäure. Die Proben wurden nach Zugabe von 500 µl dieser Extraktionslösung für 3 s gevortext, anschließend für 30 min in einem Thermomixer bei 4 °C geschüttelt und dann 10 min bei 4 °C und 28.000 g zentrifugiert. Die Überstände wurden in frische Reaktionsgefäße überführt. Nach Wiederholung dieser Prozedur wurden beide Überstände vereinigt. Für jede Probe wurden zwei unabhängige Extrakte hergestellt (technische Replikate).

Für die Herstellung von Proben für LC-MS/MRM-Analysen wurden sechs Knollen von zwei bis fünf Pflanzen pro Linie randomisiert gepoolt. Die Extraktionsmethode entspricht der oben beschriebenen, jedoch ohne Ansäuerung der Extraktionslösung. Für jede Probe wurden drei unabhängige, als technische Replikate dienende, Extrakte hergestellt.

Extraktion aus jungen Knollentrieben

Zur Probenvorbereitung für die Anthocyanprofilanalyse in Knollentrieben mittels LC-UV/MS wurde in zwei unabhängigen Ansätzen Material von jeweils drei Knollen verwendet. Für jedes dieser beiden technischen Replikate wurden junge Triebe von etwa 1-2 cm Länge zu je 500 mg eingewogen. Das Material wurde im Mörser homogenisiert und mit 500 µl des Gemisches aus 70 % Methanol und 2 % Ameisensäure versetzt. Die weitere Durchführung erfolgte nach oben beschriebenenem Verfahren zur Anthocyanextraktion aus lyophilisiertem Kartoffelknollengewebe.

2.2.2. LC-UV/MS Metabolitprofilanalyse

Das LC-UV/MS Profiling wurde unter Verwendung eines *ultra performance* Flüssigchromatographiegerätes (UPLC, H-class, Waters, Milford, MA, USA) mit Photodiodenarray (PDA) -Detektion, gekoppelt an ein ultra-hochauflösendes *time-of-flight* Massenspektrometer (UHR-TOF-MS, maXis Impact, Bruker Daltonics, Bremen) für die MS-Detektion, realisiert. Nach Zentrifugation der Extrakte wurden jeweils 3 µl Probe injiziert. Die LC-Trennung erfolgte als Umkehrphase über eine Acquity UPLC® CSH Phenyl-Hexyl-Säule (130 Å, 2,1 x 100 mm, 1,7 µm, Waters) in Kombination mit einer Acquity UPLC® CSH Phenyl-Hexyl VanGuard Vorsäule (130 Å, 2,1 x 5 mm, 1,7 µm, Waters), mit folgendem Gradientensystem: von 98 bis 90 % Laufmittel (LM) A für die ersten 3 min, von 90 bis 80 % LM A von 3 bis 7 min, von 80 bis 2 % LM A von 7 bis 10 min und ein isokratischer Halt für 3 min zur Reinigung der Säule.

LM A: 18,2 mM Wasser (Merck, Darmstadt) / 0,5 % (v/v) Ameisensäure

LM B: Acetonitril (Chemsolute, Renningen) / 0,5 % (v/v) Ameisensäure

Die Säulentemperatur betrug 35 °C und die Flussrate wurde auf 500 µl/min festgelegt. Die UV/Vis-Detektion erfolgte in einer Spanne von 210 nm bis 800 nm. Chromatogramme wurden bei einer Wellenlänge von 515 nm visuell auf die Abundanz von Anthocyanen untersucht. Für die MS-Detektion wurde der Auslass des PDA-Detektors an die Elektrosprayionisierungsquelle (ESI-Quelle: positiver Ionenmodus bei 220 °C, Zerstäubung bei 4 bar, 4000 V Kapillarspannung, Gasfluss von 11 l/min) des UHR-TOF-MS-Instruments gekoppelt. Dabei wurde ein Splitter zwischengeschaltet, der 83 % des Eluats in die Ionenquelle leitet. Die Instrumenteneinstellungen des Massenspektrometers wurden wie folgt gewählt: Massenbereich m/z 50–1500, Hexapol-Hochfrequenzspannung (*radio frequency*, RF) von 100 V *peak-to-peak* (Vpp), Kollisionsenergie (*collision energy*, CE) von 8 V, Trichter1-RF von 300 Vpp, Trichter2-RF von 600 Vpp, *prepulse storage time* von 15 µs, Transferzeit von 50 µs, Kollisionszell-RF von 500 Vpp.

Analyse und Visualisierung von LC-UV/MS-basierten Metabolitdaten

Die LC-UV/MS-Daten wurden zum Aufspüren molekularer Eigenschaften zunächst anhand der Bruker Compass DataAnalysis Software (Version 4.1) analysiert. Resultierende Retentionszeit (RT)/Masse-Paare wurden anschließend für die Extraktion von Ionenchromatogrammen (*extracted ion chromatograms*, EICs) und die Integration von Peakflächen (Daten zugänglich unter <http://dx.doi.org/10.5447/IPK/2019/16>) mittels

QuantAnalysis 2.1 Software (Bruker Daltonics) genutzt. Eine Hauptkomponentenanalyse (*principal component analysis*, PCA) wurde mit dem entsprechenden Modul der Bruker Compass ProfileAnalysis 2.1 Software durchgeführt. Die Annotation detektierter Substanzen basiert auf dem Vergleich der gemessenen RTs und Massen der Molekülonen mit Literaturdaten und Einträgen in Metabolitdatenbanken wie KEGG, PubChem, ChemSpider und Metlin (Appendix Abb. A2 g).

2.2.3. LC-MS/MRM Metabolitprofilanalyse

Die Metabolitprofilanalyse mittels LC-Trennung in Verbindung mit der Detektion durch Tandem (auch *triple quadrupole*, TQ) -MS (TQMS) erfolgte unter Verwendung eines Acquity UPLC Systems (Waters), gekoppelt an ein Xevo TQ MS System (Waters). Alle verwendeten Lösungsmittel wurden von Sigma-Aldrich (Milano, Italien) in LC-MS-Qualität bezogen. Unmittelbar vor der Injektion wurden die Extrakte filtriert (Millex-GV Spritzenfilter, 0,22 µm, Polyvinylidendifluorid (PVDF), 33 mm, Millipore, Darmstadt). Für jedes der drei Extrakte pro Probe (siehe Abschnitt 2.2.1.) wurden zweimal je 2 µl injiziert. Diese sechs Replikate pro Probe wurden in randomisierter Abfolge gemessen.

Die Trennung von Anthocyanen erfolgte auf einer RP Acquity UPLC® BEH C18 Säule (130 Å, 2,1 x 150 mm, 1,7 µm, Waters) mit einer vorgeschalteten Acquity UPLC® BEH C18 Vorsäule (130 Å, 2,1 x 5 mm, 1,7 µm, Waters). Dabei wurde der folgende mehrstufige Gradient verwendet: von 95 bis 60 % LM A für die ersten 4 min, von 60 bis 45 % LM A von 4 bis 9 min, von 45 bis 5 % LM A von 9 bis 11 min und ein isokratischer Halt für 3 min, bei einer Flussrate von 300 µl/min.

LM A: 18,2 mΩ Wasser / 5 % (v/v) Ameisensäure

LM B: Methanol / 5 % (v/v) Ameisensäure

Die Säulentemperatur betrug 40 °C. ESI erfolgte in positivem Modus bei 150 °C Quelltemperatur, 500 V Kapillarspannung, einem Desolvatisierungsgasfluss von 1000 l/h und einer Desolvatisierungstemperatur von 500 °C. Die Anthocyanannotation basiert auf Literaturdaten (Tab. 2) sowie auf Einträgen in Metabolitdatenbanken (KEGG, PubChem, ChemSpider, Metlin).

Andere Polyphenole wurden über eine Acquity UPLC® HSST3 Säule (100 Å, 2,1 x 100 mm, 1,8 µm, Waters) in Kombination mit einer Acquity UPLC® HSST3 Vorsäule (100 Å, 2,1 x 5

mm, 1,8 μm , Waters) getrennt. Die Flussrate des LM betrug 400 $\mu\text{l}/\text{min}$ mit folgendem Gradientensystem: von 95 bis 80 % LM A für die ersten 4,5 min, von 80 bis 55 % LM A von 4,5 bis 9 min, von 55 bis 0 % LM A von 9 bis 11 min und ein isokratischer Halt für 3 min.

LM A: 18,2 m Ω Wasser / 0,1 % (v/v) Ameisensäure

LM B: Acetonitril / 0,1 % (v/v) Ameisensäure

Die Säulentemperatur wurde auf 40 °C eingestellt. Für die ESI betrug die Kapillarspannung 3,5 kV im positiven und -2,5 kV in negativem Modus (Vrhovsek *et al.* 2012). Die Quelltemperatur betrug 150 °C und die Desolvatisierungstemperatur 500 °C. Die Flussrate des Gaskegels wurde auf 50 l/h festgelegt und der Desolvatisierungsgasfluss auf 800 l/h. Die auf der Basis kommerzieller Standardsubstanzen generierte MRM-Messmethode nach Vrhovsek *et al.* (2012) ermöglichte die Annotation der in Tabelle 3 gelisteten Kartoffelpolyphenole (P1-P31). Für jede Substanz wurden zwei unabhängige und orthogonale Variablen (Retentionszeit und zwei MRM-Transitionen) in Relation zu einem unter identischen experimentellen Bedingungen analysierten authentischen Standard betrachtet. Daher sind alle Annotationen der Level 1-Metabolitidentifizierung (*non-novel*, bereits bekannt) zuzuordnen (Sumner *et al.* 2007).

Zur verlässlichen Unterscheidung von Peaks spezifischer Molekülonen mit geringfügig unterschiedlichem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis wurde eine *unit mass resolution* auf jeden Quadrupol angewandt. Dies gewährleistet eine hohe Peak- bzw. Massenauflösung und Massengenauigkeit für eine sichere Metabolitidentifizierung. Die entsprechenden MRM-Konfigurationen sind in Tabelle 2 und 3 gelistet.

Analyse und Visualisierung des LC-MS/MRM-Datensatzes

Die Erstauswertung der MRM-Rohdaten erfolgte unter Verwendung der MassLynx 4.1 und TargetLynx Software (Waters, Eschborn). Statistische Analysen wurden von Dr. Anja Hartmann (Bioinformatikerin, IPK Gatersleben) unter Verwendung der R Software (RCoreTeam 2016) durchgeführt und mittels *package gplots* (Warnes *et al.* 2015) visualisiert. Eine hierarchische Clusteranalyse (euklidische Distanz-Analyse mit *complete linkage* Algorithmus) \log_{10} -transformierter Intensitätswerte phenolischer Metabolite (ermittelt aus MRM-Peakflächen, zugänglich mittels *DOI resolving service* unter 10.5447/IPK/2019/16) wurde vorgenommen, um die Identifizierung von Strukturen im Datenbestand und einen besseren Vergleich hoher und niedriger Werte zu ermöglichen. Ein Dendrogramm in Kombination mit einer Heatmap veranschaulicht die Ergebnisse des Clustering. Basierend

auf den integrierten Peakflächen der MRM-Analyse wurde zusätzlich eine Pearson-Korrelationsanalyse zwischen den Intensitäten phenolischer Metabolite der unterschiedlichen Kartoffelsorten durchgeführt. Die resultierenden Korrelationskoeffizienten wurden in einer Heatmap-Darstellung, in einer Wertematrix und in Form von Streudiagrammen (engl. *scatter plots*) inklusive Regressionsgeraden visualisiert. Die Signifikanz ist durch *P*-Wert-Kategorien angegeben: *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$, • $P < 0,1$. Zudem wurde das VANTED (*Visualization and Analysis of Networks containing Experimental Data*) Framework (Rohn *et al.* 2012) zur Generierung des schematischen Anthocyanbiosynthesewegs in Kartoffelknollen genutzt.

2.3. Molekularbiologische Standardmethoden

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Chemikalien und Substanzen von QIAGEN (Hilden), Sigma (Deisenhofen), Roth (Karlsruhe), AppliChem (Darmstadt), Fluka (Ulm) und Merck (Darmstadt) bezogen.

2.3.1. Präparation von genomischer DNA aus Blattmaterial

Je 500 mg eines Probenpools an Blattmaterial von vier Individuen pro Kartoffelakzession wurden unter Zugabe von flüssigem Stickstoff manuell gemörsert. Das homogene Pulver wurde noch in gefrorenem Zustand mit 1,2 ml Extraktionspuffer (200 mM Tris-HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 25 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 0,5 % Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS), 2 % β -Mercaptoethanol, 1 % RNase A) versetzt und 1 h bei 60 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden jeweils mit einem Volumen (Vol) Phenol/Chloroform (1:1) versetzt, gut gemischt und dann 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde erneut 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Danach erfolgte die Fällung der DNA aus den Überständen durch Zugabe von 0,7 Vol Isopropanol, vorsichtiges Mischen und 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Nachfolgend wurden die Proben 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die DNA-Pellets wurden mit je 500 μ l 70%igem Ethanol gewaschen, erneut für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und dann getrocknet. Jedes DNA-Pellet wurde in 30 μ l

nukleasefreiem Wasser resuspendiert. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.3.2. Isolierung von Gesamt-RNA aus Kartoffelknollengewebe

Die RNA-Isolierung aus Knollenfleisch- und Knollenschalenproben (siehe Abschnitt 2.1.3.) erfolgte in Anlehnung an eine Methode von Furtado für stärkehaltiges Gewebe (Furtado 2014). Hierfür wurden jeweils 50 mg lyophilisiertes, gemahltes Probenmaterial (Kumar *et al.* 2007) mit 500 µl TRIzol™ Reagenz (Ambion Life Technologies, Carlsbad, USA) versetzt und für 2-3 min vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubation von 5 min wurden die Proben für 10 min bei 17.500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils mit 100 µl Chloroform durch kräftiges Schütteln für 15 s gemischt und 2-3 min inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 12.000 x g und 4 °C für 10 min. Die nächsten Schritte sind Teil des RNeasy Plant Mini Kit-Protokolls (QIAGEN GmbH, Hilden). Der Überstand (wässrige RNA-Lösung) wurde mit 1 Vol RLC-Puffer versetzt und durch mehrfaches Invertieren gemischt. Nach Zugabe von 0,5 Vol Ethanol (96-100 %) und mehrmaligem Invertieren erfolgte der sofortige Transfer des Ethanol-RNA-Mixes auf eine RNeasy *spin*-Säule. Zur Bindung der RNA an die Membran folgte eine zweiminütige Inkubation. Anschließend wurden die Proben für 15 s bei 7.400 x g zentrifugiert. Dem schloss sich ein DNase I-Verdau direkt auf der Säulenmembran an, der exakt nach Herstellerangaben durchgeführt wurde. Danach erfolgte das Waschen der Säulenmembran durch Zugabe von 500 µl RPE-Puffer und Zentrifugation bei 10.000 rpm für 15 s. Dieser Waschschrift wurde mit zweiminütiger Zentrifugation wiederholt. Die RNeasy *spin*-Säule wurde erneut für 1 min mit 17.500 rpm zentrifugiert, um den Puffer restlos zu entfernen. Die RNA wurde durch Zugabe von 50 µl RNase-freiem Wasser und einer Inkubation von 5 min von der Membran gelöst und durch Zentrifugation für 1 min bei 10.000 rpm von der Säule eluiert.

Die so isolierte RNA wurde mittels photometrischer Messung (entsprechend Abschnitt 2.3.3.) und Agarose-Formaldehyd-Gelelektrophorese (gemäß Abschnitt 2.3.6.) auf Qualität und Integrität überprüft, bevor sie für weitere Analysen eingesetzt wurde. RNA-Proben wurden während des Gebrauchs fortwährend auf Eis gehalten, bzw. kurzfristig für einige Tage bei -80 °C gelagert.

2.3.3. Bestimmung der Konzentration und Qualität von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde anhand der Extinktion (Optische Dichte, OD) mit einem NanoDrop™ 2000c Spektralphotometer (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham MA, USA) bestimmt. Dabei wurden die Extinktionswerte der Nukleinsäurelösungen bei den Wellenlängen 260 nm (Absorbanzmaximum für Nukleinsäuren) und 280 nm ermittelt. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht einer Konzentration von 50 ng/μl doppelsträngiger DNA, 33 ng/μl einzelsträngiger DNA oder 40 ng/μl RNA. Der Quotient von OD₂₆₀/OD₂₈₀ gibt ein Maß für die Reinheit einer Nukleinsäurelösung, insbesondere in Bezug auf Proteinkontaminationen (aber auch Phenole und andere Kontaminanten), an und sollte bei DNA-Lösungen ~1,8 und bei RNA-Lösungen ~2,0 betragen. Als zusätzliches Maß der Nukleinsäurereinheit in Bezug auf Kontaminanten, die bei 230 nm absorbieren (Kohlenhydrate, phenolische Substanzen wie TRIzol Reagenz, Guanidin), wurde das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm und 230 nm (OD₂₆₀/OD₂₃₀) betrachtet. Entsprechende Werte sollten bei 2,0-2,2 liegen. Alle hier aufgeführten Angaben entstammen der technischen Anleitung und dem technischen Bericht (T042 Rev 1/11) für Nukleinsäuremessung mittels NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham MA, USA).

2.3.4. Reverse Transkription

Die Synthese von cDNA (komplementäre DNA) aus 1 μg frisch extrahierter Gesamt-RNA erfolgte unter Verwendung des Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit und Oligo(dT)-Primern (Thermo Fisher Scientific, Dreieich) in einem 20μl-Ansatz. Zudem wurde jeweils ein Reaktionsansatz ohne RNA-Template mitgeführt, der als Negativkontrolle für die nachfolgende qRT-PCR (Abschnitt 2.3.5.2.) eingesetzt wurde. Die cDNA-Proben und -Kontrollansätze wurden bei Bedarf kurzzeitig (für einige Tage) bei -20 °C gelagert.

2.3.5. PCR

2.3.5.1. *Touch down*-PCR

Mit Hilfe der *touch down*-PCR-Methode und unter Verwendung der Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt) erfolgte die Amplifikation des *Stf3* 5' *h*-

Locus von genomischer DNA. Verwendete Oligonukleotide inklusive Sequenz sind unter Abschnitt 2.3.5.3. gelistet. Die Reaktionen setzten sich wie folgt zusammen:

4 µl	5x Phusion HF Puffer
0,4 µl	10 mM dNTPs
1 µl	Primer <i>forward</i> (Stf35h_F, 10 µM)
1 µl	Primer <i>reverse</i> (Stf35h_R, 10 µM)
100 ng	Template
0,5 U	Phusion HF DNA-Polymerase
ad 20 µl	H ₂ O

Die Reaktionen wurden unter Verwendung des folgenden PCR-Programms im Mastercycler ep gradient S (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt:

Initiale Denaturierung	98 °C	2 min	1 Zyklus
Denaturierung	98 °C	10 s	} 17 Zyklen
Annealing	65-48 °C, -1 °C pro Zyklus	10 s	
Elongation	72 °C	2 min 30 s	
Denaturierung	98 °C	10 s	} 25 Zyklen
Annealing	58 °C	10 s	
Elongation	72 °C	2 min 30 s	
Finale Elongation	72 °C	10 min	1 Zyklus

Das gewählte *touch down*-Programm ermöglicht eine DNA-Amplifikation bei der für die verwendete Primerkombination optimalen *annealing*-Temperatur. Dabei wird die anfängliche *annealing*-Temperatur von 65 °C um 1 °C pro Zyklus bis zu einer Temperatur von 48 °C verringert. Dies erlaubt eine schrittweise Annäherung von einer höheren Temperatur zur niedrigeren Optimumtemperatur und hilft dabei unspezifische Amplifikationen weitestgehend zu vermeiden. Daran anschließend folgten 25 Zyklen Amplifikation bei einer mittleren *annealing*-Temperatur von 58 °C.

2.3.5.2. qRT-PCR

Sämtliche Arbeitsschritte von der Probenname und Aufarbeitung (Abschnitt 2.1.2., *Anbau im Gewächshaus*, und 2.1.3.) über die Isolierung von Gesamt-RNA (Abschnitt 2.3.2.), die reverse Transkription (Abschnitt 2.3.4.) und das experimentelle Design der qRT-PCR-Analyse bis hin zu deren Auswertung wurden entsprechend der MIQE (*minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*) -Richtlinien (Bustin *et al.* 2009)

durchgeführt. Dies soll die Reproduzierbarkeit und akkurate Messungen der Transkriptabundanz gewährleisten.

Für jede Probe (Poolproben entsprechend Abschnitt 2.1.3. für jeweils drei verschiedene Knollenentwicklungsstadien und zwei -gewebe pro untersuchter Linie) wurden drei biologische (siehe Abschnitt 2.1.2., *Anbau im Gewächshaus*) und drei technische Replikate analysiert (Udvardi *et al.* 2008; Rieu und Powers 2009). Letztere wurden jeweils im selben Lauf auf einer *real-time* PCR-Platte gemessen.

Das *f3'5'h*-Gen lag als Zielgen im Fokus der Analyse. Die Generierung genspezifischer Primer beinhaltete folgende Kriterien: $T_m = 60$ °C, Länge ~22 Basen, Erzeugung eines kurzen, einzigartigen PCR-Produktes von 100-150 bp (SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix Anleitung, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules CA, USA; Udvardi *et al.* 2008). Zudem wurde darauf geachtet, dass das Amplicon eine Exon-Exon-Grenze beinhaltet. Dies verhindert die Amplifikation eventuell noch in den Proben verbliebener genomischer DNA. Darüber hinaus wurden die Primer für eine Amplifikation der cDNA im 3'-Bereich konzipiert, da die Reverse Transkription der mRNA in cDNA am 3'-poly(A)-Ende beginnt und die Extension nicht immer bis zum 5'-Ende erfolgt. Jeweils drei *forward* und *reverse* Primer für die Analyse der *f3'5'h*-Transkriptabundanz wurden entsprechend dieser Faktoren designed und mittels Standard-PCR (Sambrook *et al.* 1989) in sämtlichen Kombinationen getestet. Die effizienteste Primerkombination wurde für die qRT-PCR-Analyse ausgewählt (St_f35h_qRT_F und St_f35h_qRT_R, Amplicongröße 141 bp). Für die Normalisierung der Transkriptabundanzen des Zielgens wurden zunächst fünf Referenzgene (Haushaltsgene) und zugehörige Primerpaare anhand von Literaturangaben ausgewählt (Nicot *et al.* 2005). Diese wurden in einem qRT-PCR-Vorversuch unter den geplanten Reaktionsbedingungen hinsichtlich der Stabilität ihrer Transkriptraten überprüft. Dabei wurden drei dieser Haushaltsgene ausgesucht, *ef1* (Elongationfaktor 1- α), *L2* (cytoplasmatisches ribosomales Protein L2) und *aprt* (Adenin-Phosphoribosyltransferase), die durchweg in allen zu vergleichenden Geweben und Entwicklungsstadien konstitutiv und stabil exprimiert werden. Die zur Amplifikation des *f3'5'h*-Gens und der Referenzgene verwendeten Primer sind in Abschnitt 2.3.5.3. tabellarisch gelistet.

Für die Reaktion wurde je 1 ng cDNA in einem 10 μ l-Reaktionsansatz mit jeweils 10 μ M *forward* und *reverse* Primer sowie 5 μ l des SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules CA, USA) und nukleasefreiem H₂O

gemischt. Die Durchführung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers des *real-time* PCR-Reagenz. Dafür wurde zunächst pro verwendetem Primerpaar ein homogener Assay-Mastermix der genannten Komponenten mit Ausnahme des cDNA-Templates hergestellt und jeweils gleiche Aliquots in die Vertiefungen einer 384-Well-PCR-Platte pipettiert. Anschließend wurde die cDNA (2 µl einer 1:100 Verdünnung der nach Abschnitt 2.3.4. hergestellten cDNA) einzeln zugegeben, die Platte mit transparenter Folie verschlossen, gut gemixt und kurz abzentrifugiert. Die Platte wurde in ein CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detektionssystem (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules CA, USA) eingesetzt und die Reaktion nach folgendem Temperaturzyklus-Protokoll durchgeführt:

Polymeraseaktivierung und DNA-Denaturierung	95 °C	30 s	1 Zyklus
Denaturierung	95 °C	10 s	} 44 Zyklen
Annealing / Elongation / <i>Plate-Read</i>	60 °C	30 s	
Denaturierung	95 °C	10 s	1 Zyklus
Schmelzkurvenanalyse	65-95 °C, mit 0,5 °C	5 s	Erhöhung pro Schritt

Auf jeder PCR-Platte wurden neben den Proben verschiedene definierte Kontrollansätze mitgeführt: die Negativkontrolle (NK) der reversen Transkription (siehe Abschnitt 2.3.4.), ein qRT-PCR-Mastermix ohne cDNA-Template (*none-template control*, NTC) und ein Standard-Mix/Pool aus allen 1:100 verdünnten cDNAs (siehe Abschnitt 2.3.4.) (Hellemans *et al.* 2007). Letzterer setzte sich aus jeweils 10 µl einer jeden cDNA-Probe zusammen und wurde in zwei Verdünnungsreihen (1:2 und 1:5) bis zu den Verdünnungsstufen 1:64 bzw. 1:15.625 eingesetzt. Mit jedem Kontrollansatz und jeder Probe wurde ein Assay für das Zielgen und die drei Referenzgene durchgeführt. Anhand der Assays der standardisierten Verdünnungsreihen konnten die spezifischen Primer-Effizienzen ermittelt werden, welche in die Berechnung der Transkriptabundanz einbezogen wurden.

Mittels Bio-Rad CFX Manager Software (Version 3.1, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules CA, USA) erfolgte im Anschluss an die PCR eine Analyse der Schmelzkurven. Das Vorhandensein eines einzelnen Peaks in jeder Schmelzkurve bestätigte dabei das Auftreten nur eines spezifischen PCR-Produktes. Für die gemessenen Fluoreszenzsignale wurden Amplifikationskurven akquiriert, anhand derer automatisiert der jeweilige Schwellenwertzyklus (*cycle threshold*, ct) ermittelt wurde. Dabei handelt es sich um den Zyklus, an dem die Fluoreszenz der Reaktion erstmals signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt (Beginn der exponentiellen Phase) und dessen Wert zur Quantifizierung der erhaltenen

Signale eingesetzt wurde. Die gemessene Fluoreszenz ist dabei proportional zu der entstandenen Menge an PCR-Produkt. Die ct-Werte wurden zur automatisierten Berechnung (delta-delta-ct-Methode) und Visualisierung der kalibrierten, normalisierten (Effizienzkorrektur, Normalisierung zu mehreren Referenzgenen, Kalibrierung zwischen verschiedenen Läufen (*inter-run calibration*, IRC)) relativen *Stf3 5' h*-Transkriptexpressionsmengen in qBase+ 2.3 (Vandesompele *et al.* 2002; Hellemans *et al.* 2007) importiert. Dabei wurden folgende Parameter festgelegt: zielgen- und laufspezifische Amplifikationseffizienzen, IRC, Skalierung der Abundanz des Zielgens zur Kontrollgruppe (in diesem Fall gelbes Gewebe als Kontrollgruppe) und Datenexport in linearer Skalierung. Anhand der Analyse der Amplifikationskurven identifizierte Ausreißer der ct-Werte wurden aus den Berechnungen ausgeschlossen.

2.3.5.3. Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden mit Hilfe des Computerprogrammes Gene Runner x64 (Version 6.0.25 Beta, Copyright © 1992-2018 Frank Buquicchio und Michael Spruyt) berechnet und von der Firma Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg) synthetisiert. Die Schmelztemperaturen (T_m) der Primer liegen bei ~60 °C.

Primer für die Amplifikation des *Stf3 5' h*-Gens von genomischer DNA wurden auf Grundlage der für *S. tuberosum* veröffentlichten genomischen Sequenzdaten des PGSC (Potato Genome Sequencing Consortium 2011; Hardigan *et al.* 2016; http://solanaceae.plantbiology.msu.edu/pgsc_download.shtml: *S. tuberosum* Group Phureja DM1-3 Assembly Version 3 DM, Version 4.04 Pseudomolecule Sequence) generiert.

Sämtliche Oligonukleotide, die für die vorliegende Arbeit verwendet wurden, sind im Folgenden tabellarisch gelistet. Dabei ist die Orientierung der Primer jeweils in deren Namen angegeben, wobei *F* bzw. *for* für *forward* (vorwärts) und *R* oder *rev* für *reverse* (gegenläufig) stehen. Spezifische Überhänge für die Gibson-Assemblierung (entsprechend Abschnitt 2.3.8.) sind in den Sequenzen der Primer zur Amplifikation des *Stf3 5' h*-Gens unterstrichen.

Anwendung	Primernamen	Primersequenz 5' → 3'	
Amplifikation des <i>Stf3</i> '5'-Gens	Stf35h_F	<u>TAAC</u> TTTAAGAAGGAGATATACTGGAAAAATGACTCTGGGTA	
	Stf35h_R	<u>GCTTTGTTAGCAGCCGC</u> ATTGTTTAAACGCGCTACT	
Sequenzierung des <i>Stf3</i> '5'-Gens	T7	TAATACGACTCACTATAGGG	
	T7 term	CTAGTTATTGCTCAGCGGT	
	Stf35h_Seq2for	GAATGACCTCAATCTTTCA	
	Stf35h_Seq2rev	TATATTCCACCATCACTATTC	
	Stf35h_Seq3for	TGAGTTAGTTTGACTTGACATA	
	Stf35h_Seq3rev	GGCCATTCTATTACACTAG	
	Stf35h_Seq4for	AATACTTGTTATCTTCATCGA	
	Stf35h_Seq4rev	GTTAGTCAAAGTTATTATCGT	
	Stf35h_Seq5for	CAACGTGACATTCACTTAC	
	Stf35h_Seq5rev	CGATTTTAGCATGTGACCTA	
	Stf35h_Seq6for	CTACCCTAACTCAAATATCA	
	Stf35h_Seq6rev	GCCTATAATGCCCAAGACA	
<i>Stf3</i> '5'-Sonde	Stf35h_Seq2for	GAATGACCTCAATCTTTCA	
	Stf35h_Sonde_R	TATGTCAAGTCAAACCTAACTCA	
qRT-PCR	St_f35h_qRT_F	AAAGCACTTTTGCTGAATTTGTT	
	St_f35h_qRT_R	ATTTTTGCCAATTACTTGGTCC	
	St_ef1_F	ATTGGAAACGGATATGCTCCA	*
	St_ef1_R	TCCTTACCTGAACGCCTGTCA	*
	St_L2_F	GGCGAAATGGGTCGTGTTAT	*
	St_L2_R	CATTTCTCTCGCCGAAATCG	*
	St_aprt_F	GAACCGGAGCAGGTGAAGAA	*
	St_aprt_R	GAAGCAATCCCAGCGATACG	*

* nach Nicot *et al.* 2005

2.3.6. Agarosegelelektrophorese

Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung von DNA erfolgte je nach Länge der Fragmente über Gele mit verschiedenen Agarosekonzentrationen. Zur Überprüfung der korrekten Größe von PCR-Produkten wurde in der Regel eine Konzentration von 1 % Agarose gewählt. Die Auftrennung hydrolysierter genomischer DNA erfolgte in Gelen mit 0,7 % Agarose. Für die Herstellung der Gele wurde die entsprechende Menge Agarose in 1x TBE-Puffer (0,1 M

Borsäure, 2 mM EDTA, 0,1 M Tris, pH 8,0) durch Aufkochen gelöst, auf etwa 50 °C abgekühlt und für die spätere Detektion der DNA mit 4 µl SERVA DNA Stain Clear G (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg) pro 100 ml Gel versetzt. Anschließend wurde das Gel in einen mit Taschenkamm bestückten Gelträger gegossen. Die DNA-Proben wurden mit dem für eine einfache Endkonzentration entsprechend benötigten Volumen 5x DNA-Ladepuffer (0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 0,1 M EDTA, 30 % Glycerin (w/v), 5x TBE-Puffer) vermischt und auf das ausgekühlte Gel aufgetragen. Als Molekulargewichtsstandard diente ein DNA-Marker (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) mit bekannten Fragmentgrößen, der parallel zu den Proben im Gel aufgetrennt wurde. In einer Elektrophoresekammer, befüllt mit 1x TBE als Laufpuffer, wurden die DNA-Fragmente bei einer Spannung von etwa 7 V/cm Gellänge entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Die DNA-Detektion und Dokumentation der Gele erfolgte mit Hilfe eines UV-Videodokumentationssystems.

Elektrophoretische Trennung von RNA im Formaldehyd-Gel

Zur Überprüfung der Integrität isolierter RNA (siehe Abschnitt 2.3.2.) für nachfolgende qRT-PCR-Analysen in Konformität zu den MIQE-Richtlinien (Bustin *et al.* 2009) wurde diese in einem 1%igen denaturierenden Agarose-Formaldehyd-Gel elektrophoretisch getrennt. Dafür wurde 1 g Agarose in 85 ml nukleasefreiem Wasser und 10 ml 10x MOPS-Puffer (0,4 M 3-(*N*-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS), 0,1 M Natriumacetat, 0,01 M EDTA) durch Aufkochen gelöst. Das Gel wurde auf etwa 50 °C abgekühlt, mit 4 µl SERVA DNA Stain Clear G (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg) sowie 5 ml Formaldehyd versetzt und in einen mit Taschenkamm bestückten Gelträger von 10 cm Länge gegossen. Die RNA-Proben sowie der verwendete RNA-Marker (RiboRuler™ High Range RNA Ladder, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) wurden mit 2 Vol RNA-Probenpuffer (1 ml Formamid, 0,35 ml Formaldehyd, 0,1 ml 10x MOPS-Puffer) und 0,5 Vol RNA-Ladepuffer (0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 0,1 M EDTA, 30 % Glycerin (w/v), 10x MOPS-Puffer) versetzt, 10 min bei 70 °C und dann 2 min auf Eis inkubiert und auf das ausgekühlte Gel aufgetragen. Als Laufpuffer diente 1x MOPS-Puffer. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 60 V für etwa 2 h.

2.3.7. Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Agaroseblöckchen, welche die gewünschten DNA-Banden enthielten, wurden unter UV-Licht mit einem sterilen Skalpell aus den präparativen Gelen ausgeschnitten und jeweils in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß eingewogen. Die DNA-Extraktion aus diesen Gelblöckchen erfolgte unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) entsprechend dem Protokoll des Herstellers.

2.3.8. Sequenzierung einzelner *Stf3'5'h*-Allele

Für die Realisierung der Sequenzierung einzelner Allele wurde zunächst ein 5,2 kb großer Bereich des *Stf3'5'h*-Locus von genomischer DNA fünf exemplarisch gewählter Kartoffelakzessionen amplifiziert (Abschnitt 2.3.5.1.). Die dafür verwendeten Oligonukleotide (Abschnitt 2.3.5.3.) wurden am 5'-Ende um einen Sequenzabschnitt verlängert, der mit dem Zielplasmid (pET16b, Invitrogen, Waltham MA, USA) überlappt. Nach der Amplifikation erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte im präparativen Agarosegel (siehe Abschnitt 2.3.6.) und deren Extraktion aus dem Gel (Abschnitt 2.3.7.). Die so isolierten und gereinigten Amplicons wurden anschließend mit Hilfe des Gibson Assembly® Master Mix (New England Biolabs, Frankfurt) in den Zielvektor kloniert. Zur Vervielfältigung des *Stf3'5'h*-tragenden Klonierungsvektors wurde dieser in *E. coli* (One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli*, Invitrogen, Waltham MA, USA) transformiert. Transformation und Selektion der Zellen erfolgten nach Herstellerangaben unter Verwendung von Selektionsmedium mit 50 µg/ml Kanamycin. Für jede der zu untersuchenden Kartoffellinien wurden zwölf *E. coli-Stf3'5'h*-Transformanten ausgewählt und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm in jeweils 3 ml flüssigem LB-Selektionsmedium (10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Hefeextrakt, 5 g NaCl, ad 1 l H₂O – autoklavieren, abkühlen auf etwa 50 °C – 50 µg/ml Kanamycin) kultiviert. Die Isolierung von Plasmid-DNA aus den Übernachtskulturen erfolgte unter Verwendung des QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) und der darin enthaltenen Pufferlösungen.

Die Sequenzierung des ~5,2 kb *Stf3'5'h*-Lokus in den isolierten Plasmiden erfolgte nach der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.* 1977) unter Nutzung eines Sequenzierservice (Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg). Es wurde eine schrittweise Sequenzierung durchgeführt, wobei im ersten Schritt die zum pET16b-Vektor komplementären Primer T7 und T7term

verwendet wurden (siehe Auflistung unter Abschnitt 2.3.5.3.). Die Generierung der weiteren Sequenzierprimer basierte dann jeweils auf den Daten der vorangegangenen Sequenzierreaktionen. Durch Sequenzierung von den Randbereichen (5'- bzw. 3'-Ende) bis ins Fragmentinnere wurde Schritt für Schritt die gesamte ~5,2kb-Region mit Sequenzdaten abgedeckt.

Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit Hilfe der DNASTAR® Lasergene Software SeqMan Pro™ (Version 11.2.1 (29), 419, DNASTAR Inc., Madison WI, USA) durch Inspektion der Chromatogramme und Sequenzalignments zur Erstellung von Contigs. Für die *in silico*-Analyse möglicher regulatorischer Promotorelemente wurden die Vorhersageprogramme der Pflanzenpromotordatenbanken PlantCARE und PlantPAN genutzt (Lescot *et al.* 2002; Chang *et al.* 2008).

2.3.9. Southern Blot

Jeweils 10 µg genomische DNA wurden mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Nde*I (Thermo Fisher Scientific, Dreieich) nach Herstellerangaben zum Doppelverdau etwa 12 h hydrolysiert und dann im Agarosegel aufgetrennt (Abschnitt 2.3.6.). Das Gel wurde anschließend 10 min in Depurinierungslösung (0,2 M HCl) geschwenkt und die DNA dann im Kapillarblotverfahren mit alkalischem Transferpuffer (0,4 M NaOH, 1 M NaCl) mindestens 16 h auf eine Nylonmembran (Hybond™-N+, GE Healthcare, Little Chalfont, UK) transferiert. Nach dem Abbau des Blots wurde die Membran neutralisiert (0,5 M Tris-HCl pH 7,2, 1,5 M NaCl) und 16 h bei 63 °C im Hybridisierungssofen nach Herstellervorgaben (DIG Wash and Block Buffer Set, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) hybridisiert. Die Detektion der Chemilumineszenzsignale erfolgte mittels Röntgenfilm.

Als Sonde für die Hybridisierung wurde ein mit Digoxigenin markiertes PCR-Produkt verwendet, das mit Hilfe des PCR DIG Labeling Mixes (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) nach Herstellerangaben erzeugt wurde. Als Template für die PCR diente ein zuvor aus *E. coli*-Transformanden isoliertes Plasmid (Abschnitt 2.3.8.) mit der darin integrierten Sequenz des *Stf3* 5'-Allels 1 (konservierte Sequenz). Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Abschnitt 2.3.5.3. angegeben. Das entsprechende Amplikon (528 bp) liegt in einem für den *Stf3* 5'-Locus spezifischen Abschnitt des 5'-Bereiches. Der Erfolg der DIG-dUTP-Markierung wurde mittels Agarosegelelektrophorese (Abschnitt 2.3.6.)

überprüft, wobei ein unmarkiertes PCR-Produkt mit unverändertem Laufverhalten als Kontrolle diente. Zur spezifischen Isolierung der Sonde wurde ein präparatives Agarosegel eingesetzt, aus dem die Sonde gemäß Abschnitt 2.3.7. extrahiert wurde.

2.4. Methoden zur Proteinanalyse

2.4.1. Proteinextraktion

Extraktion von Gesamtprotein

Für die Extraktion von Gesamtprotein aus Kartoffelknollengewebe (Fleisch und Schale) wurden Poolproben (entsprechend Abschnitt 2.1.3.) aus lyophilisiertem Gewebe von mindestens zwölf Knollen eines intermediären Entwicklungsstadiums (*Stadium 2*, siehe Abb. 5) verwendet. Es wurden jeweils 20 mg Probenmaterial mit 300 µl Extraktionslösung (56 mM Na₂CO₃, 56 mM Dithioerythrit (DTE), 0,1 % (v/v) SDS, 12% (w/v) Saccharose) versetzt, durch Vortexen 30 s gemischt und 20 min bei 80 °C und 350 rpm im Thermoblock inkubiert. Zelltrümmer wurden durch zehnmündige Zentrifugation bei 17500 rpm sedimentiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

Extraktion der mikrosomalen Proteinfraction

Zur Anreicherung des ER-gebundenen StF3'5'H-Proteins aus Kartoffelknollengewebe erfolgte die Isolierung der mikrosomalen Proteinfractionen. Hierfür wurden ganze Scheiben (Knollenfleisch mit Schale) aus der Mitte frischer Knollen des intermediären Entwicklungsstadiums (*Stadium 2*, siehe Abb. 5) von drei Knollen pro Kartoffelakzession in etwa gleichen Anteilen verwendet. Es wurden jeweils 2 g des Probenmaterials zusammen mit 4 ml eiskaltem Extraktionspuffer (50 mM MOPS, 5 mM EDTA, 330 mM Saccharose, 10 % (v/v) Glycerol; frisch vor Gebrauch zugeben: 5 mM Dithiothreitol (DTT), 5 mM Ascorbat, 0,6 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon (PVPP), cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) eine Tablette pro 10 ml Puffer) in ein 50ml-Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend erfolgte die Homogenisierung des Materials mit Hilfe eines Stabmixers (IKA ULTRA-TURRAX T25, Janke und Kunkel Labortechnik, Staufen). Das Homogenat wurde auf 2ml-Reaktionsgefäße verteilt und 15 min bei 10.000 x g

zentrifugiert. Durch Ultrazentrifugation der resultierenden Überstände für 55 min bei 10.000 x g und 4 °C wurden im nächsten Schritt die Mikrosomen pelletiert und schließlich in 100 µl Extraktionspuffer ohne PVPP-Zusatz aufgenommen.

2.4.2. Proteinquantifizierung

Die akkurate Bestimmung der Proteinkonzentration gemäß Abschnitt 2.4.1. hergestellter Extrakte erfolgte mittels Plus One 2-D Quant Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Der Assay beruht auf der spezifischen Bindung von Kupferionen an Proteine. Zuvor präzipitierte Proteine werden in einer Kupfer enthaltenden Lösung resuspendiert und ungebundenes Kupfer wird mit Hilfe eines kolorimetrischen Agens photometrisch bei 480 nm gemessen. Die Absorption der Lösung ist umgekehrt proportional zu deren Proteinkonzentration, die unter Bezugnahme auf eine mitgelieferte BSA-Eichlösung (Bovines Serumalbumin) bestimmt wurde.

2.4.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur größengeordneten Separierung von Proteinen entsprechend deren Molekülmasse wurde eine 1-D PAGE durchgeführt. Die Trennung erfolgte unter denaturierenden Bedingungen nach der von Laemmli entwickelten Methode (Laemmli 1970). Dazu wurden zunächst die Proteinextrakte mit 2 Vol Probenpuffer (56 mM Na₂CO₃, 56 mM DTE, 2 % (v/v) SDS, 12 % (w/v) Saccharose, 2 mM EDTA, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt und 10 min bei 95 °C inkubiert. Es wurden jeweils 15 µg der denaturierten Proteine in einem Gesamtvolumen von 20 µl auf das Gel aufgetragen. Verwendet wurden 10 %ige Polyacrylamid-Gele (9 x 6 cm, Gelstärke 1 mm), die sich wie folgt zusammensetzten:

	Sammelgel	Trenngel
Acrylamid/Bisacrylamid (30 % / 0,8 % (w/v))	1,30 ml	3,30 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8		2,50 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	2,50 ml	
10 % SDS	0,10 ml	0,10 ml
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	50 µl	50 µl
10 % Ammoniumpersulfat	10 µl	5 µl
H ₂ O	6,10 ml	4,05 ml

Als Molekülmassenstandard diente ein Proteinmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific, Dreieich) mit Proteinen bekannter Molekülmasse, welcher parallel zu den Proben im Gel aufgetrennt wurde. Für eine spätere Western Blot-Anwendung des SDS-Gels wurde zusätzlich ein weiterer Proteinstandard (MagicMark™ XP Western Protein Standard, Thermo Fisher Scientific, Dreieich) verwendet. Der zur Elektrophorese verwendete Puffer bestand aus 200 mM Glycin, 0,1 % (v/v) SDS und 25 mM Tris-HCl, pH 8,3. Die Proteinseparation erfolgte bei einer konstanten Spannung von 140 V, für 1,5 h.

2.4.4. Anfärbung von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen

Die Sichtbarmachung der im Gel aufgetrennten Proteine nach der SDS-PAGE erfolgte unter Verwendung einer Coomassie-Färbelösung (0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 40 % (v/v) MeOH, 10 % (v/v) Essigsäure). Das Gel wurde etwa 1h in der Färbelösung inkubiert, um ein deutliches Muster der Proteinbanden zu erhalten, und anschließend mehrfach mit Wasser gespült, um Hintergrundfärbungen zu entfernen.

2.4.5. Nachweis von Proteinen durch Western Blot-Hybridisierung

Gewinnung von Antiseren aus Kaninchen

Für den immunologischen Nachweis des StF3'5'H-Proteins in Kartoffelgeweben erfolgte zunächst die Herstellung polyklonaler Antiseren, die sich gegen ein StF3'5'H- spezifisches Peptid richten. Das Peptiddesign wurde eigenständig durchgeführt und die anwendungsbezogene Funktionalität durch die Firma LifeTein (Hillsborough NJ, USA) bestätigt, die als Dienstleister die Peptidsynthese und die C-terminale KLH (*keyhole limpet hemocyanin*, fungiert als Trägerprotein für niedermolekulare Peptide) -Konjugation tätigte. Das von LifeTein gelieferte Protein wurde für die Immunisierung von zwei Kaninchen verwendet. Die Immunisierung sowie die Herstellung der Antiseren (Rohseren) erfolgte als Dienstleistung der Arbeitsgruppe Phytoantikörper des IPK Gatersleben. In einem Zeitraum von 90 Tagen erfolgten dabei insgesamt fünf Immunisierungsschritte. Für die erste Immunisierung wurden den Kaninchen je 250 µg Protein, gelöst in 500 µl Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (*phosphate buffered saline*, 1x PBS: 137 mM NaCl, 1,8 mM KH₂PO₄, 10,5 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O, 2,7 mM KCl, pH 7,4) injiziert. Jede weitere Immunisierung erfolgte mit 100 µg Protein in 500 µl 1x PBS. Für jeden

Immunisierungsschritt erfolgte die Entnahme von Plasmaseren. Die so erhaltenen polyklonalen Antikörper-Rohseren wurden mittels Western Blot-Analyse getestet.

Proteintransfer auf Nylonmembranen

Im Anschluss an die PAGE (Abschnitt 2.4.3.) wurde das SDS-Polyacrylamid-Gel 2 min in 25 mM Tris mit 20 % (v/v) MeOH equilibriert. Der Proteintransfer erfolgte im *semi-dry* Blotverfahren bei 0,8 mA/cm² Gel, für 1,5 h. Dafür wurden zunächst Filterpapiere (Whatman 3 mm) und die Nylonmembran (Immobilon-P, PVDF, 0,45 µm, Millipore, Darmstadt) auf die entsprechende Gelgröße zugeschnitten, im jeweiligen Transferpuffer equilibriert und wie folgt geschichtet:

	Getaucht in
Anode: 6 Lagen Whatman-Papier	0,3 M Tris, 20 % (v/v) MeOH
3 Lagen Whatman-Papier	25 mM Tris, 20 % (v/v) MeOH
PVDF-Membran	MeOH für 2 min; Wasser; 25 mM Tris, 20 % (v/v) MeOH
SDS-Polyacrylamid-Gel	25 mM Tris, 20 % (v/v) MeOH, für 2 min
Kathode: 9 Lagen Whatman-Papier	40 mM 6-Aminohexansäure, 20 % (v/v) MeOH, 0,01 % (w/v) SDS

Hybridisierung und Detektion

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran 3 x 5 min durch Schwenken in TBST-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween 20) gewaschen. Um die noch freien Proteinbindungsstellen abzusättigen, wurde die Membran 30 min in Blockierlösung (5 % Milchpulver in TBST, filtriert) geschwenkt und anschließend nochmals 2 x 5 min in TBST gewaschen. Der zur Immunodetektion eingesetzte primäre StF3'5'H-Antikörper (siehe Abschnitt 2.4.5., *Gewinnung von Antiseren aus Kaninchen*) wurde 1:200 in TBST mit 0,5 % BSA (filtriert) verdünnt und etwa 3 h an die Proteine auf der Membran gebunden. Anschließend wurde die Membran 3 x 5 min schüttelnd in TBST gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper von der Membran zu entfernen. Der sekundäre Antikörper (Anti Rabbit, IRDye® Secondary Antibody, LI-COR Biosciences, Lincoln NE, USA) wurde 1:15.000 in TBST mit 0,5 % BSA (filtriert) verdünnt und 45 min an den ersten Antikörper gebunden. Die Membran wurde abschließend 2 x 5 min in TBST, dann 1 x 5 min in PBS gewaschen und dann getrocknet. Die gebundenen Antikörper wurden mit Hilfe des Odyssey® CLx 3.0 Near-Infrared Fluorescence Imaging-Systems (LI-COR Biosciences,

Lincoln NE, USA) bei einer Wellenlänge von 800 nm detektiert und dokumentiert. Alle Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.4.6. LC-MS Proteinanalyse

Probenvorbereitung mikrosomaler Fraktionen

Proteine in mikrosomalen Fraktionen (siehe Abschnitt 2.4.1.) wurden zunächst mittels Methanol-Chloroform-Fällung (Wessel und Flüge 1984) präzipitiert. Dafür wurden 15 µg Protein (< 100 µl) mit 400 µl eiskaltem MeOH versetzt und durch Vortexen gut gemischt. Dann wurden 200 µl eiskaltes Chloroform zugegeben, gevortext und nach Zugabe von 300 µl kaltem H₂O erneut gründlich gemischt. Die Proben wurden 5 min auf Eis inkubiert und anschließend 2 min bei 9000 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach der so erzielten Phasentrennung wurde die obere, wässrige Phase vorsichtig entfernt. Zu der verbliebenen unteren Chloroformphase und der Interphase mit dem präzipitierten Protein wurden nochmals 300 µl MeOH gegeben. Die Proben wurden gemixt, 5 min auf Eis inkubiert und dann zum Pelletieren der Proteine 5 min bei 18000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Proteinpellet wurde in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Anschließend wurde ein In-Filter-Verdau durchgeführt (Manza *et al.* 2005; Wiśniewski *et al.* 2009; Jozefowicz *et al.* 2018), wobei alle Zentrifugationsschritte mit 14.000 x g bei Raumtemperatur erfolgten. Die Proteinpellets wurden zunächst in jeweils 100 µl Denaturierungspuffer (7 M Harnstoff, 5 mM EDTA, 0,1 M Tris-HCl, pH 8) resuspendiert und auf einen zuvor mit H₂O benetzten Filter (Microcon® - 10 Zentrifugenfilter mit Ultracel® Membran PL - 10, Merck, Darmstadt) pipettiert. Zur Bindung der Proteine an die Filtermembran wurden die Proben 30 min zentrifugiert. Danach folgten zwei Waschschrte mit jeweils 100 µl Denaturierungspuffer und 30-minütiger Zentrifugation. Im Anschluss wurden 100 µl Reduktionslösung (20 mM DTT in Denaturierungspuffer) auf den Filter gegeben und die Proteine für 1 h bei 60 °C reduziert. Nach Zugabe von 33 µl Alkylierungslösung (80 mM Iodacetamid in Denaturierungspuffer) folgte eine Inkubation für 30 min bei 37 °C im Dunkeln zur Alkylierung der Proteine und dann eine Zentrifugation für 30 min. Der Filter und die auf der Membran befindlichen Proteine wurden danach 3 x mit 200 µl und 2 x mit 100 µl 50 mM Ammoniumbicarbonat gewaschen und dafür jeweils 15 min zentrifugiert. Im Anschluss erfolgte ein tryptischer Verdau der Proteine durch Zugabe von 200 µl 50 mM Ammoniumbicarbonat mit 1 ng/µl Trypsin (Trypsin-Porcine, Promega GmbH, Mannheim) bei 37 °C über Nacht. Die so

erzeugten Peptide wurden nachfolgend durch eine zehnmütige Zentrifugation vom Filter entfernt und in einem frischen Reaktionsgefäß aufgefangen. Der Filter wurde dann 3 x mit jeweils 50 µl 50 mM Ammoniumbicarbonat und Zentrifugation für je 10 min gespült und die Durchflüsse mit dem ersten vereinigt.

Probenvorbereitung von SDS-Proteingelbanden

Die Vorbereitung ausgeschnittener Proteingelbanden nach SDS-PAGE für die weiterführende LC-MS-Analyse erfolgte mittels In-Gel-Verdau der Proteine. Dafür wurden die Gelstücke (~ 1 x 1 x 5 mm) zunächst durch Waschen in 1 ml 10 mM Ammoniumbicarbonat mit 50 % Acetonitril für 30 min entfärbt. Die Gelstücke wurden dann in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Anschließend erfolgte der proteolytische Verdau durch Zugabe von 20 µl Trypsinlösung (5 mM Ammoniumbicarbonat, 5 % (v/v) Acetonitril, 0,5 ng/µl Trypsin-Porcine, Promega GmbH, Mannheim) und Inkubation bei 37 °C für 5 h. Die Trypsinaktivität wurde durch Ansäuerung mit 3 µl 1% (v/v) Trifluoressigsäure abschließend inhibiert.

Proteinanalyse mittels nanoLC-ESI-QTOF-MS

Die LC-MS-basierte Proteinanalyse erfolgte unter Verwendung eines nanoLC Dionex™ UltiMate™ 3000 RSLCnano (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham MA, USA) Flüssigchromatographiegerätes, gekoppelt an ein Impact II *quadrupole time of flight* Massenspektrometer (QTOF-MS, Bruker Daltonics, Bremen). Jeweils 10 µl der vorbereiteten Proteinproben wurden über eine Nano Trap Vorsäule (Acclaim PepMap100 C18, 5 µm, 100 Å, Thermo Fisher Scientific, Dreieich) zur Aufkonzentrierung und Entsalzung und eine analytische Säule (Acclaim PepMap RSLC C18, 50 cm x 75 µm, Thermo Fisher Scientific, Dreieich) getrennt. Dabei wurden für jede Probe zwei technische Wiederholungen durchgeführt. Die Trennung erfolgte anhand eines linearen Gradienten von 2-40 % Laufmittel (LM) B für 30 min (Proteine aus SDS-Gelbanden) bzw. 120 min (Proteine in mikrosomalen Preparaten) bei einer Flussrate von 300 µl/min.

LM A: 18,2 mM Wasser (Chemsolute, Renningen) / 0,1 % (v/v) Ameisensäure

LM B: Acetonitril (Chemsolute, Renningen) / 0,1 % (v/v) Ameisensäure

Das LC-System wurde über eine CaptiveSpray® Ionenquelle mit nanoBooster® (Bruker Daltonics, Bremen) mit dem Impact II verbunden. ESI erfolgte in positivem Ionenmodus bei 150 °C, 1300 V CV, 0,2 bar nanoBooster und einem Gasfluss von 0,3 l/min. Für die MS- und MS/MS-Akquirierung wurde die in der Bruker Compass Software (Version 1.9) vorgegebene

Instant Expertise-Methode verwendet. Dabei wurde ein Massenbereich von m/z 150-2200 aufgenommen und die Gesamtzyklusdauer auf 3,0 s festgelegt. Die weiteren Instrumenteneinstellungen des Massenspektrometers wurden wie folgt gewählt: Hexapol-RF-Spannung von 350 V Vpp, Trichter1-RF von 400 Vpp, Trichter2-RF von 600 Vpp, *prepulse storage time* von 10 μ s, Transferzeit von 90 μ s, Kollisionszell-RF von 2000 Vpp. MS-Spektren wurden mit einer Wiederholungsfrequenz (Akquirierungsgeschwindigkeit) von 2 Hz und einer CE von 7 eV akquiriert. Die Akquirierungsgeschwindigkeit für MS/MS-Spektren richtete sich nach den Signalintensitäten der Vorläufermoleküle und wurde für geringere Intensitäten (2500 *ion counts (cts)*) auf 4 Hz und für höhere (25.000 cts) auf 16 Hz festgesetzt, mit einer linearen Anpassung für Präkursor mit intermediären Intensitäten. Die CE wurde auf 23-65 eV eingestellt.

Analyse der LC/MS-Datensätze und Proteinannotation

Die aufgenommenen Spektren wurden mit Hilfe der Progenesis QI Software für Proteomics (Version 3.0, Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, U.K.) entsprechend der Herstellerempfehlung für markierungsfreie Quantifizierung analysiert. Dies ermöglichte sowohl m/z -Korrektur, -Abgleich und -Normalisierung, als auch *peak picking* (zur Reduktion der Datenpunkte im Massenspektrum), Quantifizierung und statistische Auswertung. Die Quantifizierung von Peptiden basiert bei Progenesis QI auf der Ionenhäufigkeit. Hierzu wurde die Ionenintensität der MS-Daten (integrierte Peakflächen) verwendet. MS/MS-Spektren wurden von Progenesis QI als Mascot-Datei exportiert und für die Peptididentifizierung mittels Mascot Suchmaschinensoftware (Version 2.5.1) herangezogen (Perkins *et al.* 1999). Dabei wurde die auf den Sequenzen von *S. tuberosum* Gruppe Phureja DM1-3 (PGSC_DM_v3.4_pep_representative, 39.031 Proteineinträge) basierende Datenbank Spud DB genutzt (Potato Genome Sequencing Consortium 2011; Hirsch *et al.* 2014), deren Annotationen mittels Blast2GO Software (Version 4.1.9.) (Conesa *et al.* 2005; Götz *et al.* 2008) mit verfügbaren NCBI-Einträgen abgeglichen und mit Sequenzen von humanem Keratin und Trypsin als häufige Kontaminanten zusammengefügt wurden.

Die zur Peptidannotation verwendeten Parameter wurden wie folgt justiert: Massentoleranzen von 15 ppm für Vorläufer und 0,05 Da für Produktionen, Akzeptanz einer ausgelassenen Spaltstelle (*missed cleavage*), Carbamidomethylierung als definierte Modifikation und Methioninoxidation als variable Modifikation. Eine Mascot-integrierte Peptiddatenbanksuche

wurde durchgeführt und die Suchergebnisse wurden mit dem Percolator *machine-learning* Algorithmus (Käll *et al.* 2007; Brosch *et al.* 2009) prozessiert. Die Falscherkennungsrate lag bei $< 1\%$ und der Signifikanz-Schwellenwert bei $P < 0,05$. Peptide mit einem Mascot *ion score* (Treffer für identifizierte Molekülonen) von < 13 wurden in den Analysen nicht berücksichtigt. Die resultierenden Annotationen wurden in Progenesis QI reimportiert. Für die Proteinquantifizierung wurden alle spezifischen Peptide eines identifizierten Proteins einbezogen. Dabei wurde eine Anzahl von mindestens zwei dieser Peptide zusammen mit ANOVA (*analysis of variance*) -Werten von $P < 0,05$ und gegebenenfalls einer mindestens 1,5-fachen Abundanz (für die Identifizierung unterschiedlich regulierter Proteine entsprechend Abschnitt 3.2.5.) als signifikant betrachtet.

Die funktionelle Annotation mittels LC-MS detektierter Proteine erfolgte automatisiert anhand der bioinformatischen Software Blast2GO (Version 4.1.9). Dabei wurden unter Verwendung des BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) -Algorithmus (Altschul *et al.* 1990) ähnliche Sequenzen identifiziert, um vorhandene funktionelle Annotationen bereits charakterisierter Sequenzen auf die Sequenzen des eigenen Datensatzes zu übertragen (Conesa *et al.* 2005; Götz *et al.* 2008).

2.4.7. *In silico*-Analyse von Proteinen

Die Übersetzung von Nukleinsäuresequenzen in Proteinsequenzen erfolgte mittels des Editierungsprogramms EditSeq™ (Version: 11.2.1 (29), 419, Lasergene 11 Core Suite, DNASTAR Inc., Madison WI, USA). Die Proteinstatistikfunktion dieses Programms wurde zur Berechnung des Molekulargewichts von Proteinen mit bekannter Sequenz genutzt. Vergleichende Analysen von Proteinsequenzen wurden unter Verwendung der DNASTAR® Alignment-Software MegAlign Pro™ durchgeführt. Mit Hilfe des Proteinstruktur-Homologie-Modelling Webservers SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org>; Waterhouse *et al.* 2018) wurden hypothetische 3D-Proteinstrukturmodelle der StF3'5'H aus den durch EditSeq™ erhaltenen Proteinsequenzen generiert. Der TMHMM Server (Version 2.0, <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), ein *online* verfügbares Vorhersageprogramm transmembraner Helices in Proteinen, wurde zur Identifizierung membranassoziierter Bereiche der StF3'5'H verwendet. BLAST-Analysen erfolgten über die entsprechenden Webtools von NCBI und Spud DB.

3. Ergebnisse

3.1. Untersuchung der phytochemischen Diversität anthocyanhaltiger Kartoffelsorten

Die hier unter 3.1. aufgeführten Daten wurden bereits in einer wissenschaftlichen Fachzeitschrift veröffentlicht (Oertel *et al.* 2017, doi: 10.1007/s00425-017-2718-4). Der Eigenanteil an der Studie ist dort angegeben.

Zur Ermittlung von Kartoffelsorten mit großem Unterschied im Anthocyanpektrum wurde ein sequenzielles Screening von Knollengewebe eines großen Sortiments farbiger Kultivare durchgeführt. Der Arbeitsablauf für diese Metabolitprofilanalyse ist in Abbildung 6 dargestellt.

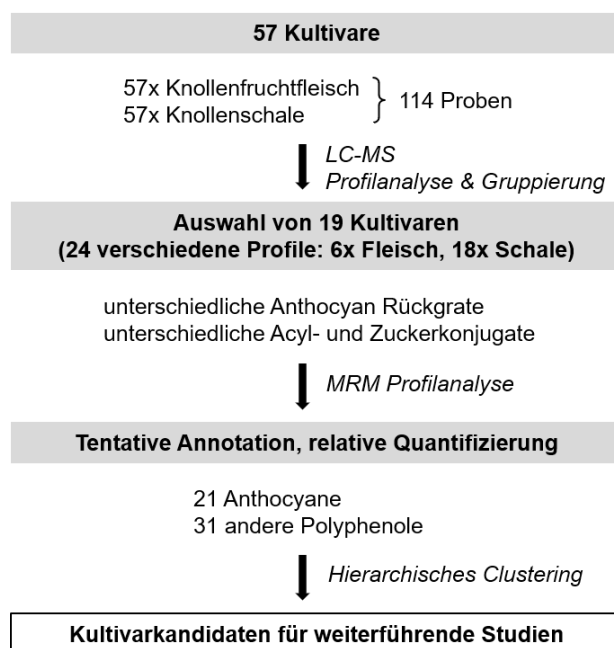


Abb. 6: Schematischer Überblick der Arbeitsabläufe für das Metabolit-Screening farbiger Kartoffelgenotypen.

Zunächst wurden 57 Kartoffelsorten, die sich in der Färbung ihrer Knollen unterscheiden, anhand einer initialen LC-UV/MS-Analyse hinsichtlich deren Polyphenolprofil bewertet. Dabei wurden Knollenfleisch und Knollenschale getrennt untersucht (Appendix Tab. A1).

Die ausgeprägtesten Unterschiede zeigten sich in der Komposition und Konzentration von Anthocyanmolekülen, deren Untersuchung im Fokus der weiterführenden Arbeiten lag. Solche Unterschiede konnten sowohl zwischen den verschiedenen Geweben Fruchtfleisch und Schale, als auch zwischen den verschiedenen Kartoffelsorten festgestellt werden. Ein Beispiel dafür wird in Abbildung 7 für die Linien „Violettfleischige x Blue Marker – B“ (#2) und „Rote Emmalie“ (#49) gezeigt, welche sich in Profil und Gehalt der bei 515 nm absorbierenden Anthocyane deutlich unterscheiden.

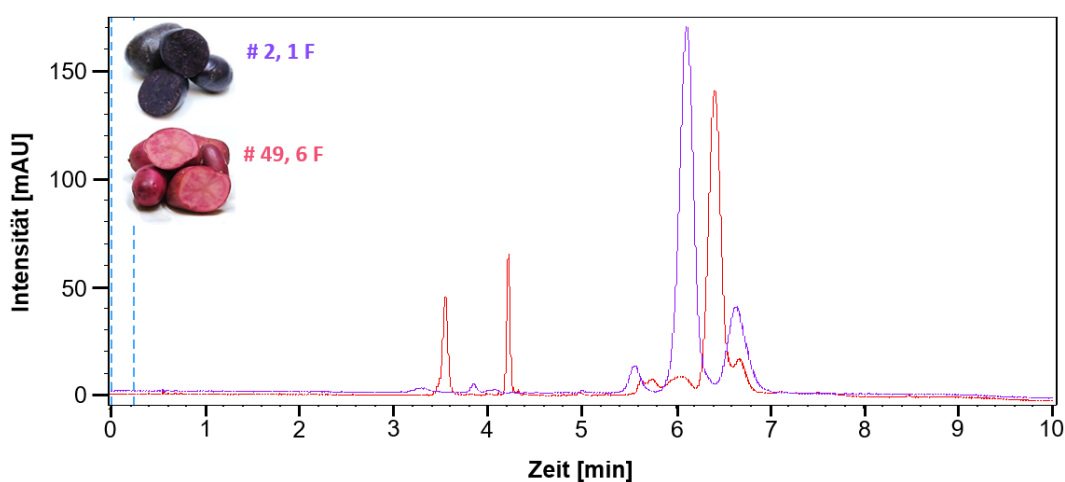


Abb. 7: Überlagernde Darstellung kontrastierender Anthocyanprofile zweier verschiedenfarbiger Kartoffelgenotypen, analysiert mittels LC-UV/MS. Chromatogramme bei 515 nm; *violettes* Fleisch (Gruppe 1 F) der Linie „Violettfleischige x Blue Marker – B“ (# 2), *rotes* Fleisch (Gruppe 6 F) der Linie „Rote Emmalie“ (# 49). Die Bezeichnungen der Anthocyanprofilgruppen (1 F und 6 F) beziehen sich auf die Angaben in Tabelle 1.

Der LC/MS-Datensatz ermöglichte eine Gruppierung der Kartoffelproben nach unterschiedlichen Anthocyanprofilen. Ausgewählte repräsentative Proben wurden anschließend für eine LC-MS/MRM-basierte Validierung dieser Anthocyanprofile und die relative Quantifizierung der einzelnen Anthocyane eingesetzt (Abb. 6). Somit konnte eine Spezifizierung der initialen Gruppierung erzielt und die Auswahl von Kandidaten für weiterführende molekularbiologische Untersuchungen der Anthocyanbiosyntheseregulation getroffen werden.

Integrierte Peakflächen mittels LC-UV/MS und LC-MS/MRM in den farbigen Kartoffeln gemessener Anthocyane und anderer Polyphenole sind mittels *DOI resolving service* unter der DOI 10.5447/IPK/2019/16 öffentlich zugänglich.

3.1.1. Nachweis gewebe- und kultivarspezifischer Polyphenolmuster mittels LC-UV/MS

Um die wesentlichen Unterscheidungskriterien der Polyphenolzusammensetzung aller Proben zu verdeutlichen, wurde der Datensatz der initialen LC-MS-Profilanalyse anhand einer Hauptkomponentenanalyse (PCA, *principal component analysis*) visualisiert. Die Hauptkomponenten von Fruchtfleisch und Knollenschale der 57 Kartoffelvarietäten in einer zweidimensionalen Projektion der Daten zu analysieren, gewährte einen Überblick über die Muster innerhalb des Datensatzes (Abb. 8). Somit konnte festgestellt werden, ob diese Muster mit Gewebefarbe, Gewebetyp oder Varietät assoziiert sind. Die PCA wurde anhand der komplexen Datenmatrix aller gemessenen Polyphenole durchgeführt und beinhaltet alle Merkmale dieser Substanzen (Intensitäten der Retentionszeit (RT)/Masse-Paare), die signifikant über alle Proben detektiert wurden.

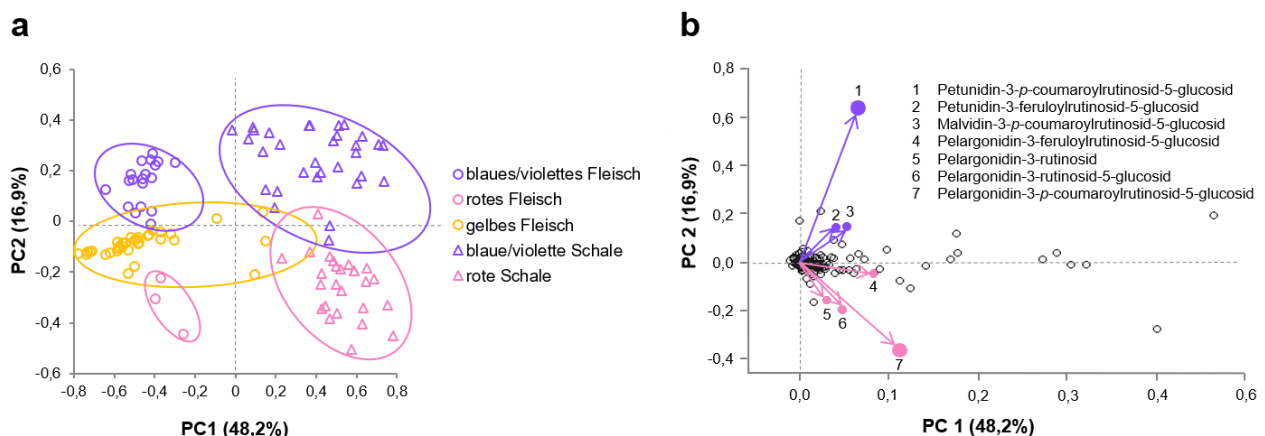


Abb. 8: Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse von 114 Proben, gewonnen aus Knollenfruchtfleisch und -schale von 57 Kartoffelsorten, dargestellt als *Scores* (a) und *Loadings* (b) *Plots*. Projektion und zugehörige Variablen sind für PC1 und PC2 angegeben. Im *Loadings Plot* sind die Anthocyane, die für PC2 hauptsächlich zur Varianz zwischen *rotem* und *blauem/violetterm* Gewebe beitragen, in der entsprechenden Farbe hervorgehoben.

Abbildung 8a zeigt den sogenannten *Scores Plot* der ersten beiden Hauptkomponenten, PC1 und PC2, womit die Visualisierung der Gruppierung in Gewebetyp und -farbe ermöglicht wird. Dabei gruppiert PC1 die Fruchtfleisch- und die Schalenproben mit einer erklärten Varianz von 48,2 %. Die unterschiedlich farbigen Proben werden hingegen durch PC2 mit einer erklärten Varianz von 16,9 % getrennt, wobei drei Gruppen unterschieden werden konnten, und zwar die roten, gelben und die blau-violetten Proben. Auf diese Weise entstand

ein Clustering der Proben in fünf Hauptgruppen: (1) blaues/violettes Knollenfleisch, (2) blaue/violette Schale, (3) rotes Fleisch, (4) rote Schale und (5) gelbes Fleisch. Die mit den Hauptkomponenten assoziierten Variablen sind im *Loadings Plot* in Abbildung 8b dargestellt.

Einige der auffälligsten PC2-repräsentierenden Metabolite konnten durch Datenbankabgleiche anhand ihrer RT/Masse-Paare tentativ als Anthocyane annotiert werden. Während die Variablen für PC2 demnach hauptsächlich durch Anthocyanpigmente vertreten werden, sind die Variablen für PC1 auf andere phenolische Komponenten zurückzuführen. Die Anthocyane, die hauptsächlich zur Trennung der verschiedenfarbigen Proben auf der PC2-Achse beitragen, sind in der entsprechenden Farbe hervorgehoben. Die für die blaue bis violette Färbung von Kartoffelknollengewebe verantwortlichen Anthocyane sind v. a. Petunidin-3-*p*-coumaroylrutinosid-5-glucosid, Petunidin-3-feruloylrutinosid-5-glucosid und Malvidin-3-*p*-coumaroylrutinosid-5-glucosid. Verantwortlich für die rote Färbung sind hingegen hauptsächlich Pelargonidin-3-feruloylrutinosid-5-glucosid, Pelargonidin-3-rutinosid, Pelargonidin-3-rutinosid-5-glucosid und Pelargonidin-3-*p*-coumaroylrutinosid-5-glucosid (für zugehörige RT/Masse-Paare siehe Appendix Abb. A2 g).

3.1.2. Auswahl von Genotypen mit den größten Unterschieden im Anthocyanprofil zur quantitativen LC-MS/MRM Profilanalyse

Zur weiteren phytochemischen Charakterisierung der farbigen Kartoffelsorten wurde der Focus auf die abundantesten Unterschiede in den Anthocyanprofilen gelegt. Zunächst erfolgte eine Vorgruppierung der 114 LC-UV/MS analysierten Proben (Knollenfleisch und -schale von 57 pigmentierten Kartoffelsorten, siehe auch Abb. 6) basierend auf der Absorption bei 515 nm, dem anthocyan-spezifischen Absorptionsmaximum. LC-Chromatogramme bei 515 nm wurden in Form von Overlays miteinander verglichen und Proben mit gleichen Profilen zusammengefasst. Für Vertreter mit der höchsten Peakintensität eines bestimmten Anthocyanprofils wurden Massenspektren über den RT-Bereich der entsprechenden Peaks gezogen. Diese offenbarten putativ den Anthocyanen zugehörige RT/Masse-Paare, anhand derer automatisiert Ionenchromatogramme für alle Proben extrahiert und die Peakflächen integriert werden konnten (entsprechend Abschnitt 2.2.2., *Analyse und Visualisierung von*

LC-UV/MS-basierten Metabolitdaten). Dies ermöglichte die Detektion der RT/Masse-Paare simultan in allen Proben.

Die somit innerhalb sämtlicher Proben detektierten RT/Masse-Paare wurden mit verfügbaren Datenbankeinträgen und Literaturangaben verglichen, was zur tentativen Annotation von 23 Anthocyanen führte (Appendix Abb. A2 g). Unter den Kriterien der Anthocyankomposition und -intensität wurden innerhalb aller 114 Proben, also beider analysierter Knollengewebe aller Linien, insgesamt 24 verschiedene Anthocyanprofile identifiziert (Abb. 6). Diese werden im Folgenden als Anthocyanprofilgruppen (oder kurz als Gruppen) bezeichnet. Das Endergebnis der gesamten Prozedur zur vorläufigen Annotation der Kartoffelanthocyane und der Gruppierung der Kartoffelgewebe ist in Appendix Abbildung A2 dargestellt. Innerhalb der Fleischproben wurden sechs unterschiedliche Anthocyanprofilgruppen ausfindig gemacht. Für Knollenschale wurden 18 Gruppen definiert. Die meisten dieser Gruppen umfassen dabei eine Reihe von roten bzw. blau-violetten Kartoffelsorten.

Die auffälligsten Unterschiede zwischen den Geweben bzw. den Kultivaren beinhalteten die Akkumulation von Anthocyanen mit verschiedenen Anthocyanidingrundgerüsten sowie verschiedenen Acyl- und Zuckerkonjugaten. Rotfleischige Kartoffeln enthalten hauptsächlich acylierte Pelargonidinderivate, wohingegen blau- bis violettfleischige Linien Gemische mehrerer acylierter Derivate von Petunidin, Peonidin und Malvidin beinhalten. Generell wurden größere Gesamtmengen und eine höhere Variabilität an Anthocyanen in Kartoffelschale nachgewiesen. Daher wurden auch in den weiterführenden Analysen dieser Studie die Schalenproben einbezogen.

Nach der Gruppierung aller analysierten Gewebeproben hinsichtlich deren Anthocyanprofilen wurden diejenigen Proben bzw. Kartoffelkultivare für weiterführende Studien ausgewählt, welche die höchste Intensität dieser 24 Profile aufweisen (Tab. 1 und Appendix Abb. A3). Auf diese Weise wurden 19 pigmentierte Kartoffelsorten mit unterschiedlichen Anthocyanprofilen in Knollenfleisch (6 Gruppen) und/oder Knollenschale (18 Gruppen) selektiert, wodurch ein Sortiment von 24 Proben aus Kartoffelknollengewebe mit vielfältiger Anthocyanzusammensetzung für das quantitative LC-MS/MRM-Profiling entstand (Abb. 6).

Analyse der Zielmoleküle zu gewährleisten, musste zunächst eine geeignete MRM-Methode generiert werden.

3.1.3.1. Allgemeine Faktoren der MRM-Methodenentwicklung

Zuerst musste ein charakteristisches Vorläuferion, welches bei einer spezifischen Retentionszeit eluiert (der sogenannte *Identifizier*), zusammen mit einem Fragment- oder Produktion (*Qualifizier*), das vorrangig während des induzierten Zerfalls des *Identifizier*-Moleküls gebildet wird, definiert werden. Diese Werte wurden dann zur Generierung einer MS-Methode genutzt, welche die molekülspezifischen Daten sequenziell erfasst. Die Etablierung einer solchen MS/MRM-basierten Methode erforderte zudem die Untersuchung zweier variabler MS-Parameter, der Kollisionsenergie (CE, *collision energy*) und der Konusspannung (CV, *cone voltage*). Bei der Elektrospray-Ionisierung kann der stoßaktivierte Zerfall, also die Fragmentierung des Vorläuferions durch energiereiche Zusammenstöße mit Gasmolekülen (Stoßgas), durch die spezifische Anpassung der Beschleunigungsspannung der Ionen vor Stoßaktivierung sowie der Spannung am Stoßgaskegel gefördert werden. Diese beiden Parameter kontrollieren die Effektivität der Fragmentierung und mussten individuell für jedes der Zielmoleküle angepasst werden. Somit konnte die Fragmentierung jedes einzelnen Analyten durch Erhöhung von Präzision und Level der Bildung und Detektion charakteristischer Ionenübergänge (Transitionen von *Identifizier* zu *Qualifizier*) optimiert werden. Um eine maximale Messempfindlichkeit im MRM-Modus gewährleisten zu können, sollte die Intensität bei der Fragmentierung der Vorläuferionen gebildeter Fragmentionen möglichst hoch sein. Die CE durfte daher nicht zu gering gewählt werden. Es war jedoch zu beachten, dass eine zu hohe CE zum Zerfall der charakteristischen Fragmentionen führen kann.

3.1.3.2. Metabolitannotation durch Auswahl indikativer molekularer Ionen zur LC-MS/MRM-Analyse

Um die Anthocyane in den Extrakten möglichst umfangreich zu erfassen, wurden verfügbare Literaturdaten herangezogen und die Retentionsordnungen und Signale molekularer Ionen mit dem eigenen mittels LC-UV/MS-Analyse erhobenen Datensatz verglichen. Die Werte der Anthocyanzielmoleküle, die mit denen des eigenen Datensatzes übereinstimmen, wurden

daraufhin verwendet, um die entsprechenden MRM-Bedingungen zu justieren. Zur individuellen, Anthocyananalyt-spezifischen Adaption der Konusspannung (CV) und der Kollisionsenergie (CE) wurden Anfangswerte von 20 V bzw. 20 eV gewählt. Mit diesen Einstellungen wurden die Fragmentierung jedes Vorläuferions und die Signalstärke einer jeden putativen Transition des Vorläuferions unter Verwendung einer Sammel- oder Poolprobe aller 24 zu analysierenden Gewebeproben (Tab. 1) untersucht. Aufgrund unzureichender Fragmentierung einiger Analyten wurden beide Parameter bis zur deutlichen Abnahme der Intensität des Vorläuferion-Signals, bei gleichzeitiger Erhöhung der Signalintensität des Produktions, in Zehnerschritten erhöht. Dies erfolgte bis zu einem Endwert von 40 V (CV) bzw. 40 eV (CE), zum einen für jeweils nur einen der beiden Parameter, zum anderen für beide Parameter simultan. Auf diese Weise wurden mehrere Läufe generiert und die jeweils für einen Analyten akquirierten Signale miteinander verglichen. Die Parametereinstellungen, die sich für die adäquate Fragmentierung des jeweiligen Vorläuferions als geeignetste erwiesen, wurden in die Messmethode integriert. Durch die Nutzung einer weitem, durch Vrhovsek et al. (2012) bereits etablierten MRM-Methode konnten neben den Anthocyanen auch weitere in Kartoffelknollen vorkommende Polyphenole analysiert werden. Diese Methode beinhaltet die Messparameter für 135 häufig in verschiedensten Früchten vorkommende phenolische Substanzen und ermöglicht somit eine umfangreiche Untersuchung dieser Sekundärmetabolite. Die beiden hier angewandten Messmethoden ermöglichten letztlich die fragmentierungsbasierte, relative Quantifizierung von insgesamt 21 Anthocyanen und 31 weiteren Polyphenolen.

Im Vergleich zum vorangegangenen initialen LC-UV/MS-Profilings ermöglichte die MRM-Analyse eine präzisere Annotation und die zuverlässigere relative Quantifizierung von Anthocyanen anhand spezifischer Ionenübergänge. Vier RT/Masse-Paare der LC-UV/MS-Messung (Appendix Abb. A2 g, Anthocyan Nummer 3, 15, 20 und 21) konnten zunächst nicht mit Bestimmtheit den entsprechenden Anthocyanen zugeordnet werden. Die MRM-Methode offenbarte, dass sich hinter jeder dieser molekularen Eigenschaften zwei Anthocyane mit jeweils gleichem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis und sehr ähnlicher Retentionszeit verbergen. Zudem lieferte die MRM-Analyse Aufschluss über sieben zuvor falsch positive Annotationen (LC-UV/MS, Anthocyan Nummer 6, 8-12 und 16) und führte zur zusätzlichen Detektion von Malvidin-3-rutinosid (Tabelle 2, A7).

Die spezifischen MRM-Parameter (CV, CE und Polarisierungsmodus) sowie Vorläuferion und Produktion der detektierten Analyten sind in Tabelle 2 und Tabelle 3 aufgeführt. Die für alle Zielmoleküle gleichsam angewandten Messbedingungen sind im Material- und Methodenteil (Abschnitt 2.2.3.) in detaillierter Form angegeben.

Tab. 2: MRM-Bedingungen für die quantitative Analyse von Kartoffelanthocyanen. Alle Messungen wurden in positivem Ionenmodus (ES+) durchgeführt. * Quantifizierungsionen sind in dicker Schrift dargestellt. ^{a-e} Referenzen zur Substanzannotation.

#	Tentative Annotation	RT	Transitionen	Konus-	Kollisions-	Literatur-
		[min]	[<i>m/z</i>]*	spannung [V]	energie [eV]	
A1	Petunidin-3-rutinosid-5-glucosid	2,99	787 → 317 /625/479	20/20/40	40/20/40	a
A2	Pelargonidin-3-rutinosid-5-glucosid	3,20	741 → 271 /433/579	20/20/40	40/40/40	b, c
A3	Peonidin-3-rutinosid-5-glucosid	3,33	771 → 301 /463/609	20/20/40	40/20/40	b
A4	Malvidin-3-rutinosid-5-glucosid	3,42	801 → 331 /493/639	40/40/40	40/40/40	a
A5	Petunidin-3-rutinosid	3,98	625 → 317 /479	20/20	40/20	a
A6	Pelargonidin-3-rutinosid	4,16	579 → 271 /433	20/30	20/20	b, c
A7	Malvidin-3-rutinosid	4,40	639 → 331 /493	20/20	40/20	a
A8	Petunidin-3-caffeoylrutinosid-5-glucosid	4,41	949 → 317 /479/787	20/20/40	40/20/40	a
A9	Delphinidin-3- <i>p</i> -coumaroylrutinosid-5-glucosid	4,45	919 → 303 /465/757	20/20/40	40/20/40	a, c
A10	Pelargonidin-feruloyl-xylosyl-glucosyl-galactosid	4,62	903 → 271	20	40	d
A11	Cyanidin-3- <i>p</i> -coumaroylrutinosid-5-glucosid	4,74	903 → 287 /449	20/20	40/20	c, e
A12	Petunidin-3- <i>p</i> -coumaroylrutinosid-5-glucosid	4,78	933 → 317 /479/771	40/40/40	40/40/40	a, c
A13	Petunidin-3-feruloylrutinosid-5-glucosid	4,91	963 → 317 /479/801	30/40/20	20/40/20	a
A14	Pelargonidin-3- <i>p</i> -coumaroylrutinosid-5-glucosid	5,03	887 → 271 /433/725	20/40/40	40/40/40	a, b
A15	Peonidin-3- <i>p</i> -coumaroylrutinosid-5-glucosid	5,09	917 → 301 /463/755	30/40/40	20/40/40	a, b, c
A16	Malvidin-3- <i>p</i> -coumaroylrutinosid-5-glucosid	5,11	947 → 331 /493/785	30/20/40	20/20/40	a, c
A17	Pelargonidin-3-feruloylrutinosid-5-glucosid	5,14	917 → 271 /433/755	20/20/40	40/40/40	b
A18	Peonidin-3-feruloylrutinosid-5-glucosid	5,20	947 → 301 /463/785	20/40/40	40/40/40	a, b
A19	Malvidin-3-feruloylrutinosid-5-glucosid	5,21	977 → 331 /493/815	40/30/40	40/20/40	a
A20	Petunidin-3- <i>p</i> -coumaroylrutinosid	5,35	771 → 317 /479	20/40	40/40	a
A21	Pelargonidin-3- <i>p</i> -coumaroylrutinosid	5,67	725 → 271 /433	20/20	40/40	a, b

^a Hillebrand *et al.* (2009)

^b Zhang *et al.* (2009)

^c http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?pathway+sot00942

^d Kammerer *et al.* (2003)

^e Zubko *et al.* (1993)

Tab. 3: MRM-Bedingungen für die quantitative Analyse von Kartoffelpolyphenolen.
* Quantifizierungionen sind in dicker Schrift dargestellt.

#	Tentative Annotation	RT	Transitionen	Konus- spannung	Kollisions- energie	Polarität
		[min]	[<i>m/z</i>]*	[V]	[eV]	
P1	4-Aminobenzoesäure	2,17	137,95 → 76,98 /94,37	20/20	20/20	positiv
P2	Neochlorogensäure	2,21	353,06 → 178,96 /191,00	26/26	18/18	negativ
P3	Chlorogensäure	2,79	353,06 → 92,97 /191,00	36/36	38/20	negativ
P4	<i>p</i> -Hydroxybenzoesäure	2,88	138,87 → 64,90 /76,95	20/20	26/18	positiv
P5	Cryptochlorogensäure	2,89	353,06 → 172,97 /178,96	34/34	14/16	negativ
P6	Fraxin	3,10	369,06 → 191,79 /206,94	32/32	32/20	negativ
P7	Daphnetin	3,20	178,93 → 104,96 /123,00	36/36	24/22	positiv
P8	Kaffeesäure	3,23	180,95 → 117,01 /144,94	16/16	22/16	positiv
P9	Vanillinsäure	3,29	168,95 → 64,98 /92,99	18/18	22/14	positiv
P10	2,4-Dihydroxybenzoesäure	3,42	152,87 → 64,91 /109,00	24/24	16/14	negativ
P11	Quercetin-3,4-rutinosid	3,63	627,18 → 303,07 /465,08	18/18	32/16	positiv
P12	<i>p</i> -Cumarsäure	4,08	164,95 → 91,02 /119,03	16/16	24/26	positiv
P13	Coniferylalkohol	4,09	163,03 → 103,03 /131,03	42/16	18/10	positiv
P14	Vanillin	4,13	152,89 → 92,99 /124,98	20/20	16/10	positiv
P15	Rutin	4,22	611,25 → 303,00 /465,01	18/18	22/12	positiv
P16	Quercetin-3-glucosid	4,53	465,13 → 228,99 /303,01	18/18	48/12	positiv
P17	Ferulasäure	4,56	194,96 → 116,96 /144,97	42/16	24/16	positiv
P18	Scopoletin	4,58	193,01 → 133,02 /161,08	14/14	16/10	positiv
P19	Sinapinsäure	4,60	222,97 → 163,96 /207,97	30/30	18/14	negativ
P20	Kaempferol-3-rutinosid	5,05	595,19 → 287,00 /449,03	18/18	20/12	positiv
P21	Isorhamnetin-3-rutinosid	5,35	625,20 → 317,03 /479,04	18/18	20/12	positiv
P22	1,5-Dicaffeoylchinasäure	5,36	515,16 → 190,98 /353,06	26/26	28/16	negativ
P23	Kaempferol-3-glucosid	5,49	449,13 → 152,98 /287,01	16/16	48/14	positiv
P24	Quercetin-3-rhamnosid	5,59	449,13 → 129,03 /303,01	16/16	14/10	positiv
P25	Isorhamnetin-3-glucosid	5,63	479,14 → 302,02 /317,04	16/16	38/14	positiv
P26	Coniferylaldehyd	5,78	178,97 → 118,98 /146,99	22/22	18/14	positiv
P27	Dihydrokaempferol	6,13	289,03 → 152,99 /242,99	18/18	18/16	positiv
P28	Phlorizin	6,22	435,04 → 166,98 /273,03	32/32	30/16	negativ
P29	Luteolin	7,36	287,08 → 134,96 /152,99	52/52	30/32	positiv
P30	Zimtsäure	7,61	149,00 → 103,00 /131,00	26/16	10/12	positiv
P31	Kaempferol	8,46	287,02 → 152,99 /164,97	50/50	32/26	positiv

3.1.4. Bestätigung gewebe- und kultivarspezifischer Polyphenolmuster und Indikation spezifischer Korrelationen zwischen Anthocyanen und anderen Polyphenolen mittels LC-MS/MRM

Extrakte des für die 24 Anthocyanprofilgruppen repräsentativen Materials (Knollenfleisch und/oder -schale von 19 ausgewählten Kartoffelsorten, Tab. 1) wurden unter den in Abschnitt 3.1.3.1. beschriebenen Messparametern mittels LC-MS/MRM analysiert. Der daraus generierte Datensatz wurde auf Unterschiede in Anthocyanprofilen und den Profilen weiterer Polyphenole sowie auf Unterschiede in der Abundanz dieser Substanzen untersucht. Aus der

zur Visualisierung der Daten durchgeführten zweifachen Hierarchischen Clusteranalyse (*two-way hierarchical clustering analysis*, HCA) des Datensatzes, dargestellt in Abbildung 9, resultierte ein Dendrogramm. Dieses zeigt die hierarchischen Beziehungen zwischen den Metabolitprofilen der Kartoffelgewebe zusätzlich zu einer Heatmap (Smoliński *et al.* 2002), welche die \log_{10} -skalierten Metabolitintensitäten der Peakflächen detektierter Substanzen unter Verwendung einer Farbskala von weiß (niedriger Wert) zu dunkelgrün (hoher Wert) veranschaulicht. Nur Substanzen mit mindestens fünf Werten unter allen unterschiedlichen Kartoffelproben, mit Peakflächen über dem Schwellenwert von 10^3 , wurden bei den Berechnungen berücksichtigt. Dadurch entfallen bei der HCA die folgenden Substanzen: P16, P19, P23, P24 und P31 (Tab. 3). Die analysierten Substanzen sind in Abbildung 9 farblich unterschiedlich hervorgehoben, Anthocyane (A) in roter Schrift und zusätzliche Polyphenole (P) in Schwarz.

Das Hierarchische Clustering offenbarte zunächst eine Aufteilung von rotem und blau-violetter Gewebe (vertikale Achse). Als Hauptanthocyane in rotem Gewebe wurden Pelargonidin-3-*p*-coumaroylrutinosid-5-glucosid (A14), Pelargonidin-3-feruloylrutinosid-5-glucosid (A17) und Pelargonidin-3-rutinosid-5-glucosid (A2) detektiert, während die Hauptanthocyane in blau-violetter Gewebe Petunidin-3-*p*-coumaroylrutinosid-5-glucosid (A12) und Malvidin-3-feruloylrutinosid-5-glucosid (A19) sind, wobei letzteres häufiger in blau-violetter Knollenschale als in Knollenfleisch vorkommt. Dies bestätigt die Ergebnisse des initialen LC-UV/MS-Profilings im Hinblick auf das grobe Muster der Anthocyankomposition. Zusätzlich ergibt sich eine deutliche Gruppierung des Gewebetyps in Schale und Fleisch (vertikale Achse). Diese ist vorrangig auf andere phenolische Verbindungen zurückzuführen, die in Knollenschale vorkommen, jedoch nicht, oder nur in sehr geringen Mengen in Knollenfleischextrakten detektiert werden konnten. Dazu zählen beispielsweise Coniferylaldehyd (P26), 1,5-Dicaffeoylchinasäure (P22) und Daphnetin (P7) sowie Vanillinsäure (P9), Ferulasäure (P17), Vanillin (P14) und Scopoletin (P18). Es wird daher angenommen, dass der Gehalt dieser Verbindungen gewebespezifisch sein könnte.

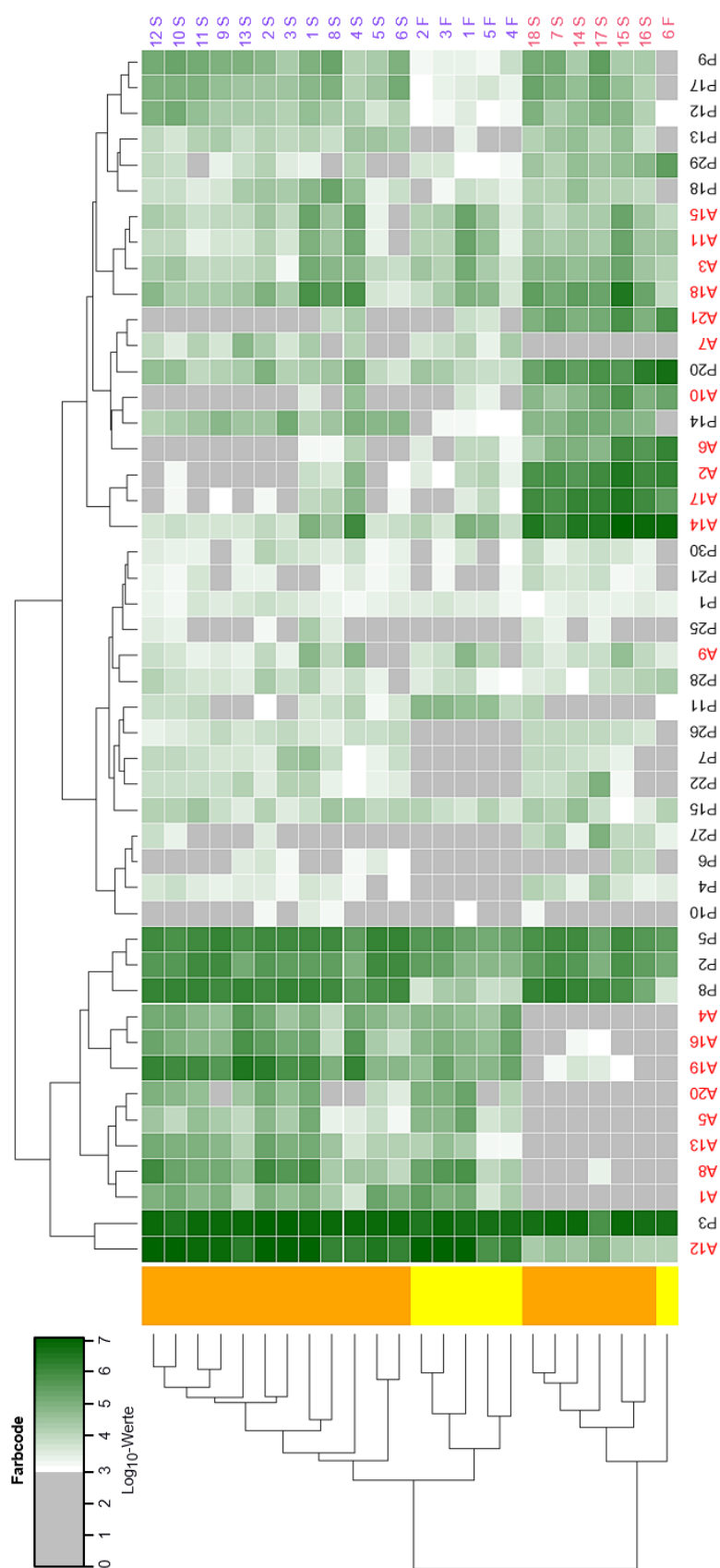


Abb. 9: Ergebnis der zweifachen Hierarchischen Clusteranalyse, visualisiert anhand einer kombinierten Darstellung aus Dendrogramm und Heatmap. Die Heatmap repräsentiert die Intensitäten (\log_{10} -skalierte Werte der MRM-Peakflächen von 0 bis 10^7 , dargestellt durch einen Farbcode von weiß zu dunkelgrün) der phenolischen Metabolite (*Spalten*) in Knollengeweben verschiedener Kartoffelsorten (*Zeilen*). Auf der vertikalen Achse repräsentieren zwei Hauptcluster die Sorten mit *roter* oder *blau-violetter* Knollenfärbung. Innerhalb jedes dieser beiden Cluster gruppieren Proben des gleichen Gewebetyps, Knollenfruchtfleisch (*gelber Balken*) bzw. Knollenschale (*orangener Balken*) gemeinsam. Auf der horizontalen Achse formen Anthocyane (A, *rot*) und andere Polyphenole (P, *schwarz*) drei Hauptcluster, die auf ihre relative Abundanz in den verschiedenen Probengruppen und somit auf ihre Beziehung untereinander hindeuten. Die Abkürzungen für Kartoffelsorten bzw. -gewebe (Anthocyanprofilgruppen) und Metabolite entsprechen der Auflistung in Tabelle 1, 2 und 3. Graue Kästchen zeigen Peakflächen unterhalb des Schwellenwertes von 10^3 an. Nur Substanzen mit mindestens fünf Werten unter allen Kartoffelproben, mit Peakflächen über dem Schwellenwert von 10^3 , wurden bei den Berechnungen berücksichtigt, wodurch folgende Substanzen entfallen: P16, P19, P23, P24 und P31 (Tab. 3).

Des Weiteren deuten die Ergebnisse des Hierarchischen Clustering auf eine Korrelation zwischen Anthocyanen und anderen Polyphenolen hin. Als Beispiel hierfür ist das Kaempferol-3-rutinosid (P20) zu nennen, das offenbar mit der Gewebefarbe assoziiert ist, da es mit höherer Abundanz in rotem als in blau-violettem Knollengewebe vorkommt. Dasselbe wurde für blau-violettes Knollengewebe beobachtet, das Quercetin-3,4-rutinosid (P11) enthält, welches in rotem Gewebe kaum nachgewiesen wurde. Um diese Aussagen zu bekräftigen und detaillierter zu untersuchen, wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt, welche die Korrelationskoeffizienten und die *P*-Werte für die Beurteilung der Signifikanz detektierter Korrelationen liefert und im Folgenden beschrieben wird.

3.1.5. Nachweis signifikanter Korrelationen zwischen Polyphenolen

Durch Berechnung der Pearson-Korrelationskoeffizienten r konnten lineare Beziehungen zwischen den polyphenolischen Metaboliten aufgezeigt werden. Einige Substanzen konnten aufgrund sehr geringer Intensitätswerte (mit MRM-Peakflächen unter 10^3) nicht in die Korrelationsanalyse einbezogen werden, und zwar A20, P10, P16, P19, P23, P24, P25, P31 (Tab. 3). Eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Pearson-Korrelation ist in Form einer Heatmap in Abbildung 10 gezeigt. Hier reichen die Korrelationskoeffizienten von -1 (negative Korrelation) bis 1 (positive Korrelation), veranschaulicht durch eine Farbskalierung. Signifikante Korrelationen sind durch verschiedene Kategorien der *P*-Werte gekennzeichnet. Zugehörige Werte für Korrelationskoeffizienten ($|r|$ -Werte) und Signifikanzwerte (*P*-Werte) sind in Appendix Abbildung A4 a, c und d aufgeführt. Zusätzlich wurden Streudiagramme für jedes in Wechselbeziehung stehende Substanzpaar erstellt, welche die Art der Beziehung zwischen beiden Substanzen veranschaulichen (Appendix Abb. A4 b, c, d). Eine Regressionsgerade beschreibt den linearen Zusammenhang, der durch die Pearson-Korrelation ermittelt wurde.

Die stärksten positiven und negativen Korrelationen zwischen den Metaboliten sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Generell weisen die beobachteten positiven Assoziationen eine höhere Signifikanz auf als die negativen. Von allen berechneten Zusammenhängen stellt die positive Korrelation zwischen den beiden Anthocyanen Delphinidin-3-*p*-coumaroylrutinosid-5-glucosid (A9) und Peonidin-3-*p*-coumaroylrutinosid-5-glucosid (A15) mit einem r -Wert von 1 und einem *P*-Wert nahe 0 die stärkste und am höchsten signifikante Beziehung dar.

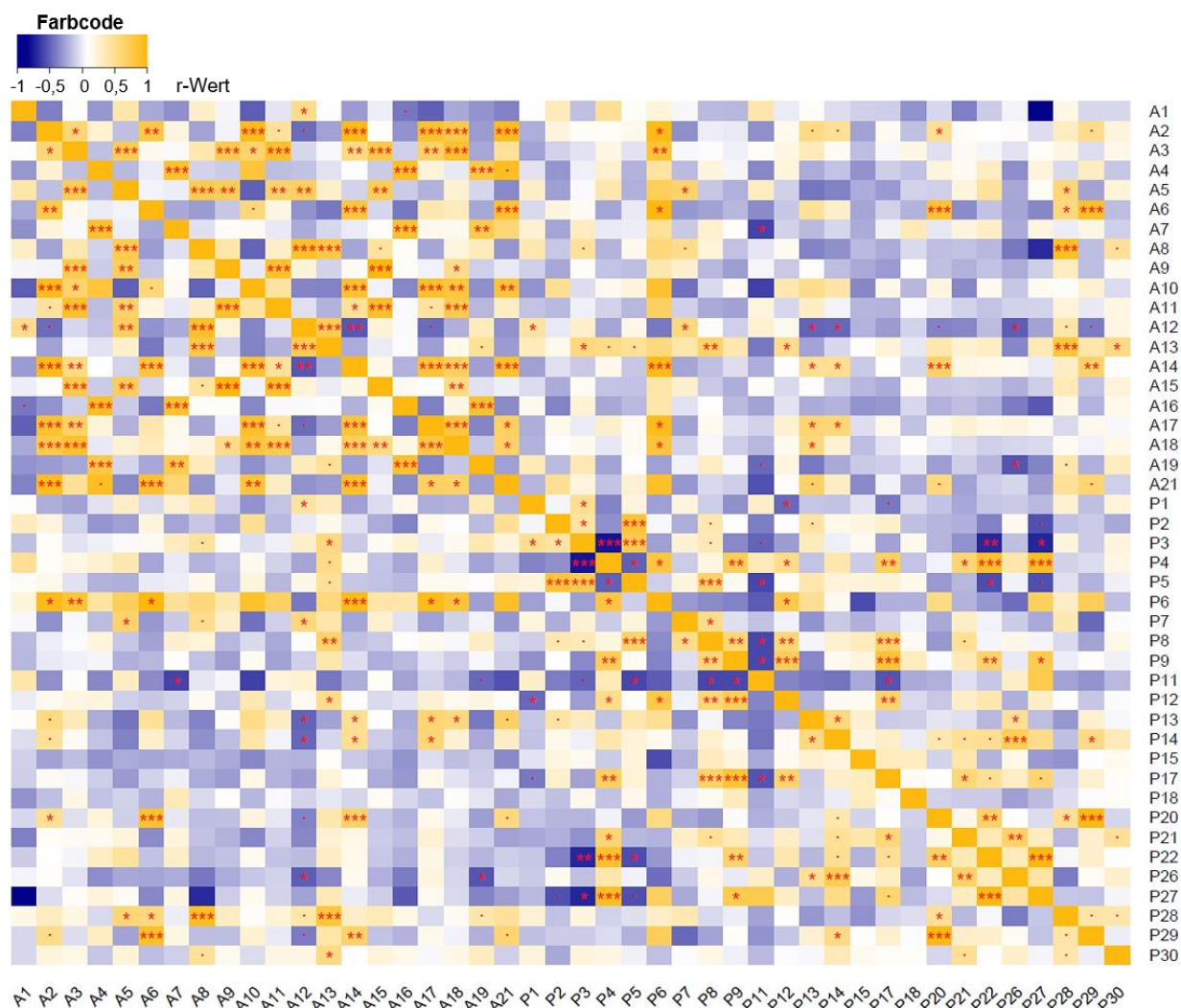


Abb. 10: Ergebnisse der Korrelationsanalyse nach Pearson, dargestellt in Form einer Heatmap. Die Beziehungen zwischen allen Anthocyanen (A) und zusätzlichen phenolischen Komponenten (P), welche mittels LC-MS/MRM in Kartoffelknollengewebe detektiert wurden, sind anhand der Darstellung des Korrelationskoeffizienten r veranschaulicht (Farbcode von dunkelblau (-1), über weiß (0), bis dunkelgelb (1)). Die Signifikanz der Korrelationen ist durch verschiedene Kategorien der P -Werte hervorgehoben (***) $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$, • $P < 0,1$). Nur Substanzen mit MRM-Peakflächen über dem Schwellenwert von 10^3 , wurden bei den Berechnungen berücksichtigt, wodurch folgende Substanzen entfallen: A20, P10, P16, P19, P23, P24, P25 und P31. Abkürzungen der Metabolite sind entsprechend Tabelle 2 und 3 angegeben.

Ebenso korreliert die Abundanz von Pelargonidin-3-rutinosid-5-glucosid (A2) positiv mit der von Pelargonidin-feruloyl-xylosyl-glucosyl-galactosid (A10), Pelargonidin-3-*p*-coumaroylrutinosid-5-glucosid (A14, Hauptanthocyan in rotem Knollengewebe) und Pelargonidin-3-*p*-coumaroylrutinosid (A21). Malvidin-3-rutinosid-5-glucosid (A4) weist eine starke positive Korrelation zu Malvidin-3-*p*-coumaroylrutinosid-5-glucosid (A16) auf. Die stärkste positive Beziehung zwischen einem Anthocyan und einer anderen polyphenolischen

Komponente wurde für Pelargonidin-3-*p*-coumaroylrutinosid-5-glucosid (A14) und Fraxin (P6) berechnet. Weitere signifikante Korrelationen wurden für Petunidin-3-caffeoylrutinosid-5-glucosid (A8) und Phlorizin (P28), für Pelargonidin-3-rutinosid (A6) mit Kaempferol-3-rutinosid (P20) und Luteolin (P29), sowie auch für Petunidin-3-feruloylrutinosid-5-glucosid (A13) und Phlorizin (P28) nachgewiesen. Innerhalb der untersuchten Polyphenole zeigten 1,5-Dicaffeoylchinasäure (P22) und Dihydrokaempferol (P27, DHK) die höchste positive Korrelation. Weitere Polyphenole mit signifikanter positiver Korrelation sind Kaempferol-3-rutinosid (P20) und Luteolin (P29), *p*-Hydroxybenzoesäure (P4) mit 1,5-Dicaffeoylchinasäure (P22) und DHK (P27) sowie Vanillinsäure (P9) und Ferulasäure (P17). Die stärkste und am meisten signifikante negative Korrelation innerhalb der Polyphenole konnte mit einem *r*-Wert von -0,77 und einem *P*-Wert nahe 0 für Chlorogensäure (P3), der häufigsten polyphenolischen Verbindung in Kartoffel, und *p*-Hydroxybenzoesäure (P4) beobachtet werden.

Tab. 4: Beispiele für positive oder negative Korrelationen zwischen polyphenolischen Substanzen in Kartoffelknollen, bestätigt durch die Korrelationsanalyse nach Pearson. Angegeben sind die berechneten Korrelationskoeffizienten *r* für maximal fünf Beispiele pro Korrelationstyp. *P*-Werte werden repräsentiert durch *** *P* < 0,001, ** *P* < 0,01, * *P* < 0,05, · *P* < 0,1. A, Anthocyane; P, andere Polyphenole. Abkürzungen der Substanznamen sind entsprechend der Auflistung in Tabelle 2 und 3 angegeben.

Korrelationstyp	Stärkste positive Korrelation	Stärkste negative Korrelation
A vs. A	A9 / A15 → +1,00***	A12 / A14 → -0,53**
	A2 / A14 → +0,96***	A2 / A12 → -0,46·
	A2 / A10 → +0,95***	A12 / A17 → -0,46·
	A2 / A21 → +0,94***	A1 / A16 → -0,41·
	A4 / A16 → +0,91***	
A vs. P	A14 / P6 → +0,97***	A7 / P11 → -0,60*
	A8 / P28 → +0,91***	A19 / P26 → -0,54*
	A6 / P29 → +0,90***	A12 / P26 → -0,51*
	A6 / P20 → +0,87***	A12 / P13 → -0,49*
	A13 / P28 → +0,82***	A12 / P14 → -0,47*
P vs. P	P22 / P27 → +0,98***	P3 / P4 → -0,77***
	P20 / P29 → +0,97***	P3 / P22 → -0,71**
	P4 / P27 → +0,93***	P3 / P27 → -0,71*
	P4 / P22 → +0,88***	P5 / P11 → -0,59*
	P9 / P17 → +0,84***	P8 / P11 → -0,59*

3.2. Evaluierung molekularer Unterschiede der Anthocyanbiosynthese in verschiedenfarbigen Kartoffeln – Untersuchungen zur Rolle der Flavonoid-3',5'-hydroxylase (F3'5'H)

Die F3'5'H ist ein bedeutendes Schlüsselenzym der Anthocyanbiosynthese, da sie für die 5'-Hydroxylierung am B-Ring des Anthocyanidingrundgerüsts (Abb. 1 und 3) zur Bildung blauer Anthocyane unabdingbar ist und somit Pigmenttyp und Farbgebung maßgeblich mitbestimmt (siehe auch Abschnitt 1.3.1.). Unterschiede im Farbspektrum der Knollen verschiedener Kartoffelsorten sind daher vermutlich im Besonderen auf Unterschiede in der Regulation der F3'5'H zurückzuführen. Aus diesem Grund steht im Folgenden die Untersuchung regulatorischer Mechanismen dieses Enzyms im Mittelpunkt. Die vorangestellte phytochemische Charakterisierung von Knollengewebe eines großen Kartoffelakzessionensortimentes (Abschnitt 3.1.) ermöglichte die Identifizierung von Linien/Gewebe mit unterschiedlichsten Anthocyanprofilen mit und ohne erkennbare F3'5'H-Aktivität. Material repräsentativer Kultivarkandidaten diente als Grundlage für die weiterführenden Analysen.

Um möglichst umfassende Kenntnisse über die Mechanismen der F3'5'H-Regulation zu erlangen, wurde diese auf drei unterschiedlichen Ebenen untersucht, und zwar auf genomischer (Abschnitt 3.2.1. und 3.2.2.), auf transkriptioneller (Abschnitt 3.2.3.) und auf Protein-Ebene (Abschnitt 3.2.4.). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden in den folgenden Abschnitten sukzessive abgehandelt.

3.2.1. Identifizierung allelischer Varianten des *Stf3'5'h*-Gens in repräsentativen, kontrastierenden Kartoffelknollenphänotypen

Bei den untersuchten Kartoffelakzessionen handelt es sich um tetraploide und in hohem Maße heterozygote Organismen. Gemäß dem bisherigen Stand der Forschung wird die F3'5'H in *S. tuberosum* durch ein einziges Gen kodiert. Daher besteht die Möglichkeit, dass bis zu vier Varianten des *Stf3'5'h*-Gens in Form verschiedener Allele im Genom vorliegen können. Allelische Unterschiede zwischen Kartoffelakzessionen mit verschiedenfarbigen Knollen könnten auf eine bereits auf DNA-Ebene stattfindende Regulation der F3'5'H hindeuten, welche möglicherweise die Gewebefärbung beeinflusst. Um diese Hypothese zu

überprüfen, wurden fünf in Anthocyankomposition und -akkumulierungsmuster stark variierende Kartoffelakzessionen ausgewählt, deren *Stf3'5'h*-Allele sequenziert und vergleichend analysiert.

3.2.1.1. Auswahl repräsentativer Phänotypen zur genomischen Analyse des *Stf3'5'h*-Locus

Bei der Auswahl der Kartoffellinien für diesen methodischen Ansatz wurde darauf geachtet, eine möglichst große Bandbreite der phänotypischen Diversität hinsichtlich der Anthocyanakkumulation abzudecken, dabei aber die Anzahl der zu analysierenden Linien übersichtlich und repräsentativ zu halten (Abb. 11). Es wurde dafür eine Linie mit blauen/violetten Pigmenten in beiden Knollengeweben (Linie #57, „Vitelotte“: violette, 5'-hydroxylierte Petunidin- und Malvidinderivate) sowie ein Vertreter für rotfleischige, rotschalige Phänotypen (Linie #16, „Königspurpur“: größtenteils rote Pelargonidine, aber auch Peonidinderivate) ausgewählt. Des Weiteren wurden zwei Linien in die Analyse einbezogen, die zwar blaue/violette bzw. rote Anthocyane in der Schale aufweisen, deren Knollenfleisch jedoch keine Anthocyane enthält (Linie #25, „Weinberger Blaue“: hauptsächlich violette Petunidine, aber auch rote pelargonidin- und cyanidinbasierte Anthocyane; Linie #9, „Bangladesh“: zumeist Pelargonidine und Peonidinderivate). Außerdem wurde eine gelbfleischige, gelbschalige Kartoffelakzession (Linie #58, „Gala“) mitgeführt, welche keine Anthocyane im Knollengewebe aufweist.

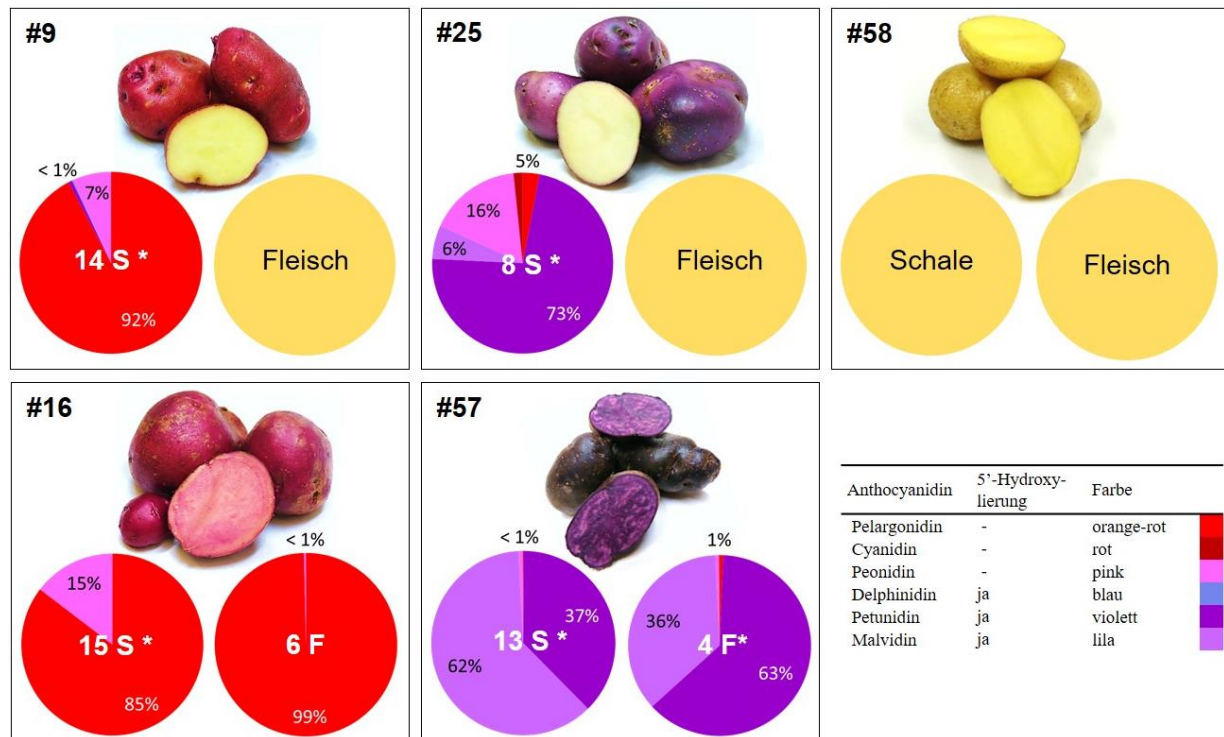


Abb. 11: Fünf ausgewählte Kartoffelakzessionen, mit hoher Varianz in Anthocyankomposition und -akkumulationsmuster im Knollengewebe. Kreisdiagramme zeigen den relativen Gehalt an Anthocyaninderivaten für Knollenschale (*S*, jeweils links) und Knollenfleisch (*F*, jeweils rechts). Die prozentualen Werte ergeben sich aus Kalkulationen des MRM-Datensatzes. Gewebe die keine Anthocyane beinhalten sind als gelbe Kreise dargestellt. Die Abkürzungen für Kartoffelsorten bzw. -gewebe (Anthocyanprofilgruppen für *S* und *F*) entsprechen der Auflistung in Tabelle 1. * Gewebe mit höchster Intensität des Profils innerhalb der jeweiligen Anthocyanprofilgruppe (Appendix Abb. A2).

3.2.1.2. Isolierung und Charakterisierung einzelner *Stf3'5'h*-Allele

Das *Stf3'5'h*-Gen (~3 kb) inklusive einer 2kb-Region stromaufwärts des Translationsstarts (putativer Promotorbereich) und eines Teils des 3'-Bereiches (~200 bp) der fünf ausgewählten Linien (Abb. 11) wurde mittels PCR von genomischer DNA amplifiziert (Abb. 12).

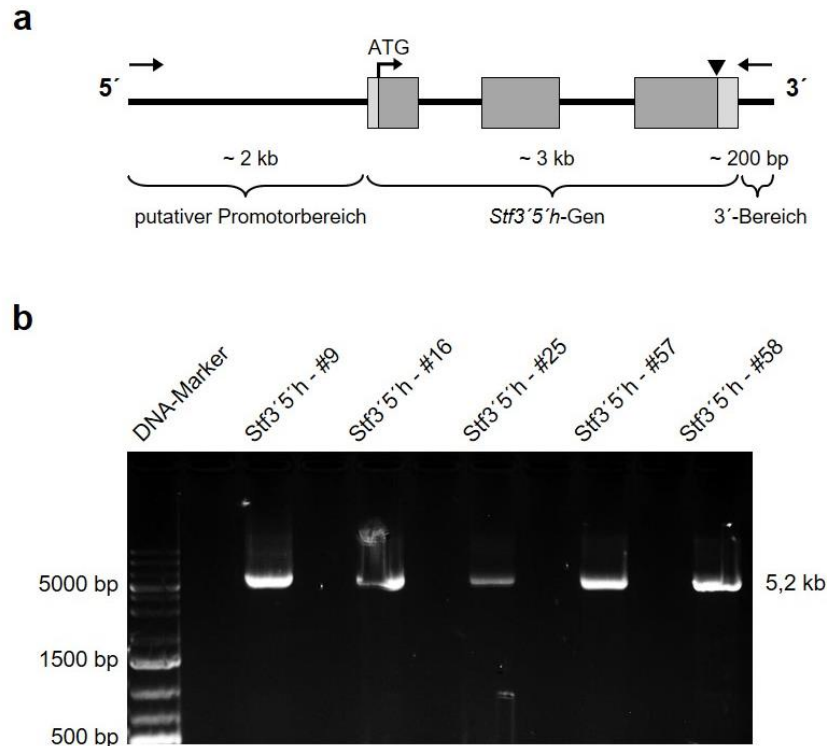


Abb. 12: *Solanum tuberosum* *f3'5'h*-Locus. Schematische Darstellung (a) und gelelektrophoretische Überprüfung (b) des durch PCR von genomischer DNA fünf ausgewählter Kartoffellinien (siehe Abb. 11) amplifizierten *Stf3'5'h*-Gens, inklusive einer ~2kb-Region im 5'-Bereich und eines Teils des 3'-Bereiches (~5,2 kb). Das *Stf3'5'h*-Gen beinhaltet drei Exons (dargestellt als graue Boxen; dunkelgrau kennzeichnet kodierende Sequenz) und zwei Introns (durchgängige Linien zwischen den Exons). Die Exon-Intron-Struktur wurde der NCBI-Akzession XM_015309422.1 entnommen. Ein eckiger Pfeil kennzeichnet den Translationsstart (ATG) und ein Dreieck den Translationsstop. Bindestellen der zur Amplifizierung genutzten Primer und deren Orientierung (Abschnitt 2.3.5.3.) sind durch gerade Pfeile am 5'- und 3'-Ende markiert. Die PCR-Analyse der genomischen DNA bestätigt die Existenz des Gens in allen Linien. DNS-Marker: GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder.

Das so generierte ~5,2 kb große DNA-Fragment wurde kloniert und zwölf Subklone pro Kartoffellinie sequenziert. Die Auswertung der Sequenzdaten ist graphisch in Abbildung 13 dargestellt. Zusätzlich sind die wichtigsten Daten in Tabelle 5 zusammengefasst. Appendix Abbildung A5 zeigt zudem eine detailliertere, vergrößerte Übersicht der Anordnung aller ermittelten Unterschiede innerhalb des sequenzierten 5,2kb-Fragments. Eine DNA-Konsensussequenz des *Stf3'5'h*-Locus ist in Appendix Abbildung A6 angegeben. Die einzelnen allelischen Varianten wurden unter den fortlaufenden Akzessionsnummern MN256403- MN256432 in der Datenbank des NCBI hinterlegt (Appendix Tab. A2).

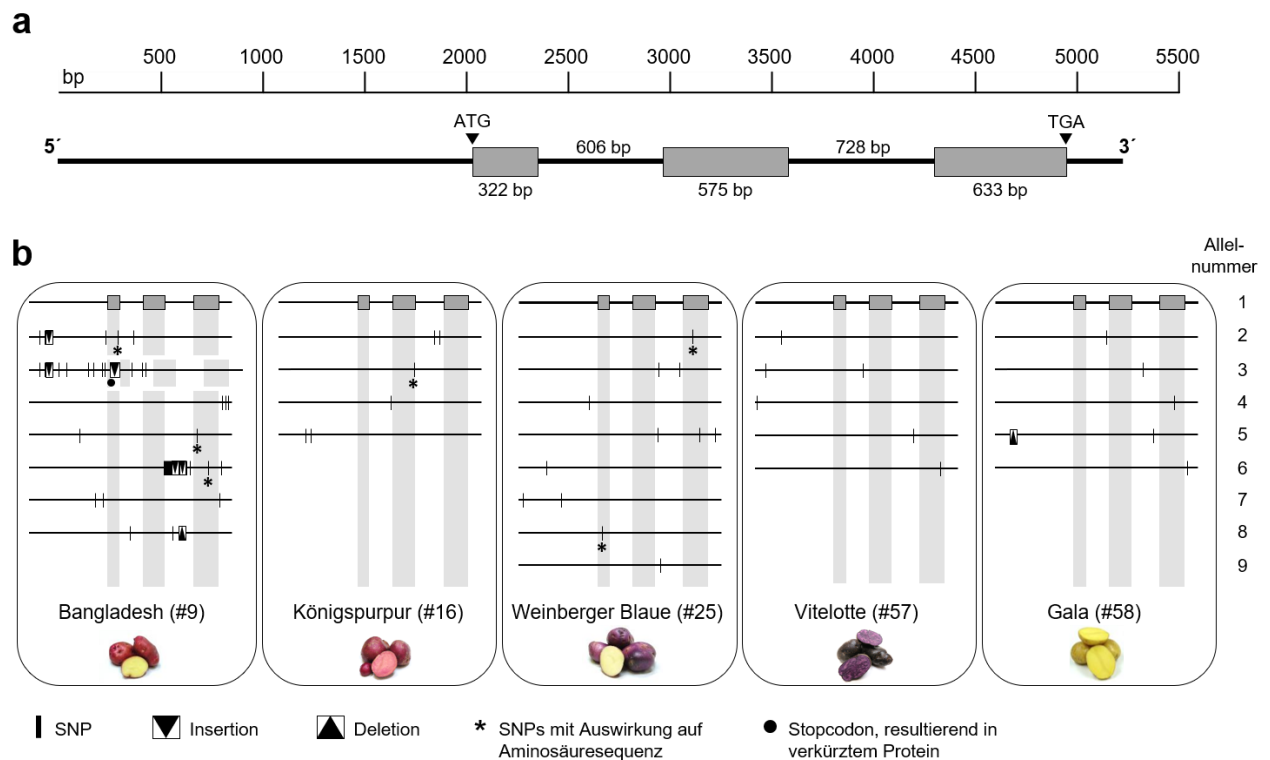


Abb. 13: Schematische Darstellung der *Stf3'5'h*-Allele in fünf ausgewählten, kontrastierenden Kartoffelakzessionen. Eine als Allel 1 bezeichnete Variante des *f3'5'h*-Gens (**a**) existiert im Genom aller fünf Genotypen. Im Vergleich zu dieser konservierten Sequenz des Allel 1 weisen die übrigen, in ihrer Anzahl pro Linie verschiedenen Allele diverse Sequenzunterschiede auf (**b**). Für jeden der fünf Kartoffelgenotypen zeigt eine schematische Darstellung die Exon-Intron-Struktur von Allel 1 sowie in vereinfachter Form, als durchgängige Linie, die unterschiedlichen Allele. Dabei sind Art und relative Position der Sequenzunterschiede durch verschiedene Symbole gekennzeichnet. Die Anordnung der Allele innerhalb eines Genotyps, von oben nach unten, entspricht einer fortlaufenden Nummerierung, mit Allel 1 beginnend. Exons sind für Allel 1 als graue Boxen dargestellt. Für die übrigen Allele sind die Positionen der Exons grau hinterlegt. Eine 241bp-Insertion im ersten Exon von Allel #9_3 (Linie #9, Bangladesh, Allel 3) bewirkt eine Verschiebung der Exonpositionen.

Alle fünf analysierten Linien erwiesen sich als stark polymorph für den *Stf3'5'h*-Locus mit jeweils mehr als vier Varianten (Allele) der *f3'5'h*-Sequenz. Unter sämtlichen für die fünf Kultivare analysierten Klonen wurden insgesamt 30 verschiedene Allele detektiert (Appendix Tab. A2). Diese unterscheiden sich hauptsächlich in der Anzahl, Position und Art von Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs, *single nucleotide polymorphisms*), sowie kleinerer Insertionen und Deletionen von bis zu fünf Basenpaaren, sowohl innerhalb einer Kartoffelakzession, als auch zwischen den verschiedenen Akzessionen (Abb. 13, Tab. 5 und Appendix Abb. A5). Eine Variante des Gens, die im Folgenden als Allel 1 (für DNA-Sequenz siehe Appendix Abb. A6 oder NCBI-Akzession MN256403) bezeichnet wird, tritt in jeder der fünf analysierten Genotypen (Abb. 13) und mit der höchsten Abundanz innerhalb

der jeweils zwölf sequenzierten *Stf3'5'h*-Klone auf (Tab. 5). So zeigt sich die Sequenz von Allel 1 für die rotfleischige, rotschalige Linie „Königspurpur“ (#16) beispielsweise bei 2/3 und für die gelbfleischige, blauschalige Linie „Weinberger Blaue“ (#25) bei 1/4 der getesteten Klone. Dieses in allen analysierten Linien konservierte Allel diente somit als Basis für die Validierung der einzelnen Sequenzunterschiede der übrigen Allele, die daher alle relativ zur Sequenz von Allel 1 zu betrachten sind.

Tab. 5: Ausgewählte Daten zur Charakterisierung der *Stf3'5'h*-Allele fünf ausgewählter Kartoffelgenotypen. Allel 1 repräsentiert eine in allen fünf Linien konservierte Sequenz des untersuchten 5,2kb-Genlocus. Den Liniennummern (#) entsprechende Sortennamen sind Tabelle 1 zu entnehmen.

Linie			Gesamtzahl detektierter Allele	Alleldosis Allel 1 ^a	Sequenzunterschiede	
#	Fleisch	Schale			Anzahl pro Allel	Typen
9	gelb	rot	8	5/12	2 - 22	SNPs, Insertionen, Deletion, MITE
16	rot	rot	5	8/12	1 - 2	SNPs
25 *	gelb	violett	9	3/12	1 - 3	SNPs
57 *	violett	violett	6	7/12	1 - 2	SNPs
58	gelb	gelb	6	7/12	1 - 2	SNPs, Deletion

* Linien mit offenkundiger F3'5'H-Aktivität

^a Anteil an 12 sequenzierten Klonen

Eines der *Stf3'5'h*-Allele der gelbfleischigen, rotschaligen Linie „Bangladesh“ (Linie #9, Allel #9_3, NCBI-Akzession MN256405) weist einen besonders drastischen Unterschied zu den übrigen Allelen auf (Abb. 13 und Appendix Abb. A6). Allel #9_3 besitzt eine 241bp-große Insertion im vorderen Drittel des ersten Exons. Dabei handelt es sich vermutlich um ein Miniatur-transponierbares Element mit umgekehrten Sequenzwiederholungen (MITE, *miniature inverted-repeat transposable element*). Es weist unvollkommene, umgekehrte, terminale Cytosin-/Thymin-reiche Sequenzwiederholungen sowie eine Duplikation der Thymin-Adenin (TA) -Insertionsstelle auf. Dieses MITE trägt ein Stopcodon nach dem 21. Basenpaar, das zu einem stark verkürzten Protein führen würde.

Im Vergleich der unterschiedlichen Genotypen zeigt Allel 1 die geringste Abundanz in der Akzession „Weinberger Blaue“ (Linie #25), die auf F3'5'H-Aktivität zurückzuführende violette Anthocyane in der Knollenschale aufweist (Abb. 11). Allel 1 wurde hier mit 1/4 in

drei von zwölf *f3'5'h*-Klonen identifiziert (Tab. 5). In ähnlicher Dosierung liegt scheinbar das Allel #25_3 (NCBI-Akzession MN256416) vor, das in zwei der untersuchten Klone auftrat. Alle übrigen Allele dieser und der übrigen untersuchten Linien wurden nur einmal detektiert.

Die oben genannten Kartoffellinien #9 und #25, die zwar Anthocyane in der Knollenschale, nicht aber im Knollenfleisch bilden, verfügen scheinbar über einen komplexeren genetischen Hintergrund des *Stf3'5'h*-Gens als Kartoffelsorten mit gleichartiger oder gänzlich fehlender Anthocyanakkumulation in beiden Gewebetypen (Abb. 13 b). So weisen Linie #9 und #25 eine größere Anzahl unterschiedlicher *Stf3'5'h*-Allele mit höherer Abundanz an Sequenzpolymorphismen auf als die Linien #16, #57 und #58. Diese Beobachtung scheint allerdings unabhängig vom Anthocyantyp (Abb. 11) und somit auch von der Funktionalität des *Stf3'5'h*-Genproduktes zu sein.

Generell konnte eine größere Anzahl an Sequenzpolymorphismen in nichtkodierenden als in kodierenden Sequenzabschnitten des *f3'5'h*-Gens beobachtet werden, insbesondere für die Allele der Linien #9 und #25 (Abb. 13 b, Appendix Abb. A5). Mit Ausnahme der MITE-Insertion in Allel #9_3 befinden sich die ermittelten Nukleotidinsertionen und -deletionen (InDel) in den nichtkodierenden Sequenzabschnitten und haben daher vermutlich auch keine Veränderung der Proteinsequenz zur Folge. Linie #9 weist insgesamt sowie innerhalb einzelner Allele die höchste Anzahl dieser InDel-Polymorphismen auf. In den kodierenden Sequenzabschnitten konnten insgesamt, innerhalb aller Allele sämtlicher analysierter Genotypen, zehn Unterschiede festgestellt werden (Abb. 13 b, Appendix Abb. A5). Von diesen treten nur etwa ein bis vier pro Linie und maximal einer pro Allel auf. Der mit Abstand deutlichste Unterschied in der kodierenden Sequenz des *f3'5'h*-Gens beruht auf der MITE-Insertion in Allel #9_3.

Mit Ausnahme der ersten drei Sequenzunterschiede in Allel 2 und 3 der Linie #9 (Appendix Abb. A5 und Tab. A2) konnten keinerlei Übereinstimmungen der SNPs, Insertionen, Deletionen oder Austausche mehrerer Basenpaare zwischen *Stf3'5'h*-Allelen einer Linie oder verschiedener Linien identifiziert werden. Weder in kodierenden Sequenzabschnitten, noch in regulatorischen Bereichen der Transkription konnten Regelmäßigkeiten bzw. Muster zwischen den Allelen festgestellt werden. Dies zeigt, dass alle detektierten allelischen Varianten voneinander verschieden sind. Jedoch ergab die Sequenzanalyse, dass eine dieser Varianten des *Stf3'5'h*-Gens (Allel 1) im Genom jeder der fünf analysierten Genotypen existiert und dort wahrscheinlich mit deutlich höherer Abundanz vorkommt als die übrigen in

ihrer Anzahl von Genotyp zu Genotyp verschiedenen Allele. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass innerhalb der Allele eines Genotyps sowie auch im Vergleich der Allele zwischen verschiedenen Genotypen bzw. Phänotypen eine sehr hohe Sequenzähnlichkeit (durchschnittlich >95 %, bei 28 von insgesamt 30 detektierten Allelen sogar ~99,9 %, innerhalb der sequenzierten 5,2kb-Region) besteht. Es konnten keine auffälligen Unterschiede in dem hier analysierten Bereich des *Stf3'5'h*-Locus festgestellt werden, die eindeutig auf einen Zusammenhang mit der Knollenfärbung der betrachteten Kartoffelkultivare hindeuten.

3.2.1.3. *In silico*-Untersuchung transkriptionsregulatorischer Bereiche des *Stf3'5'h*-Locus hinsichtlich allelbezogener Unterschiede

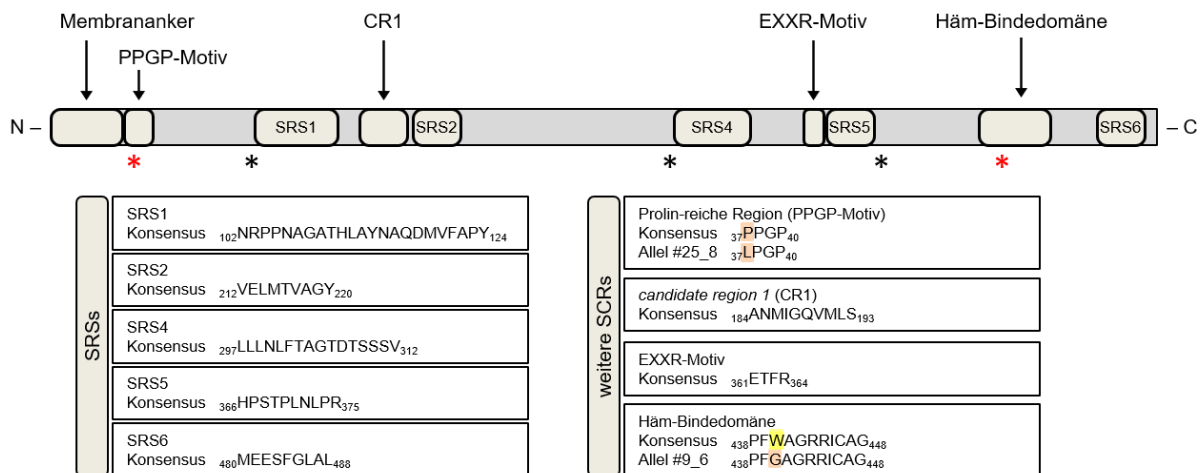
Die in die Sequenzanalyse integrierte 2kb-Region stromaufwärts des Startcodons beinhaltet neben der 5'-UTR (untranslatierte Region) vermutlich auch den Promotor des *Stf3'5'h*-Gens. In diesem nichtkodierenden, jedoch für die transkriptionelle Regulation wichtigen DNA-Bereich wurden deutlich mehr Sequenzunterschiede detektiert als in den proteinkodierenden Bereichen (Abb. 13, Appendix Abb. A5). Aus diesem Grund wurde die gesamte 2kb-Region auf Unterschiede hinsichtlich regulationsassoziiierter Motive untersucht. Dafür wurden die Webserver-Tools der Pflanzenpromotordatenbanken PlantCARE und PlantPAN genutzt. Mit Hilfe dieser Vorhersageprogramme konnte eine Reihe putativer DNA-Bindemotive ermittelt werden, darunter *cis*-wirksame Licht-, Hitze-, Trockenstress- und Hormon (Gibberellin, Salicylsäure) -responsive Elemente, die vor allem für die transkriptionelle Regulation im Sinne diverser Stressantwort- und Abwehrreaktionen von Bedeutung sind. Lediglich eine im Promotorbereich von Allel #58_5 (gelbknollige Kontrolllinie, NCBI-Akzession MN256431) detektierte 2bp-Deletion könnte einen Einfluss auf die Transkription dieses *Stf3'5'h*-Allels ausüben. Es handelt sich hierbei um das Fehlen eines Thymin- und eines Adeninnukleotids (TA) in einem möglicherweise für die Transkriptionsinitiation relevanten Sequenzabschnitt. Darüber hinaus konnten für die ermittelten putativen DNA-Bindemotive jedoch keine relevanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen festgestellt werden, die auf eine veränderte Regulation des *Stf3'5'h*-Gens hindeuten.

3.2.1.4. *In silico*-Analyse putativer, allelbezogener *StF3'5'H*-Proteinvarianten

Wie bereits unter 1.1.4.1. erwähnt können SNPs, die mit einem Aminosäureaustausch einhergehen, erheblichen Einfluss auf die *F3'5'H*-Enzymfunktion haben. Eine weitere *in silico*-Analyse sollte daher Aufschluss darüber geben, ob die insgesamt zehn ermittelten Unterschiede in den proteinkodierenden DNA-Sequenzen 30 verschiedener *Stf3'5'h*-Allele (Abb. 13, Appendix Tab. A2), innerhalb der fünf analysierten Genotypen, Auswirkungen auf die resultierenden *F3'5'H*-Proteinsequenzen und -strukturen haben könnten. Dafür wurden zunächst die DNA-Sequenzen in Proteinsequenzen übersetzt und putative Substraterkennungsstellen (SRSs, *substrate recognition sites*) sowie weitere für *F3'5'Hs* bekannte, strukturell konservierte Regionen (SCRs, *structural conserved regions*) mit postulierter Relevanz für Proteinstruktur und -funktion auf Polymorphismen untersucht.

Abbildung 14 a zeigt den schematischen Aufbau des *StF3'5'H*-Proteins mit Angabe der ermittelten, exakten Positionen und Sequenzen dieser konservierten Bereiche. Zudem sind die Aminosäuren (AS) angegeben, die von der Konsensussequenz (von Allel 1 (Appendix Abb. A6) abgeleitete Proteinsequenz (Abb. 14 b)) abweichen. Sieben der zehn auf DNA-Ebene ermittelten Sequenzunterschiede in proteinkodierenden Bereichen resultieren *in silico* in einer Veränderung dieser Proteinsequenz (Abb. 13 b und 14 c). Dazu zählen sechs SNPs in jeweils einzelnen Allelen der Linien #9 (#9_2, #9_5, #9_6), #16 (#16_3) und #25 (#25_2, #25_8) sowie die MITE-Insertion in Allel #9_3 (für entsprechende NCBI-Akzessionsnummern siehe Appendix Tab. A2). Demnach tragen fast alle modifizierten, hypothetischen Proteinsequenzen, mit Ausnahme der von Allel #9_3 abgeleiteten Sequenz, genau eine veränderte AS. Unterschiede in der Proteinsequenz gehen insbesondere aus Allelen der Linien #9 und #25 hervor, für die zudem eine höhere Frequenz an Sequenzunterschieden in nichtkodierenden DNA-Abschnitten des *f3'5'h*-Gens ermittelt wurde.

a



b

```

MALRISELF AALIYIIVHI IISKLIATVR ERGRRLLPPGP TGWPVIGALS LLGSMPHVAL 60
AKMAKKGPI MYLKVGTTCGM VVASTPNAAK AFLKTLDFIN SNRPPNAGAT HLAYNAQDMV 120
FAPYGPRWKL LRLKLSNSHML GSKALENWAN VRANELGHML KSMFDASHVG ECVVIADMLT 180
FAMANMIGQV MLSKRVEFEK GVEVNEFKNM VVELMTVAGY FNIGDFIPKL AWMDLQGIK 240
GMKSLHKKFD DLLTKMFNEH EATTYERKEN PDFLDVVMAN KDNSEGERLS TTNIKALLLN 300
LFTAGTDTSS SVIEWALAEM MKNPQIFKKV QEEMDQVIGK NRRLIESDIP NLPYLRAICK 360
ETFRKHPSTP LNLPRVSTEP CTVDGYYIPK NTRLSVNIWA IGRDPDVWEN PLEFNPERFL 420
SGKNAKIEPR GNDFELIPFW AGRRICAGTR MGIVMVEYIL GTLVHSFDWK LPNDVIDINM 480
EESFGLALQK AVPLEAMVTP RLSLDVYRC 509
    
```

c

Position variierender Aminosäuren

	AS 18	AS 19	AS 20	AS 21	AS 22	AS 23	AS 24	AS 25	AS 37	AS 99	AS 293	AS 340	AS 378	AS 440
Allel 1	V	H	I	I	I	S	K	L	P	N	N	K	T	W
#9_2	V	H	I	I	I	S	K	L	P	D	N	K	T	W
#9_3	L	P	L	S	Q	F	I	STOP						
#9_5	V	H	I	I	I	S	K	L	P	N	N	R	T	W
#9_6	V	H	I	I	I	S	K	L	P	N	N	K	T	G
#16_3	V	H	I	I	I	S	K	L	P	N	D	K	T	W
#25_2	V	H	I	I	I	S	K	L	P	N	N	K	I	W
#25_8	V	H	I	I	I	S	K	L	L	N	N	K	T	W

* * * * *

Chemie der Seitenketten	Aminosäuren
Aromatisch	Phenylalanin (F), Tryptophan (W), Tyrosin (Y)
Sauer (negative Ladung)	Aspartat (D), Glutamat (E)
Basisch (positive Ladung)	Arginin (R), Histidin (H), Lysin (K)
Unpolar (aliphatisch)	Alanin (A), Glycin (G), Isoleucin (I), Leucin (L), Methionin (M), Prolin (P), Valin (V)
Polar (neutral)	Cystein (C), Asparagin (N), Glutamin (Q), Serin (S), Threonin (T)

Abb. 14: Schematische Darstellung des aus 509 Aminosäuren bestehenden *Stf3'5'H*-Proteins (**a**) mit Konsensussequenz (**b**) und genauer Angabe von Position und Art allelbezogener Sequenzunterschiede (**c**). Beigefarbene Boxen im Proteinschema kennzeichnen SRSs (Substraterkennungsstellen) bzw. andere SCRs (strukturell konservierte Regionen). Deren in allen analysierten Linien konservierte Sequenzen (Konsensus) sowie allelbezogene, abweichende Sequenzen sind in darunter stehenden weißen Boxen angegeben. Die Konsensussequenz stellt die Aminosäuresequenz des vom konservierten Allel 1 (Appendix Abb. A6) abgeleiteten *Stf3'5'H*-Proteins dar. In der tabellarischen Listung sind von der Konsensussequenz abweichende Aminosäuren (AS) durch schwarze

Umrandungen hervorgehoben. Sternchen kennzeichnen veränderte AS mit möglichem Einfluss auf die Proteinstruktur, nahe einer SRS bzw. SCR (**schwarz*) oder innerhalb einer solchen konservierten, funktionalen Sequenz (**rot*). Bezeichnungen der Allele ergeben sich aus der jeweiligen Nummer (#) der analysierten Linie (Tab. 1 und Abb. 11) sowie der nach dem Unterstrich folgenden Nummer des jeweiligen linienspezifischen Allels.

Das aus der Translation der Nukleotidsequenz von Allel #9_3 resultierende Protein weist sieben von der Konsensussequenz verschiedene AS (AS 18-24) auf (Abb. 14 c). Diese gehen aus dem wohl deutlichsten Unterschied zwischen allen detektierten *f3'5'h*-Varianten hervor, der Insertion eines transponierbaren Elements im vorderen Drittel von Exon 1 (Abb. 13 b und Appendix Abb. A5), und befinden sich innerhalb der ersten 29 als Membrananker fungierenden AS (Abb. 14 a). In Folge eines Stopcodons, das sich in der DNA-Sequenz den 21 zu einer veränderten Proteinsequenz führenden Nukleotiden anschließt, sollte das *f3'5'h*-Allel #9_3 zu einem stark verkürzten Protein, bestehend aus nur 24 AS führen (NCBI-Akzession MN256405). Somit bedingt *in silico* die MITE-Insertion auch auf Proteinebene den signifikantesten Unterschied zwischen den putativen *StF3'5'H*-Varianten.

AS-Veränderungen die innerhalb oder in unmittelbarer Nähe der funktionellen Bereiche auftreten und solche, die zudem die Chemie der Seitenketten betreffen, könnten vermutlich einen stärkeren Einfluss auf Proteinstruktur und -funktion nehmen als die übrigen. Insgesamt konnten fünf AS-Veränderungen ermittelt werden, die diesen Kriterien entsprechen. Nur zwei davon befinden sich innerhalb der SCRs (Abb. 14 a). Dies betrifft zum einen den Austausch der AS Prolin (P) mit der ebenfalls aliphatischen AS Leucin (L) in der Prolin-reichen Region des aus Allel #25_8 (Abb. 13 b, Appendix Abb. A5) theoretisch hervorgehenden Proteins (Abb. 14 c). Zum anderen trifft dies auf den Austausch der aromatischen AS Tryptophan (W) gegen die unpolare AS Glycin (G) in der für die Häm-Bindung verantwortlichen Proteindomäne für #9_6 zu. In den SRSs wurden hingegen keine Unterschiede detektiert.

Um erste Hinweise zu erlangen ob die ermittelten Unterschiede in der *StF3'5'H*-Proteinsequenz einen Einfluss auf die Proteinstruktur zur Folge haben könnten, wurden für die hypothetischen Proteinvarianten 3D-Strukturmodelle erstellt. Dazu wurde der Proteinstruktur-Homologie-Modelling Server SWISS-MODEL genutzt (Waterhouse *et al.* 2018; <https://swissmodel.expasy.org>). Homologie-Modelling ist derzeit die akkurateste Methode zur Generierung zuverlässiger dreidimensionaler Proteinstrukturmodelle und verwendet experimentelle Proteinstrukturen (Vorlagen), um Modelle für evolutionär

verwandte Proteine (Zielproteine) zu erstellen. Anhand der Ergebnisse dieser *in silico*-Strukturanalyse konnte zunächst jedoch kein offensichtlicher Unterschied zwischen den erhaltenen Strukturmodellen festgestellt werden. Dies lässt vermuten, dass die ermittelten Veränderungen in den Aminosäuresequenzen der hypothetischen *StF3'5'H*-Enzyme keine Auswirkung auf deren strukturelle Beschaffenheit haben. Unabhängig davon, welches der Proteine letztlich *in planta* synthetisiert wird, scheint demnach in keiner der untersuchten Phänotypen eine Veränderung der Tertiärstruktur vorzuliegen. Letztlich ließe sich das aber nur nach experimenteller Überprüfung der einzelnen Proteinvarianten mit Sicherheit feststellen. Abbildung 15 zeigt die für sieben ermittelte, verschiedene *StF3'5'H*-Proteine gleichermaßen generierte dreidimensionale Struktur. Für die von Allel #9_3 abgeleitete Proteinsequenz konnte ein solches Strukturmodell nicht erstellt werden, da die Berechnung eine Minimalsequenz von 30 AS-Resten erfordert.

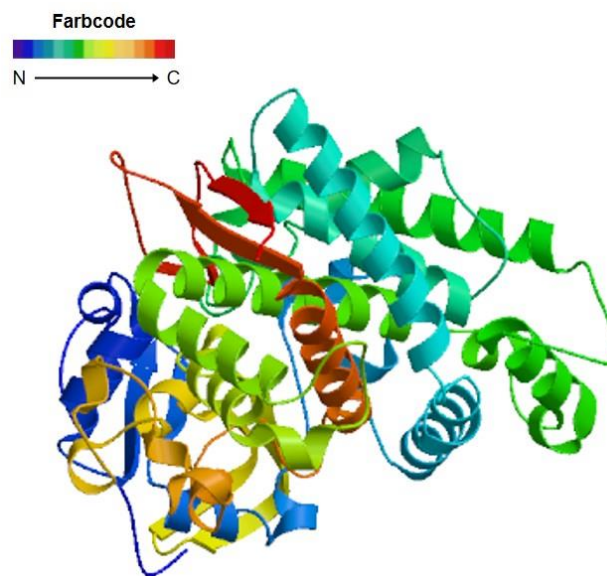


Abb. 15: Hypothetisches 3D-Strukturmodell des exemplarisch von Allel 1 abgeleiteten *StF3'5'H* Proteins. Der verwendete Farbcode von Blau über Grün und Gelb zu Rot entspricht der Aminosäureanordnung vom N-terminalen zum C-terminalen Proteinbereich [generiert mittels SWISS-MODEL Proteinstrukturmodellierung Server (Waterhouse *et al.* 2018; <https://swissmodel.expasy.org>)].

3.2.2. Bestimmung der Kopienzahl des *Stf3'5'h*-Gens in kontrastierenden Kartoffelknollenphänotypen

Für alle fünf untersuchten Kartoffelakzessionen wurden mehr als die aufgrund der Tetraploidie und des bisher nur einen bekannten Genlocus vermuteten vier *Stf3'5'h*-Allele identifiziert (siehe Abschnitt 3.2.1.). Dies kann mehrere Ursachen haben, z. B. Polymerase-Fehler während der Amplifikation des Locus oder bei der Sequenzierung. Es kann aber auch bedeuten, dass der *Stf3'5'h*-Locus mehr als einmal im Genom vorhanden ist, obwohl sich darauf in der Literatur und in der vorhanden (erst zu 86 % assemblierten) Genomsequenz (Potato Genome Sequencing Consortium 2011) bislang kein Hinweis findet. Daher wurden zur Abklärung dieser Frage Southern Blot-Analysen durchgeführt. Hierfür wurde die genomische DNA der fünf Akzessionen mit unterschiedlichen Kombinationen von Restriktionsenzymen, die sowohl einmalig innerhalb der sequenzierten 5,2 kb als auch außerhalb dieser spalten, enzymatisch hydrolysiert und geblottet. Anschließend wurde mit einer Sonde hybridisiert, deren Sequenz spezifisch für den *Stf3'5'h*-Locus ist.

Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse der Southern Blot-Analyse unter Verwendung der Enzymkombinationen *Bam*HI und *Nde*I (siehe auch Appendix Abb. A7). Zur Detektion wurde ein markiertes PCR-Produkt des *Stf3'5'h*-Allels 1 als Hybridisierungssonde eingesetzt, das aus einer ~0,5kb-Sequenz des 5'-Bereiches amplifiziert wurde. Die Detektion von mindestens zwei Banden, deutlich zu erkennen für mindestens eine Linie (Spur 3, Linie #25, blauschalig), könnte auf das Vorhandensein von mehr als nur einem *Stf3'5'h*-Genlocus hindeuten (Abb. 16). Dabei stimmt die untere Bande mit der erwarteten Länge von ~2,7 kb überein, die sich aus der hydrolytischen Spaltung der für Chromosom 11 bekannten Sequenz (Potato Genome Sequencing Consortium 2011) mit *Bam*HI und *Nde*I ergibt. Die obere Bande hingegen weist eine Länge von etwa 2,9 kb auf, was bedeuten könnte, dass es sich hier um das Signal für einen anderen *Stf3'5'h*-Genort handelt, an dem die entsprechenden Enzymschnittstellen anders gelegen sind als in dem bekannten *Stf3'5'h*-Locus auf Chromosom 11. Dies unterstützt die Ergebnisse der Allelsequenzierung, die mit einer Anzahl von mehr als vier detektierten Allelen pro Linie ebenfalls auf das Vorhandensein von mehr als einem *Stf3'5'h*-Genlocus hindeuten.

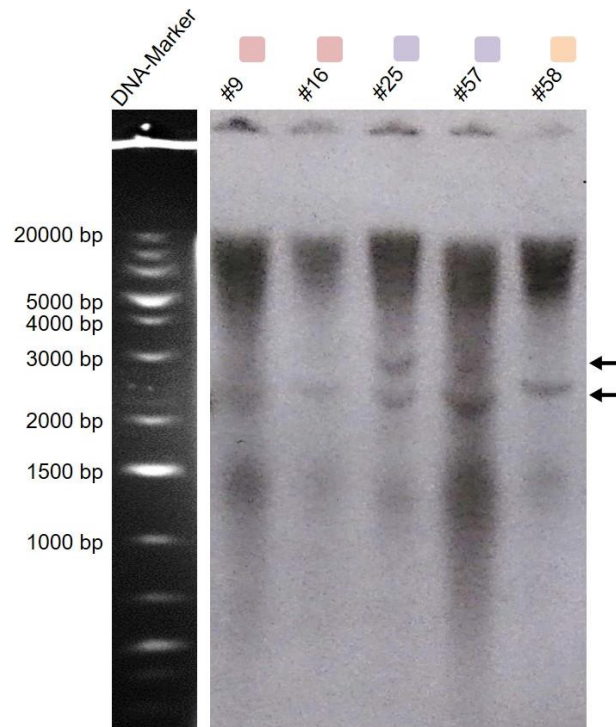


Abb. 16: Southern Blot-Analyse zur Ermittlung der Kopienzahl des *Stf3'5'h*-Locus für fünf Kartoffelgenotypen. Ausgewählt wurden nur Genotypen, deren *Stf3'5'h*-Sequenz inklusive allelischer Varianten in vorhergehenden Analysen bereits ermittelt wurde (#9, #16, #25, #57 und #58, siehe Abb. 11). Deren Befähigung zur Knollenpigmentierung wird durch entsprechend farbige Kästchen symbolisiert. Die Southern Blot-Analyse genomischer DNA, welche mit *Bam*HI und *Nde*I geschnitten und mit einem markierten PCR-Produkt des konservierten *Stf3'5'h*-Allels 1 hybridisiert wurde, zeigt das Auftreten von mindestens zwei Banden (schwarze Pfeile) für mindestens eine Linie und liefert Hinweise auf *Stf3'5'h*-Genkopien. Ein Ausschnitt des Agarosegels zeigt den parallel zu den Proben aufgetrennten DNA-Marker (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder, links) zum Größenabgleich chemilumineszent detektierter Fragmente im Röntgenfilm (rechts).

3.2.3. Nachweis quantitativer Unterschiede der *Stf3'5'h*-Transkriptexpression zwischen verschiedenen Kartoffelknollengeweben

Die vorangestellten Untersuchungen der *Stf3'5'h*-Genstruktur sowie eines Abschnittes der putativen Promotorregion dieses Gens (Abschnitt 3.2.1.) erbrachten keine größeren Unterschiede zwischen kontrastierenden Phänotypen, die eindeutig auf voneinander verschiedene regulatorische Mechanismen auf DNA-Ebene hindeuten. Dennoch könnte eine Vielzahl weiterer Faktoren eine Regulation auf genomischer Ebene bedingen und das *f3'5'h*-Transkriptlevel beeinflussen. Um im Rahmen dieser Arbeit zu überprüfen, ob in farblich kontrastierenden Knollengeweben eine differenzielle Regulation des *f3'5'h*-Gens auf

Transkriptebene stattfindet und quantitative Unterschiede in der Transkription des *Stf3'5'h*-Gens auftreten, wurde eine quantitative *real time* PCR (qRT-PCR) -Analyse durchgeführt.

3.2.3.1. Auswahl von repräsentativem Kartoffelknollenmaterial zur *Stf3'5'h*-Expressionsanalyse

Für die Analyse des *Stf3'5'h*-Transkriptlevels wurde erneut auf die fünf Linien #9, #16, #25, #57 und #58 zurückgegriffen, die hinsichtlich der Komposition und gewebespezifischen Akkumulation von Anthocyanen in den Knollenorganen stark voneinander variieren (Abb. 11). Um einen zuverlässigeren, möglichst aussagekräftigen Datensatz zu generieren, wurden zusätzlich zwei weitere Linien in die Analyse integriert, #2 und #49 (Abb. 17). Diese entsprechen mit vollständig rotem bzw. blauem Knollengewebe ebenso dem Kriterium größtmöglicher Varianz der vorherrschenden Anthocyanidintypen.

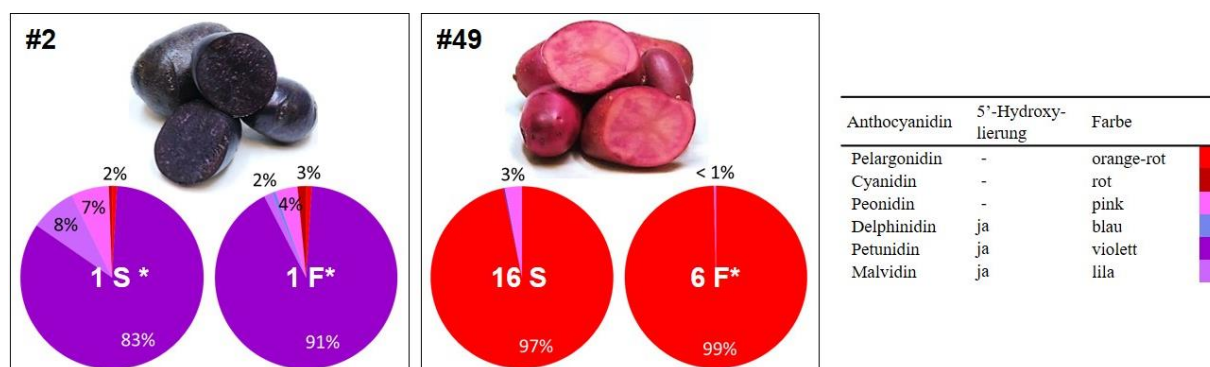


Abb. 17: Auswahl zweier Kartoffelakzessionen mit hoher Varianz in Anthocyankomposition und -akkumulierungsmuster im Knollengewebe zur Erweiterung des Sortimentes ausgewählter Genotypen für molekularbiologische Methodenansätze. Kreisdiagramme zeigen den relativen Gehalt an Anthocyaninderivaten für Knollenschale (S) und Knollenfleisch (F). Die prozentualen Werte ergeben sich aus Kalkulationen des MRM-Datensatzes. Die Abkürzungen für Kartoffelsorten bzw. -gewebe (Anthocyanprofilgruppen für S und F) entsprechen der Auflistung in Tabelle 1 und Appendix Abbildung A2. * Gewebe mit höchster Intensität des Profils innerhalb der jeweiligen Anthocyanprofilgruppe.

Aus Studien anderer Organismen wie beispielsweise Orchidee (*Phalaenopsis*) (Wang *et al.* 2006) und Eisenhut (*Aconitum*) (Ma *et al.* 2015) ist bereits bekannt, dass *f3'5'h*-Transkripte nicht zu jedem Zeitpunkt der Entwicklung nachweisbar sind. Diesen Studien zufolge ist das *f3'5'h*-Transkriptlevel in intermediären Entwicklungsstadien anthocyanhaltiger

Pflanzenorgane am höchsten. Für Kartoffelknollen liegen diesbezüglich bisher keine Erkenntnisse vor. Daher erfolgte des Weiteren die Auswahl dreier verschiedener Entwicklungsstadien für alle sieben Genotypen: junge Knollen unmittelbar nach Schluss des Bestandes (Stadium 1), ein intermediäres Entwicklungsstadium (Stadium 2) und ausgewachsene reife Knollen (Stadium 3) (Abb. 5 b und Abb. 18). Der direkte optische Vergleich der unterschiedlichen Knollenentwicklungsstadien, insbesondere für Linien mit blauen Anthocyanen und somit offensichtlich aktivem F3'5'H-Enzym, zeigt zunächst keinen Unterschied in der Farbintensität auf (Abb. 18).

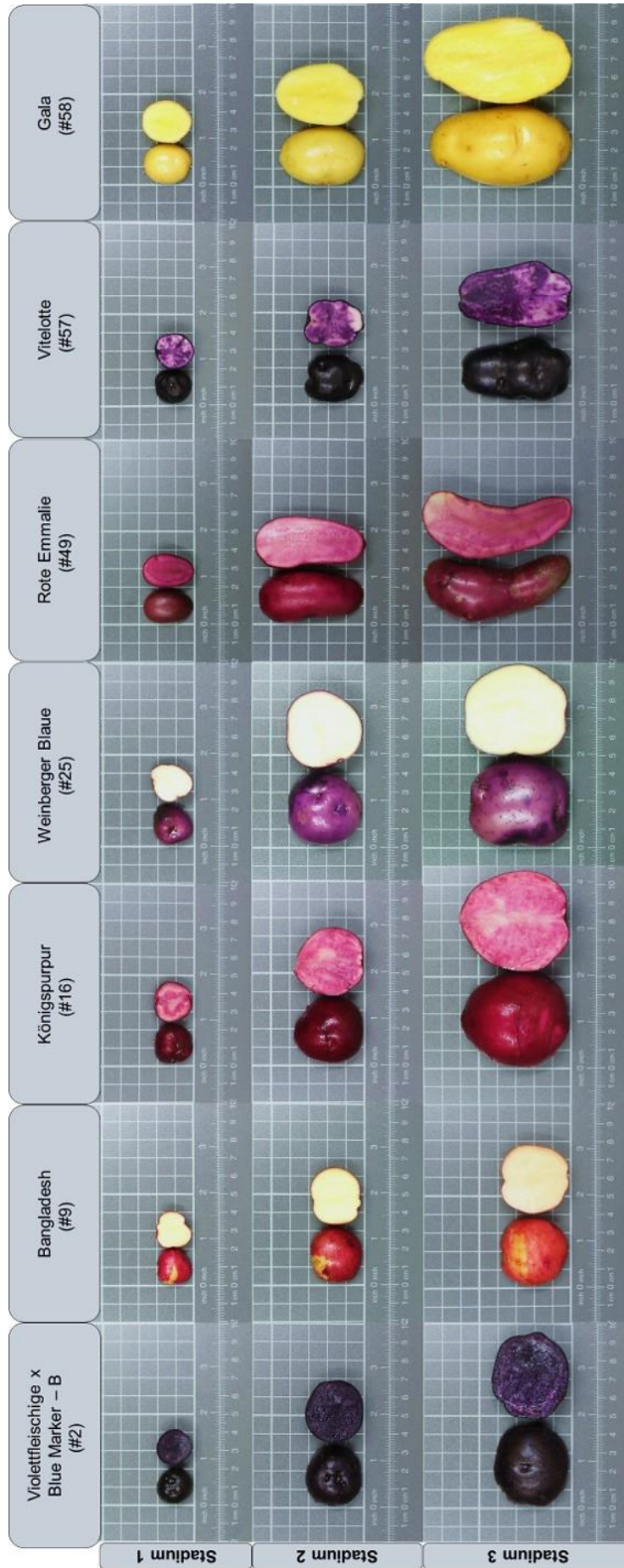


Abb. 18: Visuelle Analyse von Anthocyangehalt und -verteilung in Knollenschale (jeweils links) und Knollenfleisch (jeweils rechts) sieben repräsentativer Kartoffelkzessionen für drei Stadien der Entwicklung. Die Knollenentwicklung ist dokumentiert, von frisch gebildeten Knollen (*Stadium 1*, oben) über ein intermediäres Reifestadium (*Stadium 2*, mittig), bis hin zu ernte- und verzehrfreien Knollen (*Stadium 3*, unten). Das Stielende der halbierten Knollen ist jeweils nach oben ausgerichtet. Ein einzelnes Kästchen der hinterlegten Raster entspricht jeweils 1 cm².

3.2.3.2. Vergleichende, quantitative Expressionsanalyse des *Stf3'5'h*-Gens in sieben ausgewählten Kartoffelakzessionen mittels qRT-PCR

Für den methodischen Ansatz der quantitativen Expressionsanalyse mittels qRT-PCR erfolgte zunächst die Extraktion von Gesamt-RNA aus beiden Knollengeweben, Fleisch und Schale, der repräsentativen Kartoffelinien. Um die Präzision dieser sensitiven Nachweismethode spezifischer Transkripte zu gewährleisten, wurde die Integrität der RNA mittels Agarosegelelektrophorese überprüft (Abb. 19). Nur Proben von entsprechend hoher Qualität wurden für die Synthese von cDNA (Reverse Transkription) als Matrize für die anschließende qRT-PCR eingesetzt.

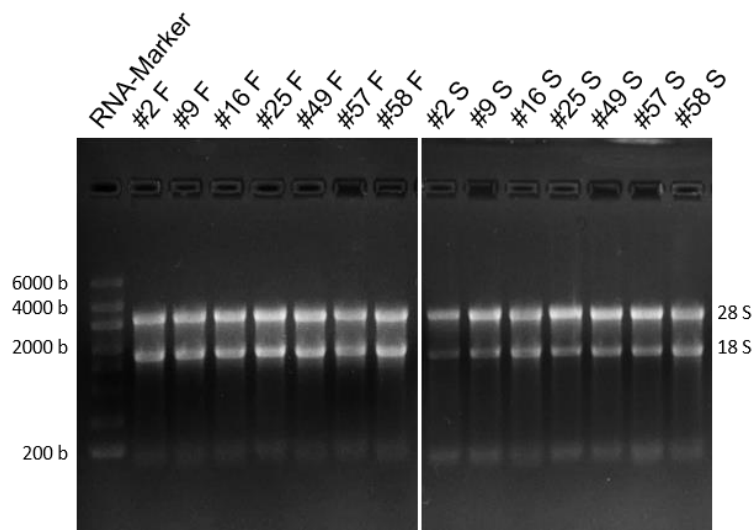


Abb. 19: Gelelektrophoretische Überprüfung der RNA-Integrität. 1% Agarose-Formaldehydgel mit 3 µg RNA aus Knollenfleisch- (links, F) und Knollenschalenproben (rechts, S) pro Spur, exemplarisch für ein Replikat des frühen Knollenentwicklungsstadiums (Stadium 1) sieben ausgewählter Kartoffelakzessionen (Nummerierung # entsprechend Tab. 1). Die Elektrophorese zeigt die Auflösung der 28S und 18S rRNA in Form von Banden, als Zeichen für intakte RNA. RNA-Marker: RiboRuler™ High Range RNA Ladder.

Für die PCR-basierte Analyse des *Stf3'5'h*-Gentranskriptes wurde ein Primerpaar (siehe Abschnitt 2.3.5.2. und 2.3.5.3.) verwendet, das nicht allelspezifisch an die Zielsequenz bindet, sodass die Gesamtheit aller *Stf3'5'h*-Transkripte erfasst werden konnte. Die Transkriptanalysen wurden, in Form von biologischen Replikaten für jedes Entwicklungsstadium, dreimal wiederholt (Abb. 5 a). Abbildung 20 zeigt die Ergebnisse dieser Analysen exemplarisch für das erste biologische Replikat. Die Ergebnisse aller Replikate im Vergleich sind in Appendix Abbildung A8 dargestellt.

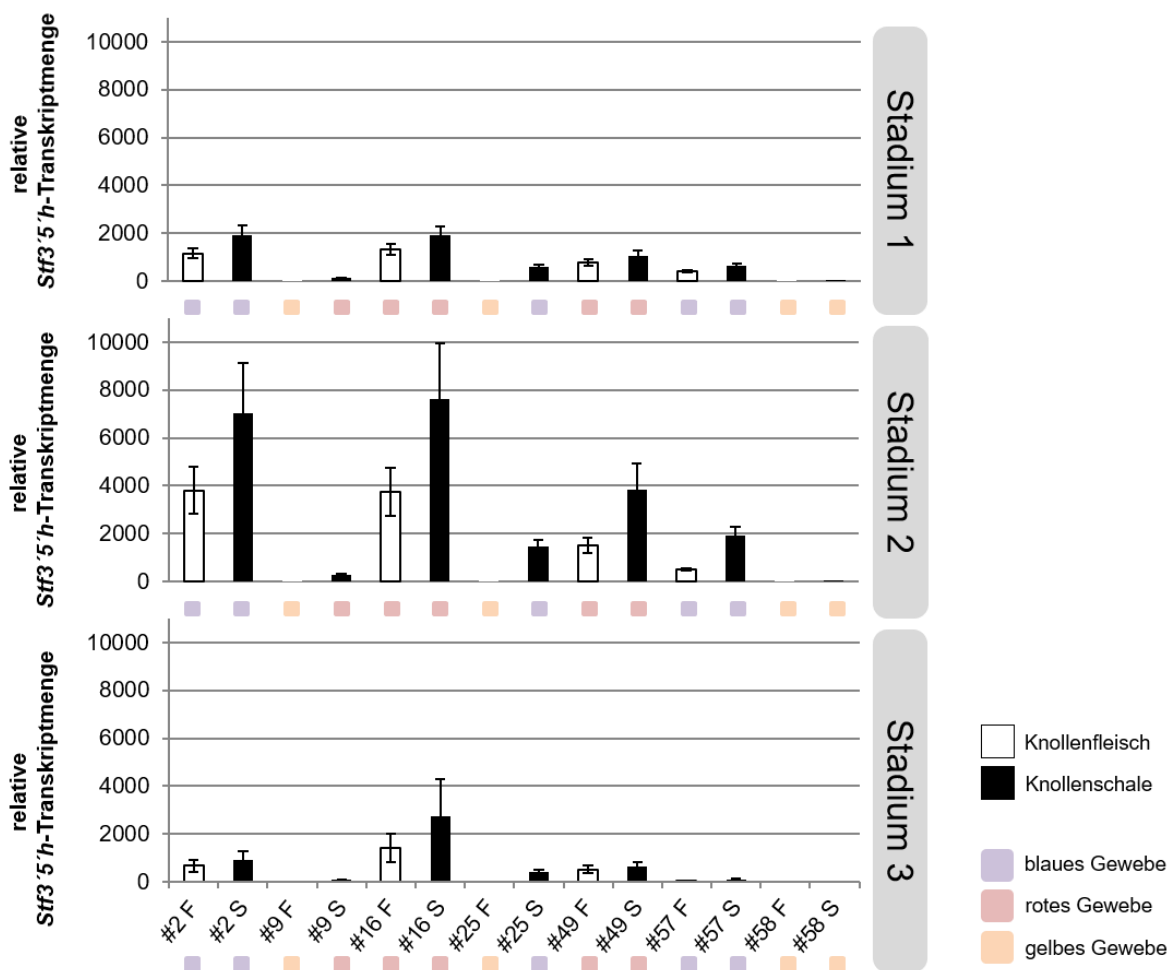


Abb. 20: Relative Abundanz des *Stf3 5' h*-Transkriptes in Knollengeweben (Fleisch, *F*; Schale, *S*) sieben ausgewählter Kartoffelgenotypen während drei verschiedener Entwicklungsstadien (1: junge Knollen nach Bestandschluss, 2: mittlere Knollengröße, 3: erntereife Knollen, entsprechend Abb. 5 b und Abb. 18). Alle Proben wurden aus Knollen von jeweils vier Pflanzen pro Anbau gepoolt. Fehlerbalken repräsentieren die Standardfehler (\pm SE) der relativen Transkriptmengen. Die Berechnung der Größe dieser Fehlerbalken schließt alle relevanten Fehler ein: Variabilität technischer Replikate (\pm SD ($n=3$)), Unsicherheit der geschätzten Amplifikationseffizienzen, Fehler der Normalisierungsfaktoren (Referenzgene, IRC). Die Daten wurden normalisiert zu den Referenzgenen *efl*, *L2* und *aprt*. Berechnungen erfolgten mittels qBase+ 2.3 (Vandesompele *et al.* 2002; Hellemans *et al.* 2007). Die Darstellung der Werte entspricht deren linearer Skalierung zur „Kontrollgruppe“ (gelbes Gewebe). Den Liniennummern (#) entsprechende Sortennamen sind Tabelle 1 zu entnehmen.

Für sämtliche analysierte anthocyanhaltige Linien bzw. Gewebe konnte ein starker Unterschied im *Stf3 5' h*-Transkriptlevel zwischen den verschiedenen Entwicklungsphasen festgestellt werden (Abb. 20). Während die *Stf3 5' h*-Transkriptmengen in sehr jungen und in reifen Knollen gleichermaßen eine relativ geringe Abundanz zeigten, wurden für das intermediäre zweite Entwicklungsstadium deutlich höhere und stabile Werte ermittelt (siehe auch Appendix Abb. A8). Daher wurde im Folgenden das Augenmerk auf die Analyse der für

Stadium 2 erhobenen Daten gelegt. Die Betrachtung dieser Werte zeigt zunächst eindeutig, dass sämtliche analysierten gelben Gewebe (ohne Anthocyane) keine Expression des *Stf3'5'h*-Gens aufweisen (#9 F, #25 F, #58 F und S). Ein weiterer deutlicher Unterschied ist für vollständig pigmentierte Phänotypen zwischen den Werten beider Gewebetypen derselben Linie zu erkennen. So weisen die Knollenschalen, im Vergleich zu den zugehörigen Knollenfleischproben, durchgängig etwa die doppelte Transkriptmenge auf.

Die *Stf3'5'h*-Expressionsanalyse erbrachte keine offensichtlichen Unterschiede zwischen blauen und roten Geweben, die auf eine differenzielle phänotypspezifische Regulation der F3'5'H auf Transkriptebene hindeuten könnten. Dabei ist zu beachten, dass Varianzen im *Stf3'5'h*-Transkriptlevel anthocyanhaltiger Gewebe annähernd mit den Unterschieden zwischen deren jeweiligem Gesamtanthocyanengehalt (Appendix Abb. A9) korrelieren und wie dieser vermutlich linienspezifisch sind.

Alle Beobachtungen konnten durch Wiederholungen der Analyse in Form biologischer Replikate bestätigt werden (Appendix Abb. A8). Mit Ausnahme zweier, vom allgemeinen Trend abweichender Werte (Stadium 2, Replikat 3, Linie #2, Fleisch und Schale) besteht eine Konformität zwischen den jeweiligen Replikaten, was die Reproduzierbarkeit der Analyse veranschaulicht. Schwankungen zwischen den Werten der Replikate gehen v. a. auf die Sensitivität der Messmethode und die Komplexität der zur Berechnung verwendeten Algorithmen zurück (Bustin *et al.* 2009).

3.2.4. Nachweis des *StF3'5'H*-Proteins in verschiedenfarbigen Knollengeweben ausgewählter Kartoffellinien

Um die vorangegangenen Analysen zur Regulation des *Stf3'5'h*-Gens auf DNA- (Abschnitt 3.2.1. und 3.2.2.) und Transkriptebene (Abschnitt 3.2.3.) zu ergänzen, wurde im weiteren Verlauf der Arbeit auch eine mögliche Regulation der F3'5'H auf Proteinebene untersucht. Diese könnte in unterschiedlichen Mengen des Enzyms resultieren und so direkt die phänotypische Diversität bedingen. Um das zu prüfen wurden verschiedene Ansätze verfolgt: der immunologische (Abschnitt 3.2.4.1.) und der LC-MS-basierte Nachweis des *StF3'5'H*-Proteins (Abschnitt 3.2.4.2.) in repräsentativen, verschiedenfarbigen Knollengeweben.

3.2.4.1. Immunodetektion des *StF3'5'H*-Proteins mittels Western Blot-Analyse

Der Western Blot (Immunoblot) ist eine gängige und schnelle Methode zum Nachweis bestimmter Proteine in Proteinextrakten mit Hilfe spezifischer Antikörper. Antikörper, die sich gezielt gegen die *F3'5'H* richten, sind jedoch derzeit noch nicht kommerziell erhältlich. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte daher zunächst versucht werden, einen *StF3'5'H*-spezifischen Antikörper zu generieren, der für den Nachweis des Proteins in verschiedenen Kartoffelknollengeweben (Fleisch und Schale) eingesetzt werden kann.

Da es sich bei der *F3'5'H* um ein membrangebundenes Enzym der weitverbreiteten und stark konservierten Klasse der Cytochrom-P450-Proteine (Unterfamilie CYP75A) handelt, fiel die Wahl auf die Generierung eines Peptidantikörpers. So sollte durch die Auswahl eines für die *StF3'5'H* einzigartigen Peptides eine möglichst hohe Bindungsspezifität des Antikörpers erzielt werden. Um eine effiziente Bindung zu gewährleisten, wurde eine zugängliche, cytosolische Region des Proteins im C-terminalen Bereich gewählt (Abb. 21).

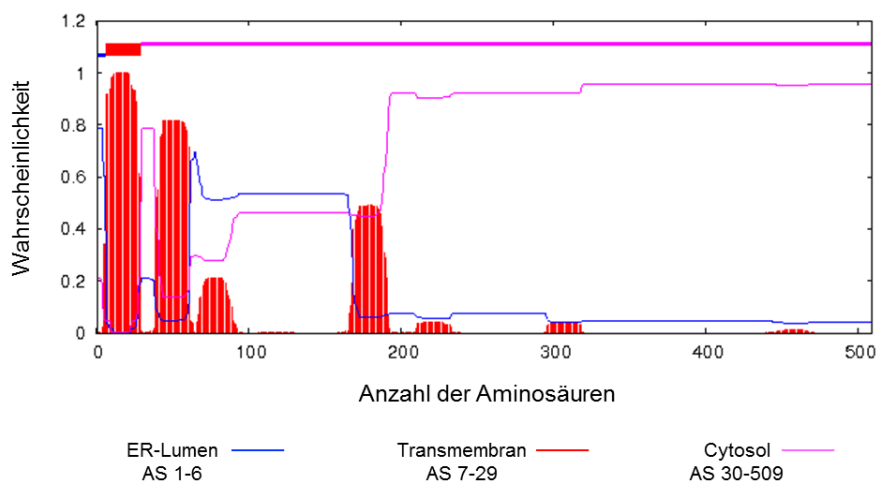


Abb. 21: Vorhersage transmembraner Helices in *StF3'5'H*. Graphik erstellt mittels TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

Um Kreuzreaktionen des Antikörpers mit sequenzähnlichen Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenasen zu vermeiden (insbesondere mit der *F3'H*, mit ähnlichem Molekulargewicht von ~57 kDa), wurde die ausgewählte Sequenz (Abb. 22 a) einer BLAST-Analyse unterzogen. Diese bestätigte die *F3'5'H*-Spezifität, sowie die Konservierung der Peptidsequenz innerhalb der Familie der Solanaceae (Abb. 22 b).

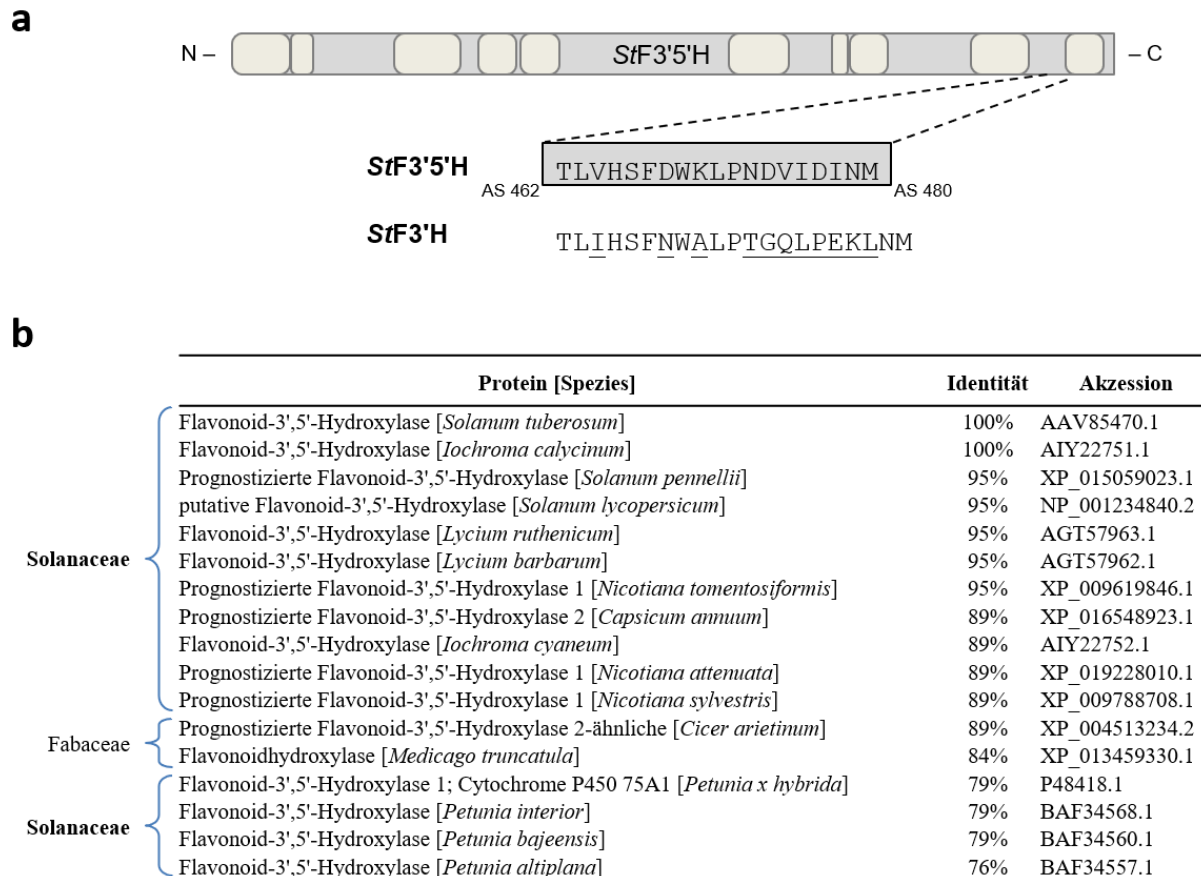


Abb. 22: Aminosäuresequenz des StF3'5'H-Peptides zur Generierung eines spezifischen Antikörpers (a) und Validierung der Sequenzspezifität (b). Die ausgewählte StF3'5'H-Peptidsequenz zeigt die minimal mögliche Übereinstimmung zu der entsprechenden homologen Sequenz der verwandten StF3'H (NCBI-Akzessionen XP_006345132.1) in dem zur Peptidsynthese geeignetsten Bereich. Die von der F3'5'H abweichenden Aminosäuren sind unterstrichen. Das zur positionellen Orientierung des Peptides schematisierte Protein ist an Abbildung 14 a angelehnt. Ergebnisse einer BLAST-Analyse offenbaren die Konservierung der für das Peptidantikörperdesign ausgewählten StF3'5'H-Aminosäuresequenz innerhalb der Familie der Solanaceae (durchgeführt mittels NCBI Tool zum Proteinsequenzvergleich).

Das so ausgewählte Peptid wurde für die Herstellung polyklonaler Antiseren (Abschnitt 2.4.5., Gewinnung von Antiseren aus Kaninchen) verwendet. Diese wurden mittels Western Blot-Analysen anhand repräsentativer Proteinproben auf Effizienz und Spezifität bei der Bindung der StF3'5'H geprüft. Gemäß berechneter Molekülmasse wurde dabei ein Signal bei ~57 kDa erwartet. Voruntersuchungen blauer Knollengewebe mit sichtbarer F3'5'H-Aktivität erbrachten ein deutliches Signal für ein Protein etwa in diesem Bereich, bei etwa 53 kDa. Dabei zeigte sich jedoch auch, dass das Signal bei Verwendung von Schalenproteinextrakt trotz gegenteiliger Metabolitdaten deutlich schwächer war als bei Verwendung von Proteinextrakt aus Knollenfleisch. Möglicherweise besteht eine Beeinträchtigung des

immunologischen *StF3'5'H*-Nachweises in Proteinextrakten aus Kartoffelknollenschale. Weitere Voruntersuchungen zeigten, dass mikrosomale Proteinpräparate, in denen ER-Membran-assoziierte Proteine wie die *F3'5'H* angereichert vorliegen, eine deutlich höhere Signalintensität gewährleisten als Gesamtproteinextrakte. Zudem offenbarte sich die bessere Eignung von Proteinextrakten aus frischem, im Vergleich zu gefriergetrocknetem Knollenmaterial. Entsprechend dieser Erkenntnisse erfolgte der Western Blot-basierte *StF3'5'H*-Nachweis anhand des am besten dafür geeigneten Probenmaterials zunächst für drei exemplarisch gewählte Kartoffelkultivare (Abb. 23). Dafür wurde je eine Linie mit vollständig blau-violetten (#57, „Vitelotte“), roten (#16, „Königspurpur“) bzw. gelben (#58, „Gala“) Knollen ausgewählt (siehe Abb. 11). Letztere wies in den zuvor durchgeführten Expressionsstudien keinerlei *f3'5'h*-Transkriptabundanz auf (Abb. 20) und sollte nun als Negativkontrolle in methodischen Ansätzen zur Detektion des *StF3'5'H*-Proteins dienen. Unerwartet lieferte jedoch auch diese Negativkontrolle ein Signal auf Höhe der für die *StF3'5'H* angenommenen molekularen Masse von ~53 kDa im Western Blot (Abb. 23). Dies deutet darauf hin, dass es sich bei dem hier detektierten Protein wahrscheinlich nicht, oder nicht ausschließlich, wie zuvor vermutet um die *StF3'5'H* handelt. Zudem wurde ein unspezifisches Signal bei etwa 70 kDa detektiert, mit derselben Uniformität des Bandenmusters für alle drei, farblich kontrastierenden Gewebe. Somit scheint der hier generierte Antikörper nicht die erhoffte Spezifität aufzuweisen und ist daher für den gezielten Nachweis der *StF3'5'H* in Kartoffelknollengewebe ungeeignet.

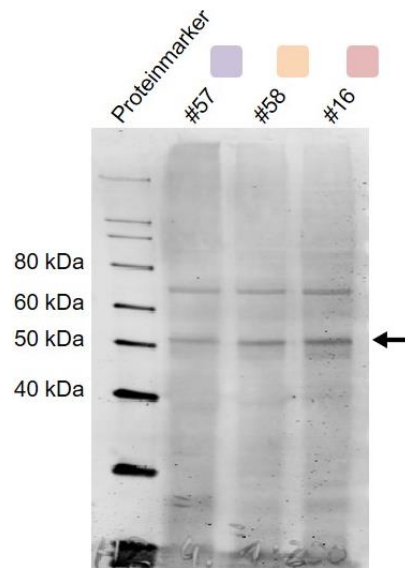


Abb. 23: Ergebnis der Western Blot-Analyse zum Nachweis der *StF3'5'H* in farblich kontrastierenden Kartoffelknollengeweben. Verwendet wurde das Antiserum nach vierter Immunisierung des Testkaninchens. Ein schwarzer Pfeil markiert die Position des putativen Signals für das *F3'5'H*-Protein bei ~53 kDa. Neben dem Proteinextrakt einer repräsentativen blauen Knollenprobe (#57, „Vitelotte“) mit bestätigter *F3'5'H*-Aktivität zeigen auch Proteinextrakte einer roten (#16, „Königspurpur“) und einer gelben (#58, „Gala“; Negativkontrolle, da kein *f3'5'h*-Transkript) Knollenprobe vergleichbare *F3'5'H*-Mengen. Beladung der Spuren entspricht jeweils 15 µg mikrosomalem Protein aus frischem Knollenfleisch. Das Antiserum wurde in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt. Proteinmarker: MagicMark™ XP Western Protein Standard.

3.2.4.2. LC-MS-basierter Nachweis der *StF3'5'H* in blau-violetterm und rotem

Kartoffelknollengewebe

Anhand der zuvor beschriebenen Western Blot-Analyse (Abschnitt 3.2.4.1.) gelang es nicht, die *StF3'5'H* in Kartoffelknollenmaterial zweifelsfrei nachzuweisen. Zum Vergleich der *F3'5'H*-Abundanzen in Knollengewebe mit unterschiedlicher Anthocyankomposition wurde daher auf sensitivere LC-MS-basierte Methoden zurückgegriffen.

Zur verbesserten Detektion von Proteinen während der LC-MS-Messung, insbesondere bei der Analyse von Enzymen des Sekundärmetabolismus mit relativ geringer Abundanz, ist eine vorangestellte Anreicherung der Proteine von Vorteil. Im Fall der *StF3'5'H* als ER-Membran-gebundenes Protein wurde eine solche Konzentrierung durch die Extraktion der mikrosomalen Fraktion von Zellen aus frischem Kartoffelknollengewebe anhand der Entfernung der höher abundanten löslichen Proteine mittels Ultrazentrifugation erzielt. Der Erfolg der Anreicherung von Membranproteinen wurde durch eine nicht-zielgerichtete

(*untargeted*) LC-MS-Analyse der Mikrosomenfraktion und der automatisierten, funktionellen Annotation des erhobenen Proteinsequenzdatensatzes mittels Blast2GO Software bestätigt.

Für die hier durchgeführten LC-MS-basierten Analysen des *StF3'5'H*-Proteins wurden dieselben drei mikrosomalen Präparate aus dem verschiedenfarbigen Knollengewebe (Fleisch, intermediäres Knollenentwicklungsstadium) der Kartoffellinien #57 („Vitelotte“, blau-violett), #16 („Königspurpur“, rot) und #58 („Gala“, gelb) wie für den methodischen Ansatz des immunologischen Nachweises (siehe Abschnitt 3.2.4.1.) verwendet. Zunächst wurde versucht die *StF3'5'H* mittels direkter LC-MS-Analyse der frischen Mikrosomenextrakte zu detektieren. Dies war jedoch, vermutlich aufgrund zu geringer Abundanz des Proteins in den Extrakten, nicht möglich. Daher wurde anschließend eine ebenfalls LC-MS-basierte Analyse des bereits in einem Proteingel fokussierten Analyten angewandt. Um die Komplexität der Proben weiter zu verringern und eine zielgerichtete Form der Analyse zu ermöglichen, wurden die isolierten mikrosomalen Proteine zunächst mittels 1-D SDS-PAGE nach deren Molekülmasse separiert. Anschließend wurde für jede Probe nur der Bereich des Gels ausgeschnitten, in welchem Proteine mit einer molekularen Masse von etwa 48-62 kDa aufgetrennt wurden (Abb. 24 a). Diese Gelstücke sollten die *F3'5'H* mit einer berechneten Molekülmasse von ~57 kDa beinhalten. Es wurde darauf geachtet, später nachvollziehen zu können welcher Laufhöhe im Gel bzw. welcher Molekülmasse detektierte Proteine zuzuordnen sind. Daher wurde vor der LC-MS ein jedes der drei Gelstücke (eins pro Linie) der Breite nach (horizontal) in sieben etwa gleich große Streifen geschnitten, welche dann separat analysiert wurden. Ausgewählte Ergebnisse der LC-MS-Untersuchungen dieser Gelbanden sind in Abbildung 24 zusammengefasst.

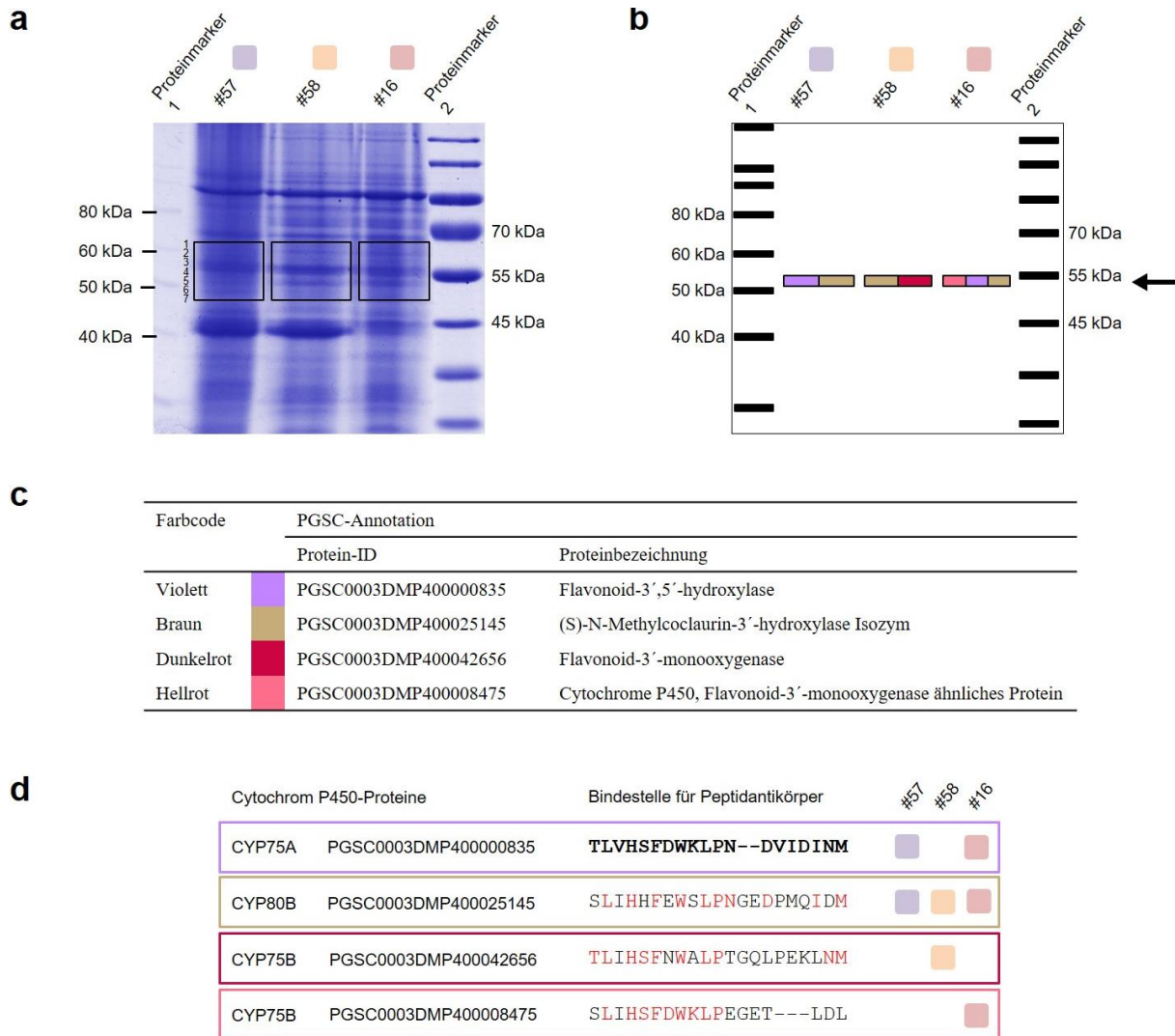


Abb. 24: LC-MS-basierte Detektion der *StF3'5'H* in blauem und rotem Kartoffelknollengewebe nach Konzentrierung des Analyten mittels SDS-PAGE. Mikrosomale Proteinpräparate aus Knollengewebe (intermediäres Entwicklungsstadium) der drei Kartoffellinien „Vitelotte“ (#57, blauviolett), „Königspurpur“ (#16, rot) und „Gala“ (#58, gelb) wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel (**a**) elektrophoretisch getrennt (jeweils 15 µg Protein). Im Proteingel sind die Gelbereiche (aufgeteilt in jeweils sieben Gelstücke) markiert, die nachfolgend mittels LC-MS auf die Präsenz der *StF3'5'H* (~57 kDa) untersucht wurden. Die schematische Darstellung der Detektionsbereiche der *StF3'5'H* (violette Banden) und weiterer mikrosomaler Proteine (braune, dunkelrote und hellrote Banden) bei ~53 kDa (**b**) und deren Annotation (**c**) zeigen eine Korrelation zum Ergebnis des *StF3'5'H*-Immunoblots (siehe Abb. 23) (**d**). Ein schwarzer Pfeil im Proteingelschema markiert die Position des Signals im Western Blot bei ~53 kDa und korreliert mit dem Bereich der LC-MS-basierten Detektion diverser Cytochrom-P450-Enzyme im Proteingel. Diese weisen bis zu 50 % Ähnlichkeit (*rote* Schrift) in der Peptidsequenz auf, welche zur *StF3'5'H*-Antikörpersynthese verwendet wurde (*fette* Schrift) und lieferten falsch-positive Signale im Western Blot. Proteinmarker 1: MagicMark™ XP Western Protein Standard; Proteinmarker 2: PageRuler™ Prestained Protein Ladder. Annotationen und Sequenzvergleiche erfolgten anhand der Datenbankeinträge des *Potato Genome Sequencing Consortium* (PGSC) mittels Mascot Suchmaschinensoftware (Version 2.5.1).

Mittels LC-MS-Analyse einzelner Proteingelfragmente wurde die *StF3'5'H* in blau-violetter und in rotem Kartoffelknollengewebe jeweils anhand zweier für dieses Protein spezifischer Peptide nachgewiesen (Abbildung 24 b und c). In Übereinstimmung mit den ermittelten relativen *Stf3'5'h*-Transkriptmengen (siehe Abb. 20) wurde in gelbem Knollengewebe kein *StF3'5'H*-Protein detektiert. Eine Quantifizierung der *StF3'5'H* in den verschiedenfarbigen Geweben ist mit dieser Methode nicht möglich. Anhand der hier erhobenen Daten kann somit nicht auf einen Regulationsmechanismus auf Ebene der Translation des *F3'5'H*-Proteins geschlossen werden.

Das *F3'5'H*-Protein konnte tatsächlich in dem Gelbereich bei ~53 kDa detektiert werden (Abb. 24 b), in welchem auch bei der zuvor angewandten immunologischen Nachweismethode ein Signal festgestellt wurde (Abb. 23). Allerdings wurden in eben diesem Bereich zusätzlich weitere Cytochrom-P450-Enzyme mit vermeintlicher 3'-Hydroxylasefunktion identifiziert (Abb. 24 b und c), welche vermutlich ebenfalls ein Signal im Western Blot hervorgerufen haben. Diese CYP-Proteine, darunter die *F3'H*, weisen bis zu 50 % Ähnlichkeit in der Peptidsequenz auf, die zur *StF3'5'H*-Antikörpersynthese verwendet wurde (Abb. 24 d). Diese Homologie ist scheinbar ausreichend für einen gewissen Grad der Bindung des *StF3'5'H*-Peptidantikörpers und führte daher bei Probe #16 F und #57 F wahrscheinlich zu einer Überlagerung und Addition der Signalintensitäten für *F3'5'H* und eines oder mehrerer anderer CYP-Proteine während der *StF3'5'H*-Immunodetektion. Im Fall der gelben Probe #58 F kam es dabei sogar zur Detektion eines gänzlich falsch-positiven Signals. Somit lieferte die hier angewandte Methode der LC-MS mit vorangestellter SDS-PAGE neben dem Nachweis der *StF3'5'H* zusätzliche Hinweise auf die im Immunoblot für alle drei Kartoffellinien detektierte Proteinbande bei etwa 53 kDa.

3.2.5. Identifizierung von Proteinen mit unterschiedlicher Beteiligung an

Anthocyanbiosynthese oder -akkumulation in verschiedenfarbigen Kartoffelknollen

Die direkte LC-MS-Untersuchung der mikrosomalen Proteinfraction aus verschiedenfarbigen Knollengeweben der Linien #57, #16 und #58 (siehe Abschnitt 3.2.4.2.) eignete sich nicht zur *F3'5'H*-Detektion. Allerdings wies diese Analyse auf weitere möglicherweise am Anthocyanmetabolismus beteiligte Proteine mit potenziell unterschiedlicher Relevanz in farblich kontrastierenden Kartoffelknollengeweben hin. Die LC-MS-Daten wurden daher

genutzt um einen Überblick eventueller Mechanismen der indirekten Regulation der *StF3'5'H*-Aktivität auf Proteinebene zu schaffen.

Von insgesamt 687 in den mikrosomalen Extrakten detektierten Proteinen wurden 386 als signifikant (mindestens zwei spezifische Peptide, ANOVA-Werte von $P < 0,05$ und eine mindestens 1,5-fache Proteinabundanz gegenüber einer der Vergleichsproben) identifiziert und quantifiziert (siehe Abschnitt 2.4.6., *Analyse der LC/MS-Datensätze und Proteinannotation*). Bei der Auswertung des Datensatzes wurde das Augenmerk zum einen auf diejenigen Proteine gelegt, die eine höhere Abundanz in anthocyanhaltigem als in anthocyanfreiem Gewebe aufweisen. Zum anderen wurde nach Proteinen gesucht, die in rotem und blau-violettem Knollengewebe unterschiedlich abundant und somit eventuell an der Synthese verschiedener Anthocyantypen und an der Farbgebung beteiligt sind. Darunter finden sich größtenteils Schlüsselenzyme mit direkter Beteiligung an der Anthocyanbiosynthese sowie die Seitenkettendekoration katalysierende Anthocyanacyl-, -glycosyl- und -methyltransferasen. Desweiteren wurden einige Proteine identifiziert, die am Transport der Anthocyane und deren Akkumulation in der Vakuole beteiligt sein könnten. Einige dieser Proteine, deren erhöhte Menge in Korrelation mit der Anthocyanpigmentierung zu stehen scheint, sind in Tabelle 6 nach vorherrschendem Anthocyantyp aufgelistet.

PGSC-Annotation Protein-ID	Proteinbezeichnung	Putative Assoziation mit Anthocyanbiosynthese/-akkumulation	Höchste Abundanz	Niedrigste Abundanz	Vervielfältigungsfaktor niedrigste zu höchster Abundanz	Korrelation (X) mit	
						blauen Anthocyanen	roten Anthocyanen
PGSC0003DMP400020663	Chalkonismomerase	Anthocyaninsynthese	#57	#58	12,1		X
PGSC0003DMP400028119	Anthocyanacyltransferase	Anthocyanacylierung (Synthese)	#57	#58	4,1		X
PGSC0003DMP400046726	Fructokinase	Saccharosemetabolismus, Zuckersensor	#57	#58	3,8	X	
PGSC0003DMP400006359	Flavanon-3-hydroxylase	Anthocyaninsynthese	#57	#58	3,6		X
PGSC0003DMP400005220	Saccharosesynthase	saccharosepezifische Induktion der Anthocyanbiosynthese	#57	#58	3,5		X
PGSC0003DMP400039420	UDP-L-Rhamnosyltransferase	Synthese von UDP-Rhamnose (Anthocyanacylierung)	#57	#58	2,8		X
PGSC0003DMP400008079	Anthocyan-5-O-glycosyltransferase	Anthocyanacylierung (Synthese)	#57	#58	2,5		X
PGSC0003DMP400032951	Polyphenoloxidase	Anthocyanandegradation	#57	#58	2,3		X
PGSC0003DMP400030463	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase	Anthocyanakkumulation	#57	#58	2,2		X
PGSC0003DMP400042192	vakuoläre H ⁺ -ATPase, Untereinheit G1	Anthocyantransport in Vakuole	#57	#58	2,0	X	
PGSC0003DMP400006101	vakuoläre H ⁺ -ATPase, Untereinheit B2	Anthocyantransport in Vakuole	#57	#58	2,0	X	
PGSC0003DMP400010344	vakuoläre H ⁺ -ATPase, Untereinheit E	Anthocyantransport in Vakuole	#57	#58	2,0	X	
PGSC0003DMP400004786	Fructosebiphosphataldolase	Glucoseogenese (Bereitstellung von Glukose)	#57	#58	1,8		X
PGSC0003DMP400050495	vakuoläre H ⁺ -ATPase, Untereinheit D	Anthocyantransport in Vakuole	#57	#58	1,8	X	
PGSC0003DMP400011444	Anthocyan-O-methyltransferase	Anthocyanmethylierung (Synthese)	#16	#58	7,1		X
PGSC0003DMP400039432	Anthocyanidinsynthase	Anthocyanidinsynthese	#16	#58	4,1		X
PGSC0003DMP400006441	Dihydroflavonol-4-reduktase	Anthocyantransport in Vakuole	#16	#58	2,3		X
PGSC0003DMP400042123	Anthocyanidin-3-O-glycosyltransferase	Anthocyaninsynthese	#16	#58	2,2		X
PGSC0003DMP400040501	Dehydroascorbatreduktase	Anthocyanacylierung (Synthese)	#16	#58	1,8		X
PGSC0003DMP400054630	Adenosinkinase, Isoform 2S	Glutathiondisulfidsynthase	#57	#16	2,4	X	
PGSC0003DMP400046033	vakuoläre H ⁺ -ATPase, Untereinheit A2	Kontrolle von Methylierungsreaktionen	#57	#16	2,1	X	
		Anthocyantransport in Vakuole	#57	#16	1,7	X	

Tab. 6: Proteine mit möglicher Assoziation zu Anthocyanbiosynthese oder -akkumulation. Die Detektion der gelisteten signifikanten Proteine erfolgte mittels LC-MS-Analyse mikrosomaler Fraktionen aus farblich kontrastierendem Knollengewebe der drei Kartoffelklesionen „Königspurpur“ (#16, rot), „Vitelotte“ (#57, blau-violett) und „Gala“ (#58, gelb). Dabei wurden Proteine als signifikant betrachtet, für welche mindestens zwei spezifische Peptide, ANOVA-Werte von $P < 0,05$ und eine mindestens 1,5-fache Regulation (Vervielfältigungsfaktor) ermittelt wurden. Die Proteinannotation erfolgte anhand eines automatisierten PGSC-Datenbankgleiches mittels Mascot Suchmaschinensoftware (Version 2.5.1). Postulierte Funktionen mit Verbindung zum Anthocyanmetabolismus basieren auf der PGSC-Annotation und einer Bandbreite diverser literarischer Quellen. Listung von oben nach unten entsprechend der Abundanzrelationen hinsichtlich Gewebefärbung geordnet und innerhalb dieser, sowie innerhalb einer jeden Korrelationsgruppe, nach absteigendem Wert des Vervielfältigungsfaktors. Proteine, die zu den neun mit Abstand meist abundanten unter allen detektierten Proteinen gehören, sind in dicker Schrift hervorgehoben. Berechnungen von Proteinabundanz, deren Relationen zwischen verschiedenen Proben, sowie ANOVA erfolgten mit Hilfe der Proteomics Software Progenesis Q1 (Version 3.0), anhand der Werte jeweils zwei technischer Replikate.

Dabei hebt sich eine Unterscheidung in drei grundlegende Gruppen hervor (Tab. 6, rechte Spalte *Korrelation*). Dies sind zum einen Proteine, die in blau-violettem und in rotem Gewebe deutlich stärker als in gelbem Gewebe vertreten sind, wie z. B. alle hier aufgeführten katalytischen Enzyme der Seitenkettenmodifikation (Assoziation mit Anthocyanbiosynthese). Zwei weitere Gruppen bilden die Proteine, die entweder in rotem oder in blau-violettem Gewebe deutlich mehr vorhanden sind als in dem jeweils anderen anthocyanhaltigen Gewebe (Assoziation mit Anthocyantyp). Beispiele dafür bilden einerseits die DFR, mit höchster Abundanz in rotem Gewebe, sowie auf der anderen Seite die Mehrheit der detektierten V-Typ-ATPasen und die Adenosinkinase mit höchster Abundanz in blau-violettem Gewebe. Zur Veranschaulichung der Korrelation von Gewebefarbe und relativer Menge eines spezifischen Proteins, sowie der Relationen zwischen den ermittelten Proteinabundanz in den drei verschiedenfarbigen Proben (Tab. 6), sind diese für einige ausgewählte Proteine in Abbildung 25 in Form von Balkendiagrammen dargestellt.

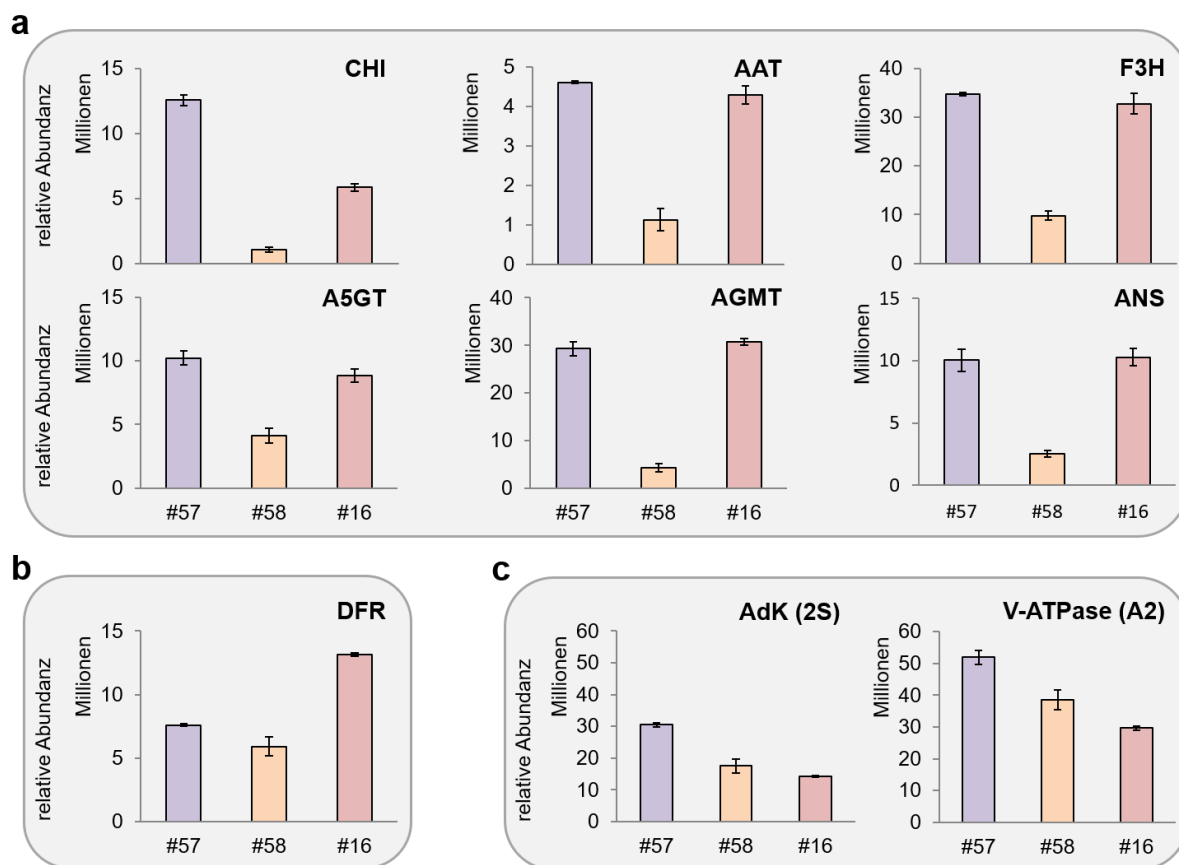


Abb. 25: Relative Abundanzen einiger ausgewählter, mittels LC-MS quantifizierter Proteine mit möglicher Assoziation zur Anthocyanbiosynthese (a) sowie im Speziellen zur Synthese und Akkumulation roter (b), bzw. blauer/violetter Anthocyane (c). Die Auswahl der Proteine stellt einen

Auszug aus Tabelle 6 dar. Miteinander verglichen werden jeweils die Abundanzen der in Mikrosomenpräparaten aus Knollengewebe identifizierten Proteine der drei Kartoffellinien „Vitelotte“ (#57), „Gala“ (#58) und „Königspurpur“ (#16). Berechnungen der relativen Proteinabundanzen beruhen auf Ionenintensitäten der MS-Daten spezifischer Peptide und erfolgten mit Hilfe von Progenesis QI (Version 3.0). Balken sind entsprechend der dominierenden Farbe (*violett* oder *rot*, bzw. *gelb* für Gewebe ohne Anthocyane) des jeweiligen Gewebes abgebildet. Fehlerbalken geben \pm SD (n=2) der Werte technischer Replikate an. *CHI*, Chalkonisomerase (PGSC0003DMP400020663); *AAT*, Anthocyanacyltransferase (PGSC0003DMP400028119); *F3H*, Flavanon-3-hydroxylase (PGSC0003DMP400006359); *A5GT*, Anthocyan-5-*O*-glycosyltransferase (PGSC0003DMP400008079); *AGMT*, Anthocyan-*O*-methyltransferase (PGSC0003DMP400011444); *ANS*, Anthocyanidinsynthase (PGSC0003DMP400039432); *DFR*, Dihydroflavonol-4-reduktase (PGSC0003DMP400006441); *AdK* (2S), Adenosinkinase Isoform 2S (PGSC0003DMP400054630); *V-ATPase* (A2), vakuoläre H⁺-ATPase-Untereinheit A2 (PGSC0003DMP400046033).

Abbildung 25 a zeigt die relative Abundanz für den Großteil der detektierten Schlüsselenzyme der Anthocyanbiosynthese, die in dem roten und blau-violetten Gewebe stark hochreguliert sind. Dazu zählen die Chalkonisomerase (*CHI*), Anthocyanacyltransferase (*AAT*), Flavanon-3-hydroxylase (*F3H*), Anthocyan-5-*O*-glycosyltransferase (*A5GT*), Anthocyan-*O*-methyltransferase (*AGMT*) und die Anthocyanidinsynthase (*ANS*). Bis auf die *CHI* zeigen alle hier aufgeführten Enzyme unabhängig vom gebildeten Anthocyantyp in blau-violettem und rotem Gewebe eine beinahe identische Abundanz. Ebenso verhält es sich beispielsweise für die in Tabelle 6 gelisteten Proteine mit putativer Assoziation zu Anthocyaninduktion (Saccharosesynthase), -akkumulation (Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase) und -degradation (Polyphenoloxidase). Eines der detektierten Schlüsselenzyme zeigt hingegen ein differenzielles Muster (Abb. 25 b). Die Dihydroflavonol-4-reduktase (*DFR*) liegt in dem analysierten blau-violetten und dem gelben Gewebe in ähnlichen Mengen vor und ist, im Vergleich zu diesen, in dem roten Gewebe mit etwa doppelter Abundanz vorhanden. Abbildung 25 c zeigt beispielhaft die Abundanzen zweier Proteine, der Adenosinkinase-Isoform 2S (*AdK* (2S)) und der vakuolären H⁺-ATPase-Untereinheit A2 (*V-ATPase* (A2)), die den größten Unterschied beim Vergleich zwischen dem blau-violetten und dem roten Gewebe aufweisen. Diese Proteine kommen in den höchsten Mengen im blau-violetten Knollengewebe von Kultivar „Vitelotte“ (#57) vor.

3.2.6. Analyse der Abundanz von Dihydroflavonolvorstufen für die Synthese verschiedener Anthocyantypen

Die drei Dihydroflavonole, DHK, DHQ und DHM, sind direkte Vorstufen der entsprechenden Anthocyanidine, Pelargonidin, Cyanidin und Delphinidin. Sie sind somit auch Vorläufermoleküle in der Biosynthese der verschiedenartigen Anthocyane (Abb. 3). Unterschiede in der Abundanz dieser Vorläufer könnten Einfluss auf das Verhältnis der gebildeten Anthocyantypen nehmen und regulierend auf die Ausbildung unterschiedlicher Anthocyanprofile wirken. Um dies zu prüfen, wurden die Ionenchromatogramme (*extracted ion chromatograms*, EICs) der drei Dihydroflavonole aus dem LC-UV/MS-Datensatz der initialen Polyphenolprofilanalyse (Abschnitt 3.1.1.), für 24 ausgewählte pigmentierte Gewebe (Anthocyanprofilgruppen, Tab. 1) entsprechend mit m/z 288,26 (DHK), m/z 304,25 (DHQ) und m/z 320,25 (DHM) extrahiert (Abb. 26). Resultierende Peaks wurden zusätzlich anhand von MS-Spektren inspiziert. Die Intensität der erhaltenen Substanzpeaks lag nah am unteren Detektionslimit. Zudem traten diese unspezifisch in EICs unterschiedlicher Dihydroflavonole auf und wiesen keine der gesuchten Molekülmassen auf. Die drei Dihydroflavonole konnten somit weder in roten noch in blauen Gewebeproben nachgewiesen werden. Da die Ergebnisse für alle untersuchten anthocyanhaltigen Gewebe einander gleichen, sind diese hier exemplarisch für zwei in Anthocyanzusammensetzung stark variierende Knollenfleischproben der Kartoffelakzessionen „Violett fleischige x Blue Marker – B“ und „Rote Emmalie“ (Tab. 1 und Abb. 17) dargestellt.

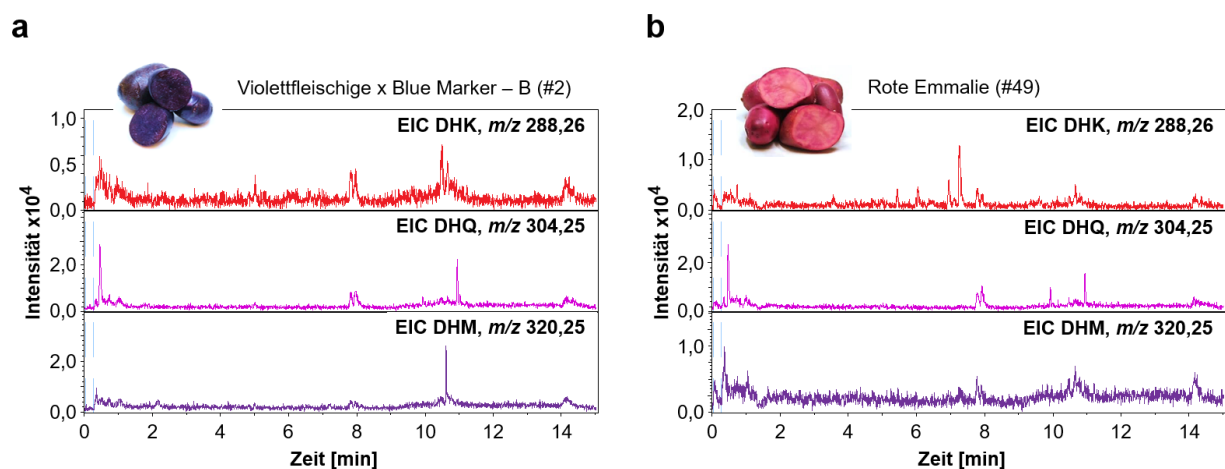


Abb. 26: Extrahierte Ionenchromatogramme (EICs) der drei Dihydroflavonole zeigen ein Defizit dieser Anthocyanvorstufen in blau-violettem (a) und rotem (b) Fleisch reifer Kartoffelknollen. Die Chromatogramme entstammen dem Datensatz der initialen LC-UV/MS-basierten

Polyphenolprofilanalyse und zeigen exemplarisch den Trend für alle untersuchten, farblich kontrastierenden, Gewebe (Fleisch und Schale). DHK, Dihydrokaempferol; DHQ, Dihydroquercetin; DHM, Dihydromyricetin. Chromatogramme sind entsprechend der Farbe der aus den Dihydroflavonolvorstufen jeweils hervorgehenden Anthocyantypen abgebildet.

3.2.7. LC-MS-Analyse von Anthocyanen und indirekter Nachweis von *StF3'5'H*-Aktivität in Trieben gelber Kartoffelknollen

Eine beiläufige, jedoch interessante Beobachtung war die sichtbare Bildung von Anthocyanen in epidermalen Zellen junger Triebe (Keime) aus Kartoffelknollen der Linie „Gala“ (Abb. 27). Obwohl diese Kartoffelakzession keinerlei Anthocyane in den Knollen selbst oder in Blättern, Stängeln und Blüten der adulten Pflanze bildet, so zeigt diese Beobachtung doch deren generelle Befähigung zur Anthocyanproduktion. Im Fall der Akzession „Gala“ deutet sich somit neben der entwicklungspezifischen (in neugebildeten Pflanzenorganen nach Dormanz) auch eine gewebespezifische Anthocyanthese an.

Bei rein visueller Betrachtung erschienen die Knollentriebe bläulich bis violett, was auf die Akkumulation delphinidinbasierter, 3',5'-hydroxylierter Anthocyane schließen lässt. Dies deutet auf die Präsenz einer aktiven *StF3'5'H* hin, was die Ergebnisse der Untersuchungen des Enzyms auf DNA-Ebene untermauern würde, wonach geringe Sequenzunterschiede in einzelnen Allelen keinen Einfluss auf die Funktionalität und Aktivität des Genproduktes zu haben scheinen. Um dies zu prüfen wurde eine LC-UV/MS-basierte Anthocyanprofilanalyse der Knollentriebe von „Gala“ durchgeführt. Dafür wurden zunächst reife Kartoffelknollen nach siebenmonatiger Keimruhe durch Lagerung bei 4°C zur Initiation der Keimung zu etwa 24°C umgelagert. Die Anthocyanbildung erfolgte unter Tageslicht (Abb. 27 a) bzw. in Dunkelheit (Abb. 27 b). Dabei war ein deutlich höheres Ausmaß der Anthocyanakkumulation in den unter Lichteinwirkung gebildeten Keimen (Lichtkeime) im Vergleich zu den im Dunkeln gebildeten Keimen (Dunkelkeime) zu erkennen. Eine optische Vergrößerung des schwächer pigmentierten basalen Bereiches der Lichtkeime ermöglichte die Identifizierung von Synthese- bzw. Akkumulationsursprung der Pigmente auf Zellebene. So zeigt Abbildung 27 b (rechts) eindeutig einen Beginn der Akkumulation von Anthocyanen in den Epidermiszellen rings um meristematische Apikale, die hier eventuell zum speziellen Schutz dieser Wachstums- und Differenzierungszonen eingelagert werden.

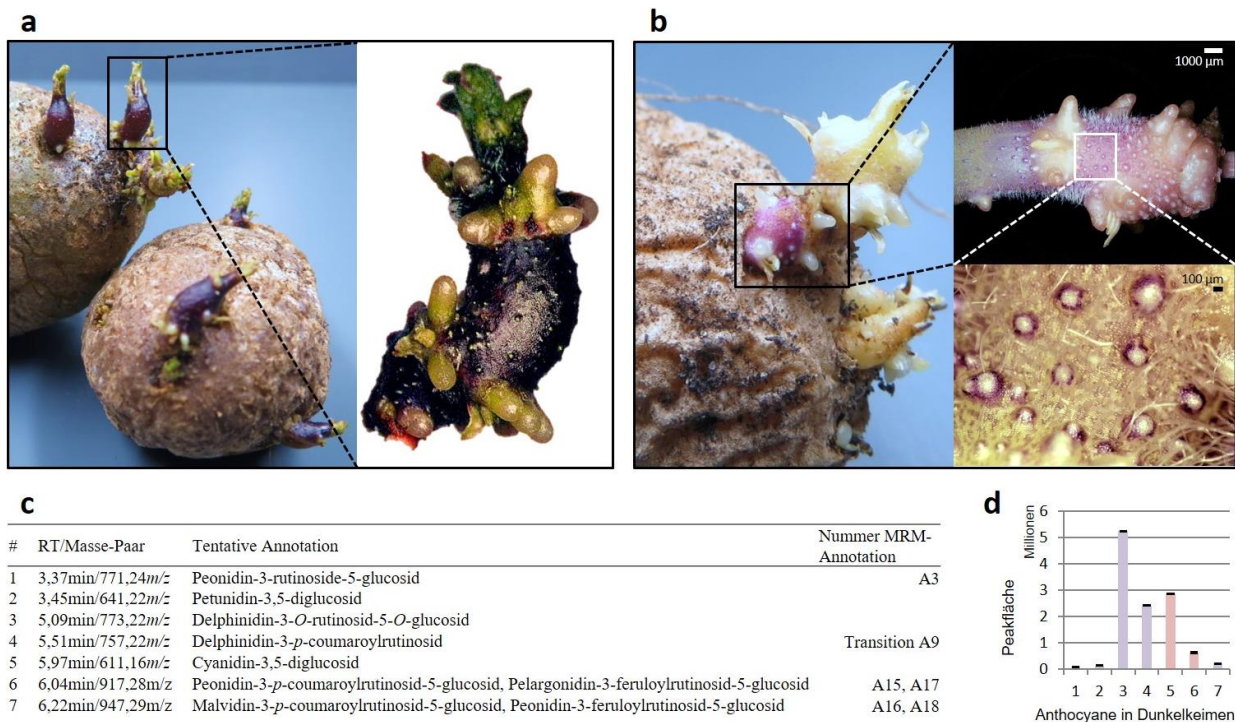


Abb. 27: F3'5'H-Aktivität in Kartoffelsorten mit gelben Knollen. Mittels LC-MS, in Licht- (a) und Dunkelkeimen (b) der Kartoffellinie „Gala“, detektierte Anthocyane (c) und deren relative Abundanzen innerhalb des Anthocyanprofils (d) zeigen die Akkumulation delphinidinbasierter, blauer Anthocyane und somit eine Aktivität der F3'5'H außerhalb der Knollenorgane. Mikroskopische Aufnahmen (b, rechts; Digitalmikroskop VHX-5000, Keyence) zeigen die beginnende Anthocyanakkumulation, zirkulär um meristematisches Wurzelgewebe. Fehlerbalken im Säulendiagramm (d) geben \pm SD (n=2) der Werte technischer Replikate an.

Die LC-UV/MS-Analyse bestätigte die Präsenz überwiegend blauer delphinidinbasierter Anthocyane (Abb. 27 c und d) in den jungen Kartoffeltrieben der Linie #58. Diese Ergebnisse belegen die generelle Befähigung zur 3',5'-Hydroxylierung von Dihydroflavonolen durch die F3'5'H in Kartoffelakzessionen mit vollständig gelben Knollen.

4. Diskussion

4.1. Ein hohes Maß phytochemischer Diversität bedingt die phänotypische Vielfalt der Knollengewebe von *Solanum tuberosum*

Die im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit durchgeführte, umfangreiche Metabolitprofilanalyse verschiedener *S. tuberosum*-Genotypen offenbarte für bestimmte Knollengewebe und Knollenfarben spezifische Polyphenolmuster. In diese Analyse wurden zwei Gewebetypen, Knollenfleisch und Knollenschale, von roten und blau-violetten Kartoffeln einbezogen. Während bestimmte Polyphenole im Speziellen zur Varianz im Metabolitprofil zwischen Fruchtfleisch- und Schalengewebe beitragen, sind individuelle Gruppen von Anthocyanen indikativ für die entsprechende Färbung der Gewebe. Die in dieser Arbeit erstmals durchgeführte Analyse von 57 anthocyanhaltigen Akzessionen der Spezies *S. tuberosum*, ermöglichte deren Gruppierung hinsichtlich verschiedener Anthocyanakkumulierungsmuster und dieser Diversität möglicherweise zugrundeliegender regulatorischer Mechanismen.

4.1.1. Kartoffelgenotypen zeigen eine hohe Variabilität der Anthocyanakkumulation

Der in dieser Arbeit generierte LC-UV/MS-Datensatz ermöglichte die tentative Annotation von insgesamt 27 individuellen Anthocyanen, von denen 21 in einem anschließenden quantitativen MRM-Profilierung verifiziert werden konnten (Tab. 2 und Appendix Abb. A2 g). Trotz hoher Variabilität der detektierten Anthocyane zeigte sich dabei ein grobes Muster für deren Akkumulation im Bezug auf die Gewebefarbe. Die Analysen ergaben, dass rotes Kartoffelknollengewebe hauptsächlich Pelargonidinderivate enthält, während blau-violettes Knollengewebe überwiegend Derivate des Malvidin und des Petunidin beinhaltet (Abb. 9). Die in dieser Arbeit erhobenen Daten bestätigen dabei die Resultate früherer Studien. Bereits 1973 wurde Pelargonidin-3-*p*-coumaroylrutinosid-5-glucosid (hier Anthocyan A14) als das Hauptanthocyan in rotem Kartoffelgewebe identifiziert (Sachse 1973). Später wurden weitere acylierte Pelargonidinglycoside als Hauptpigmente in roten Kartoffelknollen verifiziert (Naito *et al.* 1998; Rodriguez-Saona *et al.* 1998). Durch Andersen und Kollegen wurde Petunidin-3-*p*-coumaroylrutinosid-5-glucosid (hier Anthocyan A12) als das Hauptanthocyan

in blau-violetter Gewebe von *S. tuberosum* strukturell annotiert (Andersen *et al.* 1991). Zusätzlich wurden Malvidin- und Petunidinderivate für blaufleischige Kartoffeln beschrieben (Hillebrand *et al.* 2009). Peonidinkonjugate konnten ebenso wie ein acyliertes Delphinidderivat sowohl in rotem als auch in blau-violetter Knollengewebe nachgewiesen werden (Lachman und Hamouz 2005). Mit der erstmalig ganzheitlichen Annotation von 21 Kartoffelanthocyanen beinhaltet die vorliegende Arbeit die bisher umfangreichste dieser Analysen. Als Besonderheit ist an dieser Stelle auch zu erwähnen, dass mit Ausnahme von Kultivar „Vitelotte“ bisher für keinen anderen der in diese Studie integrierten Genotypen polyphenolische Profile in einem solchen Umfang beschrieben wurden. Zudem wurde in bisherigen Untersuchungen nur selten zwischen Knollenfleisch und -schale unterschieden. Im Vergleich zu den oben angegebenen Literaturdaten, wurden ähnliche Anthocyancompositionen für rote sowie auch für blau-violette Knollengewebe in der hier vorliegenden Studie festgestellt. Zusätzlich konnten hier jedoch auch individuelle Anthocyanprofile speziell für die Knollenschalen einiger Genotypen unterschieden werden.

Zusätzlich zu dem beobachteten generellen Anthocyanakkumulierungsmuster hinsichtlich der Korrelation von Anthocyancomposition und Gewebefarbe konnten für bestimmte Anthocyane einige Besonderheiten festgestellt werden. Pelargonidin-feruloyl-xylosylglucosyl-galactosid (A10) z. B., welches in starker Korrelation mit roter Gewebefärbung steht, konnte zusätzlich in den blau-violetten Knollengewebe der Linien „Violettfleischige x Blue Marker – B“ (Gruppe 1 F und 1 S) und „Blaue Ajanhuiri“ (Gruppe 5 F und 4 S) nachgewiesen werden (Abb. 9). Peonidinkonjugate (A3, A15, A18) wurden, wie bereits erwähnt, in blau-violetter und rotem Gewebe nachgewiesen, wobei diese in Letzterem in größeren Mengen vorzukommen scheinen. Davon ausgenommen sind die blau-violetten Knollengewebe der Akkzessionen „Violettfleischige x Blue Marker – B“, „Weinberger Blaue“ (Gruppe 8 S) und „Blaue Ajanhuiri“. Das gleiche Akkumulierungsmuster wurde für das acylierte Cyanidderivat Cyanidin-3-*p*-coumaroylrutinosid-5-glucosid (A11) beobachtet. Interessanterweise wurden die insgesamt größten Mengen aller vier gemessenen Malvidinderivate im Knollengewebe von Kultivar „Vitelotte“ (Gruppe 4 F und 13 S) detektiert. Dies bestätigt hier die Malvidine als vorherrschende Pigmente blaufleischiger Kartoffeln (Eichhorn und Winterhalter 2005; Hillebrand *et al.* 2009) und zeichnet zudem „Vitelotte“ als hervorragend geeignete Kartoffelvarietät für zukünftige Studien der Regulation der Malvidinbiosynthese aus.

4.1.2. Identifizierung bisher nicht für Kartoffelknollen bekannter Anthocyane

Die meisten in dieser Studie detektierten Anthocyane bestätigen die Ergebnisse vorangegangener Analysen zur Anthocyankomposition in Kartoffeln (Zubko *et al.* 1993; Hillebrand *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2009). Darüber hinaus gelang in der hier vorliegenden Studie erstmals der Nachweis von Pelargonidin-feruloyl-xylosyl-glucoosyl-galactosid (hier Anthocyan A10) in *S. tuberosum*, welches zuvor nur für schwarze Karotten (*Daucus carota* L. ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) beschrieben wurde (Kammerer *et al.* 2003; Algarra *et al.* 2014). Hauptsächlich wurde dieses Pelargonidinderivat dabei in rotem Kartoffelknollengewebe detektiert, während lediglich sehr geringe Mengen in einigen der blau-violetten Knollengewebe gefunden wurden. Die Vermutung eines Zusammenhangs zwischen ähnlichen Anthocyanen in Kartoffelknollen und Karotten liegt nicht fern, da es sich in beiden Fällen um knollige, unterirdische Pflanzenorgane handelt. Obwohl die Rolle von Anthocyanen in unterirdischen Organen noch nicht geklärt ist, ist es wahrscheinlich, dass sie andere Funktionen erfüllen als Anthocyane in dem Licht ausgesetzten Pflanzengewebe. Beispielsweise senden Anthocyane in Früchten und Blüten durch ihre attraktiven Farben positive, optische Signale an Frugivoren und Bestäuber (Janson 1983; Willson und Whelan 1990). Die Akkumulation dieser Pigmente in jungen Blättern trägt hingegen zur Photoprotektion bei (Liakopoulos *et al.* 2006). Farbaspekt und photoprotektive Funktion spielen jedoch in unterirdischen Organen keine Rolle. In reproduktiven oder der Speicherung dienenden Geweben, wie Kartoffelknollen und knollenartigen Karottenwurzeln, üben Anthocyane vermutlich eine Abwehrfunktion gegen Pathogene und Herbivoren aus (Wang *et al.* 1997; Innocenzi *et al.* 2004; Wegener und Jansen 2007) und bedingen somit vermutlich einen reproduktiven Vorteil (Mano *et al.* 2007). Anthocyankomposition und -regulation können je nach biologischer Funktion und Lokalisierung in der Pflanze variieren (Kovinich *et al.* 2014). Die Isolierung eines regulatorischen MYB-Gens aus violettfleischigen Süßkartoffeln (*IbMYB1*), das spezifisch in knolligen Wurzeln zur Kontrolle der Anthocyanbiosynthese beiträgt, bekräftigt diese Annahme (Mano *et al.* 2007).

Basierend auf Literaturquellen und der KEGG-Datenbank konnte das in dieser Arbeit in beinahe allen mittels MRM analysierten Knollengewebe detektierte Anthocyan A11 mit m/z 903 (Tab. 2) tentativ als Derivat des Cyanidins (m/z 287) annotiert werden, welches mit Glukose (m/z 180) und Rutinose (m/z 326) glycosyliert und mit *p*-Kumarsäure (m/z 164)

acyliert ist. Dieses Anthocyan wurde bisher nur für Kalluszelllinien von Kartoffel (*Solanum tuberosum* L. cv. Zarevo) beschrieben (Zubko *et al.* 1993).

Aufgrund der erstmaligen Entdeckung beider zuvor erwähnter Substanzen (A10 und A11) in Kartoffelknollen, bedarf es einer Validierung der vorläufigen Annotationen durch eine zusätzliche strukturelle Aufklärung der Seitenkettenmodifikation dieser Moleküle.

4.1.3. Bestimmte Kartoffelanthocyane zeigen eine Gewebetypspezifität

Die im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Metabolitanalysen zeigten Petunidin-3-*p*-coumaroylrutinosid-5-glucosid (A12) und Malvidin-3-feruloylrutinosid-5-glucosid (A19) als Hauptanthocyane in blau-violetter Kartoffelknollengewebe auf. Interessanterweise ist letzteres stärker abundant in Knollenschale als in Knollenfleisch (Abb. 9). Gleichermäßen wurde Malvidin-3-*p*-coumaroylrutinosid-5-glucosid (A16) mit höherer Abundanz in Knollenschale blau-violetter Kartoffeln gefunden. Im Allgemeinen konnte eine höhere Konzentration an Malvidinderivaten in Knollenschale, verglichen mit Knollenfleisch, detektiert werden. Dies könnte auf den antibakteriellen Effekt von Malvidin zurückzuführen sein, der unlängst für Anthocyanextrakte der Jambolanapflaume (*Syzygium cumini* L.) demonstriert wurde (Gopu *et al.* 2015). Malvidinderivate, die in der Fruchtschale dieser zur Gruppe der Rosiden gehörenden Pflanze gefunden wurden, unterbrechen das sogenannte *Quorum Sensing* (chemische Kommunikation zur Ermittlung der Populationsgröße von Einzellern) von *Klebsiella pneumoniae* und ermöglichen so eine frühe Abwehrreaktion. Da viele bakterielle Spezies diesen Mechanismus der Signalübertragung nutzen, ist es vorstellbar, dass solche Abwehrreaktionen ebenso in malvidinreicher Schale blau-violetter Kartoffeln auftreten.

4.1.4. Die Abundanz bestimmter Kartoffelknollenpolyphenole korreliert mit Gewebetyp und Färbung

Etwa ein Drittel von 31 tentativ annotierten Polyphenolen wurde in allen Proben detektiert, unabhängig von Gewebefarbe oder -typ. Darunter wurden in Übereinstimmung mit Friedman (1997) beispielsweise die Chlorogensäure-Isomere P2, P3 und P5 generell in großer Menge

gefunden. Daneben waren andere Polyphenole wie die Quercetin-Derivate P15, P16 und P21 sowie 4-Aminobenzoesäure (P1), Phlorizin (P28) und Zimtsäure (P30) in allen untersuchten Proben in relativ geringer Menge nachweisbar (Abb. 9). Eine dritte Gruppe von Polyphenolen zeigte hingegen eine Abundanz in Abhängigkeit von Gewebefarbe oder -typ.

Neben der eindeutigen Trennung von rotem und blau-violetter Knollengewebe offenbarte die Analyse des LC-MS/MRM-Datensatzes eine deutliche Gruppierung der Gewebe Knollenfleisch und Knollenschale (Abb. 9). Diese klare Differenzierung wird hauptsächlich durch Komponenten hervorgerufen, die eine starke Präsenz in Knollenschale zeigen, jedoch nicht oder nur in sehr geringen Mengen in Fleischproben detektiert werden konnten. Dazu zählen u. a. Kaffeesäure (P8), Vanillinsäure (P9), *p*-Cumarsäure (P12), Coniferylalkohol (P13), Vanillin (P14), Ferulasäure (P17) und Coniferylaldehyd (P26). Daher kann für diese phenolischen Substanzen eine Gewebespezifität angenommen werden, wie sie unlängst bereits für Kaffeesäure in Kartoffelknollenschale beschrieben wurde (Wang *et al.* 2015). Diese Gewebespezifität steht vermutlich in Verbindung mit einer speziellen Funktion dieser Substanzen in der Schale bzw. im abschließenden Gewebe unterirdischer Pflanzenorgane. Beispielsweise zeigt Kaffeesäure eine inhibitorische Wirkung auf das Wachstum von vier fungalen Pathogenen der Süßkartoffel, hinweisend darauf, dass ein erhöhtes Level an Kaffeesäure im Periderm zur chemischen Abwehr der Speicherwurzeln beiträgt (Harrison *et al.* 2003). Zudem dient Kaffeesäure als Substrat bei der Bildung des Ligninvorläufers Ferulasäure (Valiñas *et al.* 2015) (Abb. 3), welche hier gleichermaßen erhöht in Kartoffelknollenschale vorliegt. Für Lignin in Kartoffelknollen konnte bereits eine Beteiligung an der Resistenz gegen *Phytophthora* und *Phoma* spp. (Ampomah und Friend 1988) festgestellt werden. Die Synthese dieses Biopolymers in der äußeren Knollenschicht dient dabei möglicherweise der pflanzlichen Abwehr im Sinne einer mechanischen Barriere zur Verzögerung der Pathogenausbreitung.

Die hier ermittelten Daten weisen zudem auf eine Wechselbeziehung zwischen Polyphenolgehalt und Gewebefarbe hin, wie es für die Anthocyane bereits erläutert wurde (siehe Abschnitt 4.1.1.). Beispielsweise sind einige der Polyphenole wie Kaempferol (P31), Dihydrokaempferol (P27), Kaempferol-3-glucosid (P23), Kaempferol-3-rutinosid (P20) und Luteolin (P29) in rotem Knollengewebe stärker akkumuliert als in blau-violetter Knollengewebe. Diese Beobachtung liegt in Übereinstimmung mit der Biosynthese der Anthocyane (Abb. 3). Dabei fungiert z. B. das Kaempferol-Derivat DHK als direkte Vorstufe

für die Bildung von Pelargonidinen, was zu einer Rotfärbung des Gewebes führt. Unter den genannten Substanzen weisen Kaempferol-3-rutinosid (P20) und Luteolin (P29) eine sehr hohe Korrelation auf, nicht nur untereinander, sondern ebenfalls zu vier der sechs detektierten Pelargonidinderivate (Tab. 4). Beide Metabolite stellen sowohl Produkte als auch Intermediate der Flavonoidbiosynthese dar. Eine direkte Verbindung zwischen der Biosynthese beider Substanzen wurde bisher nicht beschrieben. Jedoch bedingen sowohl die Synthese von Luteolin aus Apigenin, als auch der Umsatz von Kaempferol zu Quercetin der katalytischen Funktion der Flavonoid-3',5'-Hydroxylase (F3'5'H; https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00941, Enzym 1.14.14.81). Dabei scheint in rotem, pelargonidinreichem Gewebe die F3'5'H-basierte Luteolinsynthese verstärkt abzulaufen, bei gleichzeitig verringerter Hydroxylierung von Kaempferol.

Im Allgemeinen enthält Kartoffelschale signifikant höhere Konzentrationen freier und gebundener Phenole, als Knollenfleisch (Nara *et al.* 2006). Jedoch zeigten sich auch hier einige von diesem generellen Muster abweichende Besonderheiten. Die oben aufgeführten Substanzen Kaempferol-3-rutinosid (P20) und Luteolin (P29) zeigen unter den analysierten roten Geweben die höchste Intensität in Knollenfleisch (Anthocyanprofilgruppe 6 F, Abb. 9). Gleichmaßen ist Quercetin-3,4-rutinosid (P11) höher abundant in blau-violetter Knollenfleisch als in gleichfarbiger Knollenschale. Unter den 31 analysierten Polyphenolen sind diese drei Substanzen die einzigen, die eine höhere Abundanz im Fleisch der Kartoffeln aufweisen. Für viele Polyphenole sind eine Reihe pharmakologischer Aktivitäten bekannt. So weist beispielsweise Luteolin antioxidative, antiinflammatorische, antimikrobielle und anticancerogene Kapazitäten auf (Lopez-Lazaro 2009). Eine erhöhte Akkumulation solcher Substanzen im Knollenfleisch steigert aufgrund der höheren ernährungsphysiologischen Bedeutung dieses Gewebes im Vergleich zur Schale somit den Nährwert der Kartoffeln. Daher kommt diesen Polyphenolen wahrscheinlich eine besondere Stellung im gesundheitlichen Aspekt der Speisekartoffeln zu.

4.1.5. Umweltbedingungen und Vererbungsregeln können Anthocyanmuster in farbigen Kartoffeln beeinflussen

In die initiale LC-UV/MS-basierte Anthocyanprofilanalyse wurden einige Genotypen einbezogen, die in unterschiedlichen Kultivierungsperioden angezogen wurden. Beispielhaft

dafür sind Linie #3 (Anbau 2013) sowie die aus deren Knollen klonal reproduzierte und daher genetisch identische Linie #54 (Anbau 2014) (Appendix Tab. A1). Für die blau-violetten Knollenschalen der Kultivare #3 und #54 konnten voneinander abweichende Anthocyanprofile beobachtet werden, die sich in der Abundanz einiger roter Anthocyane unterscheiden (LC-UV/MS-Substanzen 3, 15, 19 und v. a. 20, Appendix Abb. A2) und wahrscheinlich auf differenzielle Umweltbedingungen während der Kultivierungen 2013 und 2014 zurückzuführen sind. Als Proben beider Kultivare aus demselben Feldanbau im Jahr 2015 miteinander verglichen wurden, konnten dagegen ähnliche Anthocyanmuster festgestellt werden (Abb. 9). Diese Beobachtung ist hinweisgebend darauf, dass Umweltbedingungen die Anthocyanakkumulierungsmuster pigmentierter Kartoffeln beeinflussen, wie es für andere Spezies bereits beschrieben wurde (siehe auch Abschnitt 1.1.4. und 1.1.4.2.). So konnte beispielsweise für *Arabidopsis* und Mais gezeigt werden, dass niedrige Temperaturen die Anthocyan synthese in den Keimlingen dieser Pflanzen induziert (Chalker-Scott 1999). In Maiswurzeln erfolgt diese Induktion zudem durch erhöhten Salzgehalt im Boden. Weiterhin können z. B. Mängel an Stickstoff (*V. vinifera*) und Phosphor (*A. thaliana*, Zellkulturen von *D. carota* und *V. vinifera*) sowie ein niedriger pH-Wert des Bodens (*Vitis*-Hybriden) die Anthocyanproduktion erhöhen (Chalker-Scott 1999). Für Kartoffel ist allerdings bislang kaum bekannt wie die Anpassung der Anthocyanproduktion an vorherrschende Umweltfaktoren erfolgt und wie Anbaujahr und -region die Anthocyanzusammensetzung beeinflussen (Reyes *et al.* 2004; Hejtmánková *et al.* 2013). Um zu überprüfen welche Faktoren Veränderungen im Anthocyanprofil von Kartoffelknollen bedingen und in welchem Maße dies erfolgt, bedürfte es daher weiterführender Analysen. Dabei könnten unter Einsatz künstlicher klimatischer Bedingungen (Gewächshaus oder Pflanzenkulturhalle) gezielt verschiedene Versuchsansätze erfolgen, in denen beispielsweise Temperatur und Substratfeuchte variieren. In solche zukünftigen Untersuchungen sollten hinsichtlich Anthocyanzusammensetzung und -akkumulierungsmuster unterschiedliche Phänotypen einbezogen werden, wobei diese jeweils durch mehrere Kultivare repräsentiert werden sollten, um valide Daten zu generieren.

Darüber hinaus wurden vier Nachkommen (Linie #1, #2, #48 und #53) einer Kreuzung der Kultivare „Violettfleischige“ und „Blue Marker“ (Akzession GLKS 12066 x GLKS 12477) in die Metabolitstudie einbezogen. Dabei zeigten jeweils zwei der Genotypen identische Anthocyanprofile in Knollenfleisch und in Knollenschale. So entsprechen die Profile von Linie #1 und #2 jeweils den Profilgruppen 1 F und 1 S, und die Profile von Linie #48 und #53

jeweils den Profilgruppen 2 F und 10 S (Appendix Abb. A2 und Tab. 1). Zudem besteht eine Analogie beider Paare von Anthocyanmustern (Gruppe 1 F/1 S und 2 F/10 S) zu den Profilgruppen zweier Selbstungsnachkommen der Linie „Violettfleischige“. Eine Zugehörigkeit zur Profilgruppe 2 F wurde ebenso für die beiden analysierten Selbstungsnachkommen der Linie „Blue Marker“ festgestellt. Dies deutet auf eine Dominanz in der Vererbung dieser Anthocyanmuster hin, was wiederum einen wichtigen Aspekt für Züchtungsprogramme darstellt. Die Daten implizieren, dass einige Anthocyanprofile stabiler als andere und zudem möglicherweise genotyp- und/oder gewebespezifisch sind.

Das Merkmal und die spezifische Art der Anthocyanpigmentierung unterliegen einer polygenen Vererbung. Die Merkmalsausprägung ist dabei sowohl von mehreren Genen, als auch von Umweltfaktoren abhängig und deutet somit auf die spezielle Form der multifaktoriellen Vererbung hin (Tariverdian und Buselmaier 2004). Die beteiligten Gene umfassen im Speziellen die für Schlüsselenzyme der Flavonoid- und Anthocyanbiosynthese kodierenden Gene, sowie eine Vielzahl transkriptionsfaktorkodierender Gene. In welchem Maße jedes einzelne dieser Gene an der Ausprägung der Anthocyanpigmentierung beteiligt ist, kann zwischen verschiedenen Spezies, ebenso wie innerhalb einer Art verschieden sein (siehe Abschnitt 1.1.4.).

4.2. Die Diversität regulatorischer Mechanismen der Anthocyanbiosynthese innerhalb der Spezies *Solanum tuberosum*

Die differenziellen Anthocyanmuster in den analysierten verschiedenfarbigen Kartoffelknollen legen die Vermutung nahe, dass sich die Unterschiede in der Anthocyanzusammensetzung im genetischen Hintergrund der Anthocyanbiosynthese widerspiegeln (Abschnitt 3.1.). Entsprechend ihres Anthocyanprofils konnten den verschiedenen Kartoffelgenotypen bzw. Knollengeweben entsprechende Abzweigungen im Anthocyanbiosyntheseweg zuerkannt werden (Abb. 28). Dies deutet auf einen dominanten Metabolitfluss in bestimmten Abzweigungen des Flavonoidstoffwechsels und auf Variationen übergeordneter regulatorischer Mechanismen der Anthocyanbiosynthese hin. Vielfältige Interaktionen in einem hoch komplexen Netzwerk enzymatischer Reaktionen tragen zu dieser

Diversität bei. Differenziell regulierte Hydroxylierungs- und Methylierungsereignisse am B-Ring der Dihydroflavonole führen zur Bildung von Anthocyanidingrundgerüsten, die spezifisch für rote oder blau-violette Knollengewebe sind (Abb. 28, Balkendiagramme). Im Gegensatz dazu werden ähnliche Glycosylierungs- und Acylierungsreaktionen, zumindest für die in roten und blau-violetten Geweben detektierten Hauptanthocyanidine, vermutet (Abb. 28, Kreisdiagramme). Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass unterschiedlich farbige Kartoffelgewebe, neben dem vermutlich mehr oder weniger gleichen Sortiment nachgeschalteter Glycosyl- und Acyltransferasen, über eine übergeordnete differenzielle Regulation der Expression und/oder der enzymatischen Aktivität von Hydroxylasen und Methyltransferasen verfügen.

Ein Schlüsselschritt in der Biosynthese unterschiedlich farbiger Anthocyane ist die Umwandlung von Dihydrokaempferol bzw. Dihydroquercetin in Dihydromyricetin, welche durch die Flavonoid-3',5'-hydroxylase katalysiert wird (Abb. 28). Es ist daher anzunehmen, dass zwischen verschiedenfarbigen Kartoffeln signifikante Unterschiede in der Regulation dieses Enzyms bestehen, das auch in der Kartoffelanthocyanbiosynthese unabdingbar für die Synthese von Delphinidin, Petunidin und Malvidin ist (Stushnoff *et al.* 2010).

Um diese Annahme zu prüfen, die spezifische Rolle der *StF3'5'H* bei der Ausprägung differenzieller Anthocyanprofile genauer zu durchleuchten und das Verständnis der noch wenig bekannten regulatorischen Mechanismen, denen dieses Enzym unterworfen ist, zu vertiefen, wurde im Folgenden die *StF3'5'H* in den Focus der weiteren Analysen gerückt.

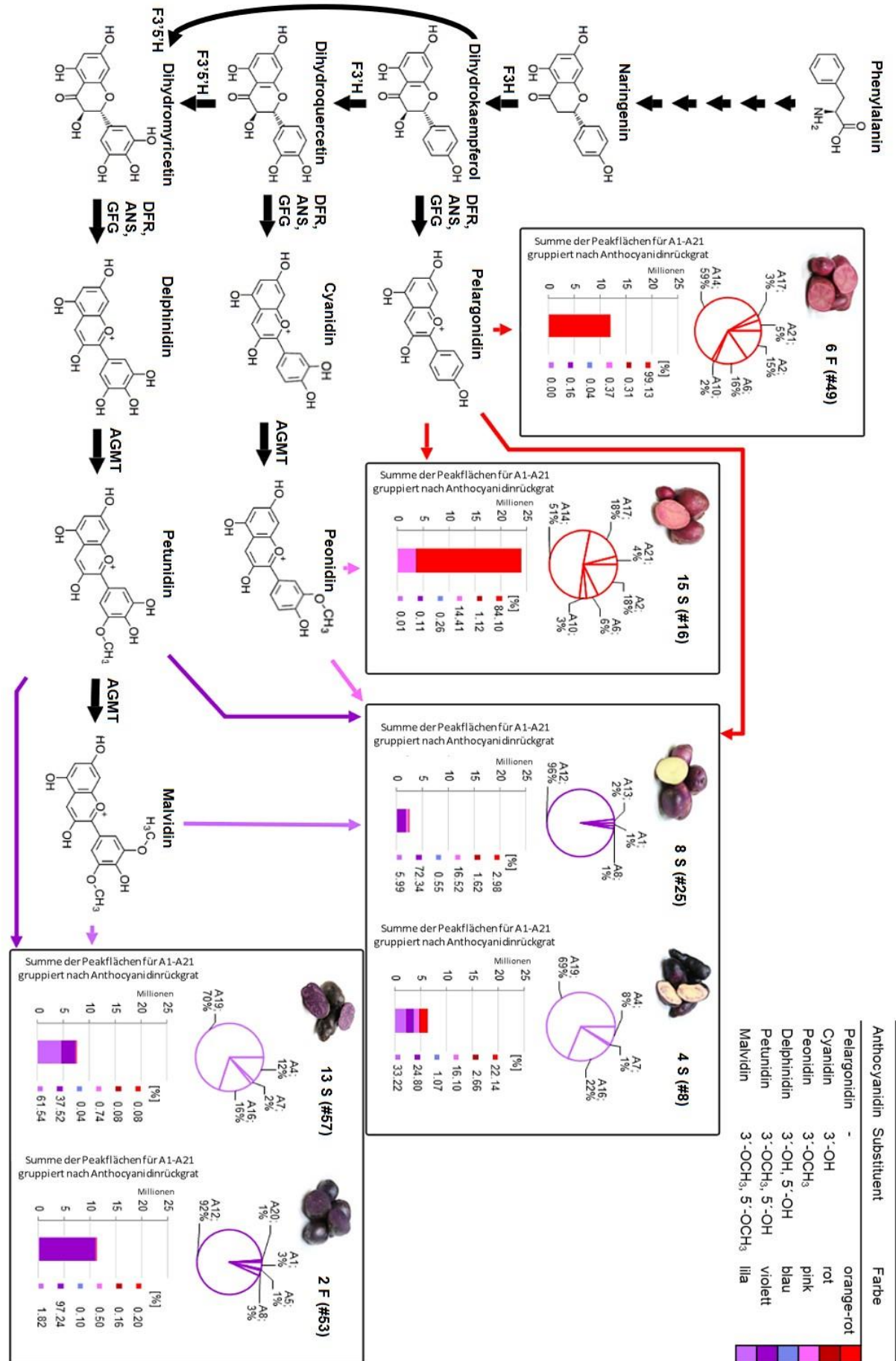


Abb. 28: Schematische Übersicht des Anthocyanbiosynthesewegs in Kartoffelknollen. Gestapelte Balkendiagramme zeigen den Gesamtanthocyan Gehalt, als Summe der Peakflächen (Anthocyan A1-A21), sowie den relativen Gehalt an Anthocyaninderivaten, für ausgewählte Knollengewebe mit repräsentativen Anthocyanprofilen. Zusätzlich ist das Verhältnis individueller Anthocyane für das Hauptaglycon jedes Kandidatengewebes als Kreisdiagramm dargestellt. Die dargestellten Werte basieren auf LC-MS/MRM-Daten der 21 detektierten Anthocyane. Graphische Elemente (*Balken*, *Kreisdiagramme* und *Pfeile*) sind entsprechend der dominierenden *Farbe* des jeweiligen Aglycons abgebildet. *AGMT*, Anthocyanidinglycosid-*O*-methyltransferase; *ANS*, Anthocyanidinsynthase; *DFR*, Dihydroflavonol-4-reduktase; *F3H*, Flavanon-3-hydroxylase; *F3'H*, Flavonoid-3'-hydroxylase; *F3'5'H*, Flavonoid-3',5'-hydroxylase; *GFG*, UDP-Glucose-3-*O*-Flavonoidglycosyltransferase. Die Abkürzungen für Kartoffelsorten bzw. -gewebe (Anthocyanprofilgruppen) und Metabolite entsprechen der Auflistung in Tabelle 1 und 2. [Graphik erstellt mittels VANTED (Rohn *et al.* 2012); Strukturformeln der Metabolite entstammen der KEGG Datenbank (Kanehisa *et al.* 2015)]

4.2.1. Wie ausgeprägt ist die Schlüsselfunktion der Flavonoid-3',5'-hydroxylase in der Anthocyanbiosynthese von Kartoffelknollen?

Die *F3'5'H* stellt die erste notwendige Instanz für die zusätzliche Synthese blauer/violetter Pigmente im Anthocyanbiosyntheseweg dar und bildet daher einen geeigneten Ausgangspunkt und unumgänglichen Faktor bei der Erforschung dieses Systems. Aufgrund ihrer spezifischen enzymatischen Eigenschaften (Übertragung von Hydroxylgruppen an C-Atome in 3'- und 5'-Position des Flavonoidgrundgerüsts, siehe Abschnitt 1.3.1.) ist die *F3'5'H* unabdingbar für die Synthese blauer/violetter, delphinidinbasierter Anthocyane (Olsen *et al.* 2010). Somit sind nur die Kartoffeln, die dieses Enzym enthalten, grundsätzlich in der Lage solche Typen 3',5'-hydroxylierter Anthocyane zu produzieren. Dies impliziert jedoch nicht, dass in diesem Fall die Synthese blauer Anthocyane auch zwangsläufig erfolgen muss. Hinter diesem Prozess verbirgt sich ein komplexes regulatorisches Netzwerk, welches auf verschiedenen Ebenen der *F3'5'H*-Expression eingreifen und somit den Schwerpunkt der Synthese in Richtung der Produktion bestimmter Anthocyantypen verschieben kann. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden initiale Analysen durchgeführt, die neue Einblicke in die Ebenen der Regulation der *StF3'5'H* gewähren. Diese werden im Folgenden diskutiert und liefern Hinweise darauf, in welchem Maße die *StF3'5'H*, ihre Expression und ihre Funktionalität die Merkmalsausprägung der Synthese blauer/violetter Pigmente beeinflussen.

4.2.1.1. Mehrere Genloci und eine Vielzahl verschiedener Allele des *Stf3'5'h*-Gens existieren im Genom tetraploider *S. tuberosum*-Spezies

Obwohl die meisten kommerziell angebauten Kartoffelsorten tetraploid sind, befasst sich der Großteil genetischer Studien der *Solanum*-Spezies mit den gewissermaßen leichter handhabbaren, diploiden Arten. Tetraploide Kartoffeln erwiesen sich aufgrund der deutlich höheren Komplexität genetischer Verhältnisse (Allel- und Gendosierung) als weitaus komplizierterer Modellorganismus. Die Genotypisierung von DNA-Sequenzvarianten in polyploiden und in hohem Maße heterozygoten Spezies stellt eine deutlich größere Herausforderung dar als in diploiden Spezies, da ein bestimmtes Gen durch mehr als zwei (in tetraploiden Kartoffeln bis zu vier) verschiedene Allele pro Locus und pro Genotyp repräsentiert werden könnte (Uitdewilligen *et al.* 2013). Daraus scheinen u. a. grundlegende Unterschiede im System der Anthocyanpigmentierung zwischen den tetraploiden Kultursorten und den zumeist diploiden Wildsorten zu resultieren (Howard 1970). So deuteten bisherige Studien diploider (aber auch triploider) Kartoffelgenotypen darauf hin, dass die F3'5'H in *S. tuberosum* durch ein einziges Gen kodiert wird (Jung *et al.* 2005; Momose *et al.* 2010). Die im Zuge der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen verschiedener tetraploider Kultursorten liefern hingegen erstmalig Hinweise auf die Existenz mehrerer Kopien des *Stf3'5'h*-Gens. Auf Basis der Ergebnisse genomischer Sequenz- und Southern Blot-Analysen für fünf phänotypisch kontrastierende Kartoffelakzessionen kann nun die Existenz von mindestens zwei Loci des *Stf3'5'h*-Gens postuliert werden (Abb. 13 und Abb. 16), was allerdings durch zukünftige Experimente noch verifiziert werden muss.

Die Analyse genomischer Sequenzen offenbarte mehr als vier verschiedene Allele des *Stf3'5'h*-Gens, nicht nur innerhalb einer Linie (zwischen fünf und neun putative Allele), sondern auch unter allen fünf analysierten Linien (hier sogar bis zu 30 Allele) (Abb. 13 und Appendix Abb. A5). Dabei könnten einzelne allelische Varianten durchaus auch falsch positive Ergebnisse aufgrund von Fehlern während der Amplifikation oder Sequenzierung darstellen. Die für die Amplifizierung des *Stf3'5'h*-Gens zur nachfolgenden Klonierung und Sequenzierung verwendete genomische DNA wurde aus Poolproben von Blattmaterial mehrerer Individuen pro Kartoffellinie extrahiert (siehe Abschnitt 2.3.1.). Daher besteht zudem die Möglichkeit, dass es sich bei einigen der detektierten Sequenzpolymorphismen um somatische Mutationen (aufgrund fehlender Meiose) in individuellen Pflanzen handelt, wobei die verschiedenen Allele einem Genort zuzuordnen sein könnten. Allerdings wurden im

Rahmen dieser Arbeit durch Allelanalysen und Southern Blot-Untersuchungen zwei unterschiedliche experimentelle Ansätze zur Bestimmung der Anzahl von *Stf3'5'h*-Genkopien im Kartoffelgenom durchgeführt. Dabei lieferte sowohl die insgesamt detektierte Anzahl unterschiedlicher Allele sowie das Auftreten von mehr als einer Bande bei der Southern Blot-basierten Analyse der Genkopienzahl Hinweise auf mehr als einem *Stf3'5'h*-Locus. Möglicherweise finden sich daher ein oder mehrere weitere *Stf3'5'h*-Genorte in den bisher noch nicht assemblierten 14 % der bekannten Genomsequenz (Potato Genome Sequencing Consortium 2011). Die hier durchgeführten Untersuchungen sollten in zukünftigen Studien verifiziert und erweitert werden, beispielsweise durch quantitative PCR-Analysen an genomischer DNA der einzelnen Kartoffelakzessionen.

Nur eine allelische Variante des *Stf3'5'h*-Gens (hier als Allel 1 bezeichnet) konnte als konservierte Sequenz in allen fünf Genotypen nachgewiesen werden. Das Auftreten ansonsten ganz unterschiedlicher *Stf3'5'h*-Allele in allen analysierten Linien steht im Gegensatz zu den Erkenntnissen bisheriger Studien von Jung *et al.* (2005). Diesen Studien zufolge existieren unterschiedliche *Stf3'5'h*-Allele, je nach Ploidiegrad zwei (in diploiden) bzw. vermutlich bis zu vier Allele (in tetraploiden), gleichartig im Genom verschiedener Phänotypen innerhalb der Spezies. Für diese Allele wurde in diploiden Genotypen, eine funktionale und eine nichtfunktionale Variante postuliert (Jung *et al.* 2005), wobei das funktionale Allel nur in blau-violett-knolligen Phänotypen transkribiert wird. Das nichtfunktionale Allel wird hingegen in beiden Phänotypen transkribiert. Die Diskrepanz zu den Ergebnissen der hier vorliegenden Studien veranschaulicht und bekräftigt die bereits erwähnte Vermutung der höheren Komplexität genetischer Verhältnisse und die daraus resultierenden Unterschiede im Mechanismus der Anthocyanpigmentierung zwischen tetraploiden und diploiden Sorten der Spezies *S. tuberosum* (Howard 1970; Uitdewilligen *et al.* 2013).

Insgesamt bestätigen die erhobenen Daten die Heterozygotie der tetraploiden *S. tuberosum*-Kultivare in Bezug auf das *f3'5'h*-Gen und das damit verbundene Merkmal der Produktion blauer/violetter Anthocyane.

4.2.1.2. Keine signifikanten Anzeichen für eine unterschiedliche direkte F3'5'H-Regulation auf DNA-Ebene in farblich kontrastierenden Kartoffelknollengewebe

Die Beobachtung allelischer Unterschiede des F3'5'H-kodierenden Gens zwischen verschiedenfarbigen Knollengewebe könnte auf eine bereits auf DNA-Ebene stattfindende Regulation der F3'5'H hindeuten. Geht man der Theorie funktionaler und nichtfunktionaler Allele (Jung *et al.* 2005) nach, so müssten sich diese, in Korrelation mit bestimmten Phänotypen, zumindest entsprechend in Linien mit gleichen Anthocyantypen (rote bzw. blaue/violette Pigmente) wiederfinden (siehe auch Abschnitt 1.3.3. und 4.2.1.1.). Mit Ausnahme weniger SNPs in zwei Allelen der Linie #9 (Allel #9_2 und #9_3) konnten jedoch keinerlei Übereinstimmungen der SNPs, Insertionen, Deletionen oder Austausch mehrerer Basenpaare zwischen Allelen einer Linie oder verschiedener Linien identifiziert werden. Falls die Regulation der F3'5'H durch voneinander verschiedene funktionale und nichtfunktionale Allele und somit durch deren unterschiedliche Transkription oder Genprodukte erfolgen würde, müsste besagtes funktionales Allel in allen blau-violetten Knollengewebe vorhanden sein.

Für die hier analysierten Linien mit blau-violetter Knollengewebe (#25 und #57, Abb. 11) konnte ein gemeinsames *Stf3'5'h*-Allel ermittelt werden (Abb. 13). Da es sich dabei jedoch um das in allen Linien konservierte Allel 1 handelt, sollte es als hypothetisch funktionales Allel nur in blau-violetten Knollengewebe effizient exprimiert werden. Allein anhand der Ergebnisse der Allelsequenzierung scheint die Theorie des einen funktionalen Allels eher unwahrscheinlich, da die meisten anderen detektierten Allele nur sehr geringe Abweichungen zu Allel 1 aufweisen, zumeist in Form einzelner Basenpaaraustausche. Einige der Allele, die in Linien mit rotem oder gelbem Gewebe identifiziert wurden, weisen in dem hauptsächlich für die Kontrolle der Transkription verantwortlichen Promotorbereich zudem sogar eine identische Sequenz zu Allel 1 auf (beispielsweise Allel #9_4, #16_4, #58_2).

4.2.1.2.1. Sequenzpolymorphismen akkumulieren vornehmlich in nichtkodierenden Bereichen des *Stf3'5'h*-Locus

Im nichtkodierenden, aber für die transkriptionelle Regulation wichtigen Promotorbereich sämtlicher allelischer *Stf3'5'h*-Varianten wurden insgesamt deutlich mehr Sequenzunterschiede detektiert, als in den proteinkodierenden Bereichen. Dies könnte darauf

hindeuten, dass Veränderungen in diesem Bereich mit höherer Wahrscheinlichkeit eine veränderte Regulation des *Stf3'5'h*-Gens zur Folge haben als Veränderungen in der kodierenden Sequenz. So zeigte beispielsweise die im Jahr 2011 von Sato *et al.* veröffentlichte Studie der F3'5'H in *Saintpaulia* (Usambaraveilchen, Gattung der Asteriden), dass Transposon-ähnliche Insertionen oder Deletionen in der Promotorregion des F3'5'H-Gens dessen Transkriptionslevel und somit die Anthocyankomposition und Blütenfarbe stärker beeinflussen als Mutationen in kodierenden Regionen (Sato *et al.* 2011).

Eine Studie in *Vitis vinifera* (Weinrebe) deutete einen ähnlichen Trend und zudem weitere mögliche Parallelen zu den Erkenntnissen der vorliegenden Studie der *S. tuberosum*-F3'5'H an (Falginella *et al.* 2010). Dabei konnten in *V. vinifera* mehrere Kopien des F3'5'H-Gens nachgewiesen werden, welche räumlich und zeitlich getrennte Expressionsprofile aufweisen. Auch hier wurden 2 kb der Promotorregionen der F3'5'H-Kopien nach DNA-Bindemotiven durchsucht. Dabei erschien die Anhäufung struktureller Variationen im Promotorbereich der Genkopien bedeutungsvoller als Abweichungen in kodierenden Regionen. Regulatorische Elemente, die alternativ in den Promotoren von Genduplikaten auftraten, umfassten dabei u. a. Bindestellen für MYB-Transkriptionsfaktoren, Trockenstress-induzierbare *cis*-elemente, sowie Licht- und Hitzestress-responsive Elemente. Diese korrelieren mit den Faktoren, welche an der Regulation der F3'5'H-Expression beteiligt sind. Solche regulatorischen DNA-Sequenzmotive konnten auch im Zuge der hier vorgestellten Analysen in den Promotoren verschiedener F3'5'H-Allele kontrastierender Kartoffelgenotypen nachgewiesen werden. Allerdings konnten hier anhand der angewandten *in silico*-Überprüfung keine Unterschiede zwischen den Sequenzmotiven unterschiedlicher Allele festgestellt werden. Jedoch kann das Auftreten solcher Variationen nicht ausgeschlossen werden und bedarf daher weiterführend einer umfassenderen Analyse eines größeren Bereiches der Promotorsequenz.

Albert *et al.* zeigten bereits, dass die grundlegenden Merkmale des regulatorischen Netzwerkes der Anthocyanbiosynthese im Asteriden-Modell der Petunie vergleichbar mit denen des Rosiden-Modells von *Arabidopsis thaliana* und unter den Eudikotyledonen wahrscheinlich weit verbreitet sind (Albert *et al.* 2014) (siehe auch Abschnitt 1.1.4.2.). Daher liegt es nahe, dass ebensolche Relationen zwischen dem Asteriden-Modell der Kartoffel und dem Rosiden-Modell von *V. vinifera* bestehen können. In dieser Hinsicht ergab sich ein interessanter Aspekt aus der genomischen Sequenzanalyse. So wurde für Kartoffelakzessionen mit starken regulatorischen Unterschieden in der Anthocyanbiosynthese

innerhalb der Knolle (#9 und #25), zwischen den beiden Gewebetypen Fleisch und Schale, eine größere Anzahl verschiedenartiger *Stf3'5'h*-Allele detektiert als für die übrigen Kultivare. Solche Genotypen verfügen demnach über einen komplexeren genetischen Hintergrund des an der Regulation beteiligten Strukturgens *Stf3'5'h* als Kartoffelsorten mit gleichartiger oder gänzlich fehlender Anthocyanakkumulation in beiden Gewebetypen (#16 und #57, bzw. #58). Diese Beobachtung ist dabei unabhängig vom Typ der gebildeten Anthocyane und somit von der Gewebefarbe. Eine Theorie dafür könnte die Nutzung unterschiedlicher Allele, bzw. Allele verschiedener Genloci, im Sinne der gewebespezifischen Expression des *Stf3'5'h*-Gens sein, ähnlich wie zuvor für *V. vinifera* erläutert.

4.2.1.2.2. Somatische Mutationen bestimmen die Heterozygotie des *Stf3'5'h*-Gens

Ausgenommen einer in Allel #9_3 detektierten 241bp-Insertion in Exon 1 treten ausschließlich Austausche einzelner Basen und nur Insertionen und Deletionen von maximal fünf Basen zwischen sämtlichen verschiedenen *Stf3'5'h*-Allelen auf. Dies könnte die Annahme einer regulatorischen Funktion bestimmter Allele im Sinne funktionaler und nichtfunktionaler Genvarianten (siehe auch Abschnitt 4.2.1.2.) widerlegen. Polyploide, stark heterozygote Spezies, wie *S. tuberosum*, unterliegen einer starken Inzuchtdepression und weisen eine hohe Nukleotiddiversität auf (Simko *et al.* 2006; Uitdewilligen *et al.* 2013). Es handelt sich hierbei um Pflanzen, die sich klonal reproduzieren und demnach vermutlich ein signifikant größeres Potential zur Akkumulation somatischer Mutationen im Genom besitzen als Spezies mit sexueller Vermehrung (Hardigan *et al.* 2016). Dieses Potential resultiert u. a. aus dem Erhalt der Kultur- und Landsorten (ohne systematische Züchtung) in Form von *In-Vitro*-Klonen, oder als stetig vermehrte Pflanzknollen. Ohne regelmäßig auftretende meiotische Ereignisse, die eine negative (reinigende) Selektion und somit die Eliminierung unvorteilhafter Mutationen in jeder Generation auferlegen, werden Mutationen potenziell in höheren Mengen erhalten als in inzuchtintoleranten Spezies (Simko *et al.* 2006). Mutationen in *Solanum*-Arten sind daher meist mitotischen Ursprungs und die Mutationsbelastung in kultivierten Sorten ist enorm hoch (Potato Genome Sequencing Consortium 2011). Dabei treten, in Korrelation mit den hier ermittelten Sequenzdaten für das *Stf3'5'h*-Gen, v. a. Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) auf. Diese Unterschiede an einzelnen Positionen der DNA-Sequenz stellen eine Form der Punktmutation dar, bei der ein Nukleotid gegen ein anderes substituiert wird, und sind die häufigste Art genetischer Variation in natürlichen

Populationen (Schneider *et al.* 2001). Im Hinblick auf diese Kenntnisse könnte die hier als Allel 1 bezeichnete, konservierte, allelische Variante des *Stf3'5'h*-Gens möglicherweise das ursprünglichste aller hier detektierten Allele darstellen, aus dem die übrigen Allele durch Anhäufung von Mutationen im Laufe der evolutionären und speziesspezifischen Entwicklung hervorgingen.

Die hier beobachtete Akkumulation einer größeren Menge Sequenzpolymorphismen in nichtkodierenden DNA-Abschnitten des *Stf3'5'h*-Gens ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass Allele mit betroffenen proteinkodierenden Bereichen in höherem Maße einer natürlichen Selektion unterliegen, welche die potenziell unvorteilhaften Mutationen eliminiert (Simko *et al.* 2006). Nichtkodierende Genomregionen stehen demnach weitgehend unter Mutations-, nicht jedoch unter Selektionseinfluss. Auf der anderen Seite werden vorteilhafte Mutation in der Population schneller fixiert als neutrale und befinden sich daher weniger häufig noch in einem polymorphen Zustand zwischen den Allelen (Simko *et al.* 2006). Somit führt die natürliche Selektion auch zur Änderung der Allelfrequenz und zur differentiellen Reproduktion unterschiedlicher Genotypen als Bestandteil evolutionärer Entwicklung in *S. tuberosum*. Mit speziellem Bezug zum *Stf3'5'h*-Gen könnte dies auch eine differenzielle Reproduktion verschiedener Phänotypen zur Folge haben, welche sich hinsichtlich des in den Knollen akkumulierenden Anthocyanotyps unterscheiden. Dabei weisen Phänotypen mit erhöhtem Level 3',5'-hydroxylierter Anthocyane, durch besseren Schutz gegen diverse schädliche Umwelteinflüsse, vermutlich auch eine erhöhte Fitness auf (Chalker-Scott 1999). Mutationen, welche diese Fitness reduzieren, sollten daher zum Schutz und Erhalt der Population durch negative Selektion beseitigt werden.

In der hier vorliegenden Studie konnte jedoch ebenfalls gezeigt werden, dass kodierende Sequenzabschnitte der *Stf3'5'h*-Allele eine größere Anzahl nicht-synonyme Mutationen (sinnverändernd; SNP resultiert in veränderter Aminosäure) als synonyme Mutationen (Mutation ohne Einfluss auf kodierte Aminosäure) aufweisen. In den kodierenden Sequenzabschnitten konnten insgesamt neun SNPs festgestellt werden. Davon sind zwei Drittel nicht-synonyme und ein Drittel synonyme Mutationen. Das Verhältnis nicht-synonymer zu synonymen Polymorphismen könnte auf ein relativ geringes Level negativer, reinigender Selektion in Kartoffel, im Vergleich zu anderen Pflanzenspezies hindeuten (Simko *et al.* 2006). Es ist im *Stf3'5'h*-Gen der Kartoffel deutlich höher als beispielsweise 0,23 im Chromosom 1 von Mais (*Zea mays ssp. mays* L.) oder 0,26 in Mohrenhirse (*Sorghum*

bicolor). Dies könnte durch die autotetraploide Natur kultivierter Kartoffeln ohne Auswirkungen bleiben, in welcher nachteilige Allele durch die zusätzlichen Chromosomensätze gewissermaßen maskiert werden.

4.2.1.2.3. Beeinflussen regulatorische *Stf3'5'h*-Polymorphismen oder -Dosiseffekte die Farbvarianz von Kartoffelknollen?

Bei synonymen Substitutionen in kodierenden und Mutationen in nichtkodierenden DNA-Abschnitten handelt es sich nicht in jedem Fall zwangsläufig um stille Mutationen, da diese einen Einfluss auf die Transkription, das anschließende Spleißen, den Transport der mRNA und auf die Translation ausüben und somit zu einer phänotypischen Veränderung führen können (Goymer 2007). Beispielsweise können Mutationen in Introns Fehler beim Spleißen bewirken. Stumme Mutationen können zur Folge haben, dass sich die mRNA anders als gewöhnlich faltet und daher kaum oder zu stark translatiert wird. Aufgrund artspezifischer, differenzieller Codonverwendung könnten durch synonyme Mutationen zudem selten verwendete Codons entstehen, die weniger effizient translatiert werden. Solche Arten regulatorischer Einflüsse von Sequenzpolymorphismen konnten jedoch anhand der hier durchgeführten Analysen nicht untersucht werden.

Aus den hier gewonnenen Daten kann nicht darauf geschlossen werden, dass Dosiseffekte der detektierten *Stf3'5'h*-Allele auftreten. Abgesehen von Allel 1 und Allel #25_3 konnten alle Allele unter jeweils zwölf sequenzierten *Stf3'5'h*-Klonen pro Kartoffellinie nur einmal nachgewiesen werden. Allel #25_3 findet sich dabei nur in der gelbfleischigen, blauschaligen Linie „Weinberger Blaue“ (#25), nicht aber in der vollständig blau-violett-knolligen Linie „Vitelotte“ (#57). Allel 1 kommt hingegen als einziges in allen untersuchten Linien vor und wurde insgesamt, jedoch auch innerhalb der Allele eines jeden Genotyps, am häufigsten detektiert. Dies untermauert die bereits erwähnte Vermutung, dass es sich bei Allel 1 möglicherweise um das ursprüngliche *Stf3'5'h*-Allel handeln könnte, aus dem die übrigen hier detektierten Allele durch Anhäufung von Mutationen im Laufe der Zeit hervorgingen (Abschnitt 4.2.1.2.2.). Unter den jeweils zwölf Klonen für Linien mit vollständiger Knollenpigmentierung tauchte das konservierte Allel 1 mit etwa gleicher Häufigkeit auf, unabhängig vom vorherrschenden Anthocyantyp. In Linie #16, welche nahezu keine blauen, delphinidinbasierten Anthocyane im Knollengewebe aufweist, ist das Allel 1 in acht von zwölf Klonen und in Linie #25, deren blau-violette Knollenschale immerhin etwa 72 %

Petunidinderivate enthält (Abb. 11), nur in vier von zwölf Klonen detektiert worden. In Anbetracht dessen scheint hier keine Wirkung des *Stf3'5'h*-Gens auf den Phänotyp zu bestehen, die von der Allelhäufigkeit (Alleldosis) im Genotyp abhängig ist. Nach heutigem Wissensstand der hohen Alleldiversität müssten diese Beobachtungen jedoch weiterführend durch die adäquate Analyse eines größeren Probensatzes zu sequenzierender *Stf3'5'h*-Klone pro Kartoffelgenotyp verifiziert werden.

Das Auftreten von mindestens zwei Banden im Southern Blot (Abb. 16), als Anzeichen für die Existenz mehrerer F3'5'H-Loci (erhöhte Gendosis), könnte durch eine verbesserte Anpassung an bestimmte Umweltfaktoren zur Steigerung der Fitness (Chalker-Scott 1999) erklärt werden. Durch das *Potato Genome Sequencing Consortium* (PGSC) wurde für Kartoffel eine extensive Variation der Genkopienzahlen aufgedeckt, mit Auswirkung auf etwa ein Drittel des gesamten Kartoffelgenoms, wobei nahezu 30 % der Gene einer zumindest teilweisen Duplikation oder Deletion unterliegen (Potato Genome Sequencing Consortium 2011). Dies lieferte weitere Hinweise auf die hohe heterogene Natur des Kartoffelgenoms. Weiterhin wurde durch das PGSC der Zusammenhang zwischen der Variation der Genkopienzahl und der pflanzlichen Anpassung durch eine Anreicherung von Gengruppen untermauert, welche für Funktionen der umweltbedingten Stressabwehr kodieren. Dabei scheinen Genduplikationen eine Rolle in der speziesspezifischen Ausdehnung stressassoziierter Genfamilien zu spielen (Hardigan *et al.* 2016). Diese Erkenntnisse stehen in Korrelation zu den hier vorliegenden Ergebnissen der Analysen des *Stf3'5'h*-Gens, dessen Genprodukt vermutlich ebenfalls an der Stressabwehr beteiligt ist.

4.2.1.3. Beobachtung einer möglichen genotypspezifischen Regulation der *StF3'5'H* auf DNA-Ebene

Bei der Sequenzanalyse einzelner *Stf3'5'h*-Allele der gelbfleischigen, rotschaligen Kartoffelsorte „Bangladesh“ (Linie #9), konnte eine Besonderheit zu den übrigen Allelen dieser Linie und zu allen detektierten Allelen weiterer vier phänotypisch kontrastierender Genotypen festgestellt werden. Allel #9_3 weist die Insertion eines transponierbaren Elements im ersten Exon auf, welches die Funktion der kodierten Flavonoid-3',5'-hydroxylase inaktiviert.

Transposons sind DNA-Abschnitte, die ihre Position im Genom verändern können (McClintock 1950). Sie sind in der Lage, spontan einen Genort zu verlassen, an anderer Stelle in die Erbinformation zu integrieren und so das betroffene Genom strukturell zu verändern. Transposons, die in die kodierende Sequenz eines Gens springen, führen in der Regel zu dessen Inaktivierung. Kommt es hingegen zur Integration im Promotor oder anderen regulatorischen Elementen, kann die Genexpression beeinflusst werden. Durch diese Eigenschaften stellen transponierbare Elemente eine Hauptursache für spontan auftretende Mutationen dar.

Bei dem in Allel #9_3 identifizierten Transposon handelt es sich vermutlich um eine MITE-Insertion (MITE, *miniature inverted-repeat transposable element*), welche üblicherweise eine Größe von unter 600 bp aufweisen. Das hier detektierte MITE umfasst 239 bp und zeigt für die Gruppe der sogenannten „blinden Passagiere“ (engl. *stowaway*) MITEs typische Charakteristiken. So besitzt es beispielsweise unvollkommene terminale, umgekehrte Sequenzwiederholungen (TIRs, *terminal inverted repeats*) der Konsensussequenz CTCCTCYGTC, sowie eine Duplikation der 2bp-großen TA-Zielsequenz der Insertionsstelle (Gesamtgröße der Insertion beträgt 239 + 2 bp) (Bureau und Wessler 1994). *In silico*-Analysen der aus Allel #9_3 potenziell hervorgehenden StF3'5'H-Proteinvariante zeigten sieben Aminosäuren (AS) auf, die von der aus Allel 1 hypothetisch resultierenden AS-Konsensussequenz abweichen. Diese sind innerhalb der ersten 29 als Membrananker fungierenden AS (Sakaguchi *et al.* 1984) lokalisiert und gehen als Resultat der MITE-Insertion im vorderen Drittel von Exon 1 hervor. Den zugrunde liegenden 21 Basenpaaren, die zu der veränderten Proteinsequenz führen würden, schließt sich ein Stopcodon als Bestandteil der Insertion an. Die resultierende StF3'5'H-Proteinvariante wäre demnach drastisch verkürzt auf nur 24 Aminosäuren und würde jeglicher für die Substraterkennung und Hydroxylierungsaktivität funktionaler Bereiche entbehren (Abb. 14). Allel #9_3 kodiert demnach nicht für ein funktionsfähiges F3'5'H-Protein.

Ein überaus interessanter Bezug zu der hier beschriebenen Entdeckung ergibt sich aus einer Studie von Momose *et al.* (2010). Dabei offenbarten genomische Analysen des *Stf3'5'h*-Gens in dem gelbfleischigen, rotschaligen, triploiden Kartoffelklon „72218“ die Insertion eines MITE (bezeichnet als *dTstu1*), das in Insertionsposition, Größe und Sequenz exakt dem hier in Allel #9_3 detektierten MITE gleicht. In dem von Momose und Kollegen untersuchten Klon konnte neben dem durch die Insertion modifizierten, aber ansonsten vollständigen, Allel

(*f3'5'h::dTstu1*, DDBJ-Akzession AB496977) außerdem die Existenz von zwei verkürzten Allelen festgestellt werden. Das dritte Allel (*f3'5'h3*) beinhaltet nur die letzte Hälfte des dritten Exons, welche für die Cytochrom-P450-Signatur (Häm-Bindedomäne nach Durst und Nelson 1995, siehe auch Abb. 14) kodiert, die unter allen bekannten F3'5'H-Enzymen konserviert ist. Dieses Motiv fehlt wiederum im zweiten Allel (*f3'5'h2*). Dies deutete in hohem Maße darauf hin, dass Transkripte bzw. resultierende Proteine dieser beiden Allele nicht funktionsfähig sind. Der rotschalige Klon „72218“ verfügt daher einzig über Pseudokopien des *Stf3'5'h*-Gens, während eine violette, somaklonale Variante dieses Klons, die triploide Kultur- und Handelssorte „Jaga kids purple“, neben den beiden verkürzten Allelen auch ein vollständiges, funktionsfähiges *Stf3'5'h*-Allel ohne die MITE-Insertion aufweist (benannt *F3'5'H::rev*, DDBJ-Akzession AB496976). Da *F3'5'H::rev* als einziges Allel zur Produktion eines vollständigen und funktionsfähigen Proteins führen kann, wurde hier angenommen, dass die Exzision von *dTstu1* aus *f3'5'h::dTstu1* während der Generierung von „Jaga kids purple“ und somit der F3'5'H-Funktionszugewinn die Hauptursache für die Farbänderung von rot zu violett darstellt. Pigmentanalysen bestätigten Pelargonidin als das Hauptanthocyanidin in rotem Knollengewebe von Kartoffelklon „72218“ und Petunidin als dominierendes Anthocyanidin in violetten Knollen des Kultivars „Jaga kids purple“. Durch Datenbankabgleiche gelang das Auffinden von Sequenzen mit Ähnlichkeit zu *dTstu1* in Genomen anderer Solanaceaeen wie beispielsweise Paprika, Tabak und Petunie.

Möglicherweise handelt es sich auch bei dem in dieser Arbeit in Kultivar „Bangladesh“ aufgespürten MITE um eines der von Momose *et al.* (2010) als „seltener Fall“ beschriebenen MITEs, die einen veränderten Phänotyp hervorrufen. Auch in „Bangladesh“ unterbricht das MITE das *Stf3'5'h*-Gen und könnte somit die Rotfärbung der Knollen dieser Linie bedingen. Jedoch ist hier der Sachverhalt weit weniger eindeutig als für den von Momose und Kollegen untersuchten triploiden Klon „72218“. Für den tetraploiden Kultivar „Bangladesh“ konnten im Zuge der vorliegenden Arbeit acht Allele identifiziert und mindestens zwei Genloci postuliert werden. Anders als bei der beschriebenen Referenzstudie kann hier nicht bestätigt werden, dass es sich bei dem transposontragenden Allel #9_3 um das einzige vollständige und ansonsten funktionsfähige *Stf3'5'h*-Allel handelt. Somit konnte auch nicht belegt werden, dass dessen Unterbrechung den Grund für den Verlust der Merkmalsausprägung blauer Knollen darstellt. Zumindest von einem der übrigen sieben Allele muss eine Funktionalität angenommen werden, da mittels MRM-basierter Analyse des roten Knollenschalengewebes von Linie #9 die Existenz blauer Anthocyane nachgewiesen werden konnte (Abb. 9). Wenn

auch nur in sehr geringen Mengen, so finden sich doch auch hier, ebenso wie in den übrigen untersuchten roten Knollengeweben, die beiden Anthocyane Delphinidin-3-*p*-coumaroylrutinosid-5-glucosid (A9) und Petunidin-3-*p*-coumaroylrutinosid-5-glucosid (A12). Zudem konnten Spuren zweier Malvidinderivate (A16 und A19, Tab. 2) detektiert werden. Dies liefert Hinweise auf die Beteiligung anderer regulatorischer Mechanismen, wobei nicht auszuschließen ist, dass die MITE-Insertion in Allel #9_3 einen Beitrag zur Repression der *StF3'5'H* in roter Knollenschale von „Bangladesh“ leistet.

Die Untersuchungen von Momose *et al.* (2010) enthüllten erstmals die Existenz eines aktiven *Stowaway*-MITEs in Dikotyledonen. *In-vitro*-Gewebe Kultivierung offenbarte sich bereits für verschiedene transponierbare Elemente als Ursache der Aktivierung, wobei z. B. der epigenetische Status durch DNA-Demethylierung des Elements selbst oder der entsprechenden transposasekodierenden Gene eine Rolle spielt (Peschke und Phillips 1991; Hirochika 1993; Kaeppler *et al.* 2000; Lisch 2009). So wurden auch die Beobachtungen von Momose *et al.* (2010) auf die Bedingungen bei der Gewebekultivierung zurückgeführt. Dabei fanden sich rote Knollen mit kleinen violetten Sektoren oder vollständig violette Knollen bei einigen aus Blattprotoplasten des Klons „72218“ regenerierten Pflanzen. Solche chimären oder violetten Knollen wurden jedoch nicht unter den durch Knollen vermehrten „72218“-Pflanzen gefunden, die im Feld aus Pflanzkartoffeln klonal reproduziert wurden. Im Gegensatz dazu zeigte eine zufällige Beobachtung während der Arbeiten zu der hier vorliegenden Studie erstmalig das Auftreten chimärer Knollen mit punktuell violetten Bereichen, bei knollenvermehrten Pflanzen (Appendix Abb. A10). In der roten Schale einiger Knollen der Kartoffelakzession „Rote Emmalie“ wurden violette Pigmentflecken beobachtet, die trotz fehlender Sequenzdaten für diese Linie auf eine Wiederherstellung der *F3'5'H*-Funktion durch die Exzision eines solchen aktiven Transposons hindeuten könnten.

4.2.1.4. Entwicklungs-, Gewebe- und Genotypabhängigkeit des *Stf3'5'h*-Transkriptlevels in Kartoffelknollen

Bei der visuellen Inspektion von Knollen diverser Genotypen konnte im Hinblick auf Farbe und Farbintensität kein offenkundiger Unterschied zwischen verschiedenen Stadien der Entwicklung festgestellt werden. Mit Hilfe quantitativer Expressionsanalysen konnte für diese Entwicklungsstadien jedoch eine deutliche Varianz im *Stf3'5'h*-Transkriptlevel ermittelt werden. Diese Beobachtung trifft für sämtliche hier analysierten anthocyanhaltigen

Gewebe zu, unabhängig von Gewebetyp (Fleisch oder Schale) sowie Geno- und Phänotyp (Farbe), und ist zudem konsistent mit den Ergebnissen früherer Studien der *Stf3'5'h*-Expression in anderen Pflanzenspezies (Wang *et al.* 2006; Ma *et al.* 2015). Die relativ geringe *Stf3'5'h*-Transkriptabundanz in sehr jungen (*Stadium 1*, Knollengröße ~2 x 2 cm) und in reifen (*Stadium 3*, ~5,5 x 6 cm) Knollen steht hierbei im Kontrast zu der teilweise um ein Vielfaches höheren Transkriptmenge in Geweben mit intermediärem Entwicklungsstand (*Stadium 2*, ~3,5 x 4 cm). Eine Erklärung für diese Beobachtung liefern die Erkenntnisse früherer Studien von Lewis *et al.* (1999), die eine vergleichbare Tendenz für die generelle Regulation der Anthocyanbiosynthese während der Knollenentwicklung offenbarten. Diese Studien belegen, dass mit zunehmender Knollengröße auch die Biosyntheserate der Anthocyane bis hin zu einem Maximum bei einer bestimmten, kultivarabhängigen Knollengröße steigt. Die Anthocyankonzentration bleibt dabei relativ konstant, da die Knollen zusätzlich zur Zellvermehrung durch Zellwachstum an Masse zulegen. So steigt bei zunehmender Knollengröße mit dem wässrigen Anteil auch das Verhältnis von Frischmasse zu Trockenmasse. Durch diesen Verdünnungseffekt ist trotz erhöhter Anthocyanproduktion visuell kein Unterschied zwischen frischen Knollen des frühen und Knollen des intermediären Knollenentwicklungsstadiums (*Stadium 1* und *2*) wahrnehmbar (Abb. 18). Bei weiterem Wachstum nimmt laut der Ergebnisse von Lewis *et al.* (1999) in den größeren Knollen (*Stadium 3*) die Anthocyanbiosyntheserate wieder ab. Dies würde wiederum für eine Verringerung der Expression von Schlüsselgenen der Anthocyanbiosynthese sprechen, wie sie hier für das *Stf3'5'h*-Gen in reifen Kartoffelknollen nachgewiesen werden konnte.

Ein weiterer deutlicher Unterschied im *Stf3'5'h*-Transkriptlevel ist für vollständig pigmentierte Phänotypen zwischen den beiden Gewebetypen Fleisch und Schale der selben Linie zu erkennen. So weisen die Knollenschalen, im Vergleich zu den zugehörigen Knollenfleischproben, durchgängig etwa die doppelte Transkriptmenge auf. Diese Beobachtung, die ebenfalls aus den Studien von Zhang *et al.* (2017) hervorging, könnte eine gewebespezifische Regulation der *Stf3'5'h*-Expression vermuten lassen. Auch hier besteht jedoch ein Bezug zum Gesamtanthocyanengehalt, der durch die Ergebnisse der MRM-basierten Anthocyanprofilanalyse bestätigt wurde. Dabei konnte für alle analysierten Schalenproben ein höherer Anthocyanengehalt ermittelt werden als für pigmentierte Fleischproben, unabhängig von Anthocyantyp bzw. Gewebefarbe. Demnach unterliegt nicht in erster Linie das *Stf3'5'h*-kodierende Gen einer gewebespezifischen Regulation. Viel mehr scheint der gesamte Prozess

der Anthocyanbiosynthese mit erhöhter Aktivität in der äußeren, schützenden Gewebeschicht der Kartoffelknollen abzulaufen (Yin *et al.* 2016; Zhang *et al.* 2017).

Wenngleich kein Unterschied in der gewebespezifischen Expression des *Stf3'5'h*-Gens zwischen kontrastierenden roten und blau-violetten Knollenphänotypen festgestellt wurde, so konnte ein solcher Unterschied doch zwischen verschiedenen Akzessionen bzw. Genotypen beobachtet werden. Während bei einigen Genotypen die Expression des *Stf3'5'h*-Transkriptes in beiden Knollengeweben (Fleisch und Schale) erfolgt, sind andere ausschließlich in der Lage zur *Stf3'5'h*-Transkriptexpression in der Knollenschale. Die Identifizierung von blauen/violetten, delphinidinbasierten Anthocyanen in Knollentrieben der gelbfleischigen, gelbschaligen Kartoffelakzession „Gala“, belegt die generelle Befähigung auch dieses Kultivars zur F3'5'H-basierten 3',5'-Hydroxylierung von Dihydroflavonolsubstraten. In Zusammenhang mit den Ergebnissen der Transkriptanalysen, die keinerlei Expression des *Stf3'5'h*-Gens in gelben Knollengeweben zeigen, bestätigen diese Beobachtungen das Auftreten einer genotypabhängigen Gewebespezifität der *Stf3'5'h*-Regulation auf DNA- oder transkriptioneller Ebene. Im speziellen Fall von Kultivar „Gala“ konnte weder in den Blättern, noch in den Stängeln und Blüten der adulten Pflanze die Akkumulation von Anthocyanen beobachtet werden. Angaben der europäischen Datenbank für Kulturkartoffelsorten (*European Cultivated Potato Database*) zeigen am Beispiel der gelbfleischigen, gelbschaligen Sorte „Maris Piper“ (meistangebaute Sorte in Großbritannien) eine ähnliche Spezifität der *Stf3'5'h*-Expression, hier jedoch durch das Auftreten tief violetter Blüten. In beiden Fällen ist die Gewebespezifität der F3'5'H vermutlich auf eine unterschiedliche Regulation durch bestimmte Transkriptionsfaktoren zurückzuführen, welche die Expression des *Stf3'5'h*-Strukturgens kontrollieren und somit das Muster (Zell- und Gewebespezifität) der Anthocyanbiosynthese beeinflussen. Auch die Intensität der Pigmentierung unterliegt dabei wahrscheinlich der Kontrolle durch spezifische Transkriptionsfaktoren. So zeigte der direkte Vergleich ein deutlich höheres Ausmaß der Anthocyanakkumulation in Lichtkeimen als in Dunkelkeimen der Linie „Gala“.

Phänotypen mit ähnlicher Anthocyankomposition zeigen starke Unterschiede in der *Stf3'5'h*-Transkriptabundanz, sowohl für Knollenfleisch als auch für Knollenschale. So konnte bei der Analyse des intermediären Knollenentwicklungsstadiums (*Stadium 2*) beispielsweise in roten Geweben der Linie #16 ein etwa zweifach höheres *Stf3'5'h*-Transkriptlevel festgestellt werden, als in den entsprechenden roten Geweben der Linie #49. In den blauen Geweben der

Linie #2, im Vergleich zu Line #57, wurde sogar ein bis zu etwa sechsfach erhöhtes Transkriptlevel ermittelt. Somit konnte neben der Entwicklungs- und Gewebeabhängigkeit der *Stf3'5'h*-Expression, auch eine Abhängigkeit vom jeweiligen Genotyp aufgezeigt werden. Bei Betrachtung der Metabolitdaten konnte jedoch auch im Hinblick auf diese Genotypspezifität eine positive Korrelation zum Gesamtanthocyangehalt festgestellt werden. Dementsprechend weisen Genotypen mit höherem Anthocyangehalt zumeist ein höheres *Stf3'5'h*-Transkriptlevel auf, unabhängig von Anthocyankomposition bzw. Gewebefarbe.

4.2.1.5. Unterschiede in der *Stf3'5'h*-Transkriptabundanz verschiedener

Kartoffelknollenproben zeigen keinen offensichtlichen Bezug zu deren Anthocyankomposition und Färbung

Anhand von qRT-PCR-Analysen konnte gezeigt werden, dass die relative *Stf3'5'h*-Transkriptmenge in Kartoffelknollen in Zusammenhang zu Entwicklungsstadium, Gewebetyp und Genotyp steht. Eine Verbindung zum Knollenphänotyp hinsichtlich farbgebender Anthocyankomposition konnte jedoch nicht festgestellt werden. Gemäß den Erkenntnissen früherer Studien der *Stf3'5'h*-Transkriptabundanz in Kartoffelknollen (Jung *et al.* 2005; Jung *et al.* 2009), wurde in allen analysierten gelben Geweben kein *Stf3'5'h*-Transkript gemessen (#9 F, #25 F, #58 F und S). Diese Beobachtung ist unabhängig davon, ob das entsprechende andere, zugehörige Gewebe derselben Knolle pigmentiert ist und über welchen Anthocyanotyp dieses gegebenenfalls verfügt. Im Gegensatz dazu wird das *Stf3'5'h*-Gen in allen untersuchten anthocyanhaltigen Geweben exprimiert, was ebenfalls mit den Ergebnissen der Studien von Jung *et al.* im Jahr 2005 und 2009 übereinstimmt. Für rote und blau-violette Knollengewebe konnte, unter Berücksichtigung des Gesamtanthocyangehaltes (Appendix Abb. A9), eine etwa vergleichbare *Stf3'5'h*-Transkriptabundanz festgestellt werden. Die Beobachtungen auf transkriptioneller Ebene der *Stf3'5'h*-Regulation liefern daher keine Erklärung für die Farbvariation zwischen den analysierten, kontrastierenden Kartoffellinien bzw. -geweben.

4.2.1.6. Die Regulation der *StF3'5'H* in anthocyanhaltigen Kartoffelknollen findet vermutlich auf einer der Transkription nachgeschalteten Ebene statt

Weder auf genomischer noch auf transkriptioneller Ebene konnten eindeutige Hinweise auf eine unterschiedliche Regulation der *F3'5'H* zwischen Kartoffelknollen mit differenzieller Anthocyankomposition festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass regulatorische Kontrollmechanismen in anthocyanhaltigen Kartoffelknollen erst auf nachgeschalteten Ebenen der *F3'5'H*-Genexpression ansetzen. Für gelbe Knollen offenbarte sich hingegen ein anderer Mechanismus. Die phytochemische Analyse von Knollentrieben zeigte, dass auch Kartoffelgenotypen mit gelben Knollen grundsätzlich in der Lage sind, blaue Pigmente und somit auch aktive *F3'5'H*-Enzyme zu bilden. In den gelben Kartoffelknollen konnte jedoch kein *Stf3'5'h*-Transkript gemessen werden. Dort findet, im Gegensatz zu anthocyanhaltigen Kartoffelknollen, die *F3'5'H*-Regulation demnach bereits auf einer frühen Ebene der Genexpression statt. Desweiteren könnte die hier beschriebene Diversität *StF3'5'H*-regulatorischer Mechanismen zwischen Kartoffelsorten mit bzw. ohne Anthocyanproduktion in den Knollenorganen auf epigenetische Ursachen wie Heterochromatisierung, DNA-Methylierung oder sonstige reversible Repression in einem oder mehreren an der Anthocyan synthese beteiligten Gene zurückzuführen sein. Die Untersuchung dieser Aspekte bietet demnach neue Schwerpunkte für weiterführenden Studien.

Ein *in silico*-Abgleich putativer *StF3'5'H*-Proteine, die aus der Expression der entsprechenden sequenzierten *Stf3'5'h*-Allele hervorgehen würden, zeigte mehrere mögliche Aminosäureaustausche in einigen dieser Proteine. Das solche Aminosäureaustausche entscheidenden Einfluss auf die Funktion eines Enzyms ausüben können zeigt das bereits eingangs (Abschnitt 1.1.4.1.) aufgeführte Beispiel der Petunien-DFR, bei der bereits eine einzige AS-Substitution in der Substratbindestelle die Substratspezifität des Enzyms stark verändern kann (Johnson *et al.* 2001). Gemäß den Erkenntnissen früherer Studien (Gotoh 1992; Seitz *et al.* 2007; Falginella *et al.* 2010; Dueholm *et al.* 2015) existieren sechs funktionelle Domänen im *F3'5'H*-Enzym (Abb. 14 a). Dazu zählen fünf putative Substraterkennungsstellen (SRSs, *substrate recognition sites*) für die Festlegung der Substratspezifität sowie eine für die spezifische 5'-Hydroxylierungsaktivität am Flavonoidmolekül bedeutsame Region (CR1, *candidate region 1*). Des Weiteren beinhaltet das Enzym einen N-terminalen, hydrophoben Bereich, zur Lokalisierung und Verankerung in der ER-Membran (Sakaguchi *et al.* 1984). An diesen Membrananker schließt sich eine

Prolin-reiche Region (PPGP-Motiv, Prolin-Prolin-Glycin-Prolin) an, die als Scharnier fungierend die Flexibilität des cytoplasmatischen, katalytischen Enzymabschnittes gewährleistet (Kusano *et al.* 2001). Die C-terminale Proteinregion verfügt zudem über ein sogenanntes EXXR-Motiv (Hasemann *et al.* 1995; Syed und Mashele 2014), zur Stabilisierung und zum Erhalt der tertiären Proteinstruktur, und eine Häm-Bindedomäne (Durst und Nelson 1995; Bak *et al.* 2011; Saxena *et al.* 2013). Die hier aufgeführten, ebenfalls funktionellen Bereiche CR1, PPGP- und EXXR-Motiv sowie die Häm-Bindedomäne werden als strukturell konservierte Regionen (SCRs, *structural conserved regions*) zusammengefasst. Die Übersetzung der ermittelten DNA- in AS-Sequenzen zeigte keine Abweichungen innerhalb der ersten 29 als Membrananker und Lokalisierungssignal fungierenden Aminosäuren. Ebenso scheint keine der allelischen Variationen eine Veränderung der AS-Sequenz innerhalb der SRSs zur Folge zu haben. Es wurden aber Unterschiede in jeweils einer SCR von zwei hypothetischen Proteinen der Linien „Bangladesh“ (#9) und „Weinberger Blaue“ (#25) festgestellt.

AS-Veränderungen, die innerhalb oder in unmittelbarer Nähe solcher konservierten funktionalen Bereiche auftreten, könnten vermutlich einen stärkeren Einfluss auf Proteinstruktur und -funktion nehmen als die übrigen. Dies gilt im Besonderen, wenn dabei eine Veränderung der Seitenkettenchemie dieser AS vorliegt. Anhand einer zusätzlichen *in silico*-Proteinstrukturanalyse mittels Proteinstruktur-Homologie-Modelling konnte jedoch kein Unterschied zwischen den putativen *StF3'5'H*-Strukturmodellen festgestellt werden. Es bestehen demnach bislang keine Hinweise auf eine Beeinträchtigung der korrekten Faltung der Proteine, deren Lokalisierung und Einbau am Wirkungsort (ER-Membran) oder der Substraterkennung und Proteinfunktion bzw. -aktivität. Eine Ausnahme bildet dabei die Insertion des MITE in Exon 1 des Allel #9_3, das infolge eines dadurch eingefügten Stopcodons letztlich in einem verkürzten, nichtfunktionsfähigen Protein resultieren würde.

Sieben von zehn auf DNA-Ebene ermittelten Sequenzunterschieden innerhalb proteinkodierender Bereiche würden *in silico* in einer Veränderung dieser Proteinsequenz resultieren. Um eindeutig zu prüfen, ob die ermittelten Veränderungen in den AS-Sequenzen der theoretischen *StF3'5'H*-Enzyme Auswirkung auf deren strukturelle Beschaffenheit und somit auf die Enzymeigenschaften und -aktivität haben, sind zusätzlich zu diesen *in silico*-Analysen auch weiterführende Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung der nativen Proteine nötig. Dafür könnten zunächst Enzymassays der *StF3'5'H* anhand der

mikrosomalen Proteinfraktion aus Kartoffelknollengewebe durchgeführt werden. Zur spezifischeren Analyse verschiedener Proteinvarianten könnten dann die mikrosomalen Fraktionen für solche Enzymassays auch durch heterologe Expression einzelner *StF3'5'H*-Allele in einem geeigneten Expressionssystem gewonnen werden. Beispielsweise wiesen Pompon *et al.* (1996) und Batard *et al.* (1998) bereits die erfolgreiche Expression nativer, funktionsfähiger, pflanzlicher CYPs in Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) nach.

4.2.1.7. Auch rote Kartoffelknollengewebe beinhalten funktionale F3'5'H-Proteine

Die LC-MS-basierte Analyse mikrosomaler Proteine, nach elektrophoretischer Auftrennung dieser im Proteingel, ermöglichte den Nachweis der *StF3'5'H* in blau-violetterm und in rotem Kartoffelknollengewebe (Abb. 24). In gelbem Knollengewebe konnte das *StF3'5'H*-Protein hingegen nicht detektiert werden. Somit wurde für alle drei farblich kontrastierenden Knollengewebe ein Zusammenhang zwischen den zuvor ermittelten F3'5'H-Transkript- und den F3'5'H-Proteindaten festgestellt. Diese spiegelt sich durch die Detektion 3',5'-hydroxylierter Anthocyane in blau-violetterm und in rotem Gewebe, nicht aber in gelbem Gewebe, ebenfalls in den Metabolitdaten wider. Im Gegensatz zu roten Knollengeweben, in denen blaue/violette Anthocyane nur in geringen Mengen detektiert wurden (z. B. ~0,2 % „Königspurpur“ Fleisch, Anthocyanprofilgruppe 6 F), offenbarte die MRM-gestützte Anthocyanprofilanalyse Petunidin- und Malvidinderivate als Hauptpigmente in blau-violetten Knollengeweben (beispielsweise ~99 % „Vitelotte“ Fleisch, Anthocyanprofilgruppe 4 F). Das F3'5'H-Protein liegt demnach offensichtlich in beiden farblich kontrastierenden Geweben (blau-violett und rot) in aktiver Form vor, weist jedoch scheinbar eine weit höhere Aktivität in blau-violetterm Kartoffelgewebe auf.

Die LC-MS-Analyse des F3'5'H-Proteins lieferte einen Anhaltspunkt dafür, dass regulatorische Kontrollmechanismen für dieses Protein in anthocyanhaltigen Kartoffelknollen erst auf Proteinebene eingreifen. Posttranslationale Proteinmodifikationen sind z. B. an der Aufrechterhaltung der korrekten Funktionsweise diverser Cytochrom-P450-Proteine beteiligt (Aguiar *et al.* 2005). Dabei wurden in früheren Studien vor allem Phosphorylierung, Glycosylierung und Ubiquitinierung von CYPs beschrieben. Deren physiologische Signifikanz beinhaltet u. a. die Modulation der Enzymaktivität und die Markierung zur Proteasomendegradation dieser Proteine. Im Hinblick auf die Regulation der *StF3'5'H* als CYP-Protein könnte demnach eine Beteiligung solcher Proteinmodifikationen in rotem

Knollengewebe beispielsweise in einer Beeinträchtigung der Enzymaktivität resultieren. Ebenso wäre es denkbar, dass in roten Kartoffelknollengewebe eine Reduktion der F3'5'H-Abundanz zur Regulation des physiologischen Levels durch deren Ubiquitinierung und die anschließende proteasomabhängige Degradation erfolgt.

Eine absolute Quantifizierung der StF3'5'H in den verschiedenfarbigen Knollenproben war mit der hier angewandten LC-MS-Methode nicht möglich. Unabhängig von der Art möglicher Proteinmodifikation können sich aus diesen diverse Schwierigkeiten für die massenspektrometrische Analyse ergeben, deren Ausmaß von verschiedenen Faktoren abhängig ist. Dabei spielen u. a. die Verschiebung in der Molekülmasse (*mass shift*) des Peptids, die Gesamtabundanz modifizierter Peptide, die Stabilität der Modifikation(en) während der MS sowie der Einfluss der Modifikation(en) auf die Ionisierungseffizienz des Peptids und somit auch deren Effekt auf die Sensitivität der Messung eine Rolle (Parker *et al.* 2010). Sollten tatsächlich posttranslationale Modifikationen vorliegen, so könnten beispielsweise einige solcher veränderten StF3'5'H-Proteine der MS-Detektion schlichtweg entgangen sein. Da nur Proteingelfragmente mit Proteinen eines bestimmten Molekülmassenbereiches zwischen 48-62 kDa für die MS-Analyse eingesetzt wurden ist es darüber hinaus möglich, dass modifizierte und in ihrer Molekülmasse veränderte StF3'5'H-Proteine bereits bei vorbereitenden Arbeitsschritten nicht miterfasst wurden. Eine weitere Limitierung der angewandten Methode liegt in der Fragmentierung des analysierten Molekülmassenbereiches des vorangestellten Proteingels. Durch die Zerteilung des entsprechenden Gelabschnittes in Gelstücke mit spezifischerem Massenbereich erfolgte eine Fragmentierung der F3'5'H-Bande und somit die Verteilung auf einige der kleineren Gelstücke. Dies bedingt wiederum eine gleichsame Fragmentierung der entsprechenden Peptidsignalwerte bzw. -intensitäten, die in Gelstücken mit Randbereichen der F3'5'H-Bande den Signifikanzschwellenwert unterschreiten und daher der Detektion entgangen sein könnten. Aus genannten Gründen könnte für zukünftige Vorhaben der zuverlässigen Detektion und Quantifizierung des StF3'5'H-Proteins in Kartoffelknollengewebe eine alternative Nachweismethode, wie beispielsweise die zielgerichtete LC-MS/MRM, genutzt werden. Dabei kann durch die Selektion und Fragmentierung der Zielmoleküle während der Messung eine spezifische Detektion gewährleistet werden.

4.2.2. Welche anderen Einflussgrößen bestimmen die Regulation der Synthese blauer/violetter Anthocyane in Kartoffelknollen?

Eingangs der hier vorliegenden Arbeit wurde ein Modell (Abb. 4 b) mit grundlegenden Ebenen der *StF3'5'H*-Regulation vorgestellt. Diesbezüglich wurden verschiedene molekularbiologische Untersuchungen vorgenommen, wobei sich keine Unterschiede zwischen roten und blauen Knollengewebe ergaben, die deren unterschiedliche Anthocyanprofile erklären. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die *StF3'5'H* eine wichtige, wenn auch nicht die alleinige Schlüsselrolle im Biosyntheseweg blauer/violetter delphinidinbasierter Anthocyane einnimmt.

Aus früheren Studien bereits bekannt, sind nur die Pflanzen bzw. Gewebe grundsätzlich zur Synthese blauer/violetter Pigmente in der Lage, in denen das für die *F3'5'H* kodierende Gen exprimiert wird (Olsen *et al.* 2010). In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass dies jedoch nicht der einzig entscheidende Faktor ist, der in der Ausbildung blau-violetter Knollenphänotypen resultiert. Auch in rotem Knollengewebe wird das *Stf3'5'h*-Gen exprimiert und in das entsprechende *F3'5'H*-Protein umgesetzt (exemplarisch gezeigt für Linie #16 „Königspurpur“, siehe Abb. 24 a-c). Aus den Daten der Anthocyanprofilanalyse wird ersichtlich, dass *F3'5'H*-Aktivität in beiden farblich kontrastierenden Geweben auftritt. Jedoch wurden delphinidinbasierte Anthocyane, als entfernte Produkte der *F3'5'H*-abhängigen 5'-Hydroxylierung in diesem Stoffwechselweg vorgeschalteter Dihydroflavonole, in blau-violetter Knollengewebe mit rund 500-fach höherer Intensität detektiert als in rotem Knollengewebe (Angabe in Bezug auf den Anteil 5'-hydroxylierter Anthocyane an der Gesamtanthocyanzusammensetzung, entsprechend mit ~99 % in #57 F, zu ~0,2 % in #16 F, siehe Abb. 11). Dies liefert einen Hinweis auf die Beteiligung weiterer Faktoren, die neben der *F3'5'H*, bzw. direkter Kontrollmechanismen dieses Enzyms, die Regulation der Synthese blauer/violetter Anthocyane in Kartoffelknollen mitbestimmen und somit der *StF3'5'H*-Aktivität entgegenwirken könnten.

De Vetten *et al.* (1999) zeigten, dass Cytochrom b5 als Kofaktor der *F3'5'H* ein wichtiges Glied im Mechanismus der 5'-Hydroxylierung des Flavonoidgerüsts in Solanaceen darstellt (siehe auch Abschnitt 1.3.2.). Die Inaktivierung des Cyt b5-kodierenden *difF*-Gens in Petunie bewirkte dabei eine bis zu zwanzigfache Reduzierung der *F3'5'H*-Aktivität. Eine genotypspezifische Beeinträchtigung des Cyt b5-Proteins, die auf einer Verminderung der *difF*-Transkription beruht, oder Struktur und Funktion des Proteins betreffen könnte,

stellt demnach eine mögliche Ursache für den deutlich geringeren Gehalt 5'-hydroxylierter Anthocyane in roten Kartoffeln dar. Einige weitere Faktoren mit potenziellem Einfluss auf die Anthocyankomposition in Kartoffelknollengewebe werden im Folgenden diskutiert.

4.2.2.1. Vermutung der Konkurrenz zwischen *F3'5'H* und vorgeschalteten Enzymen im Anthocyan- beziehungsweise Flavonoidbiosyntheseweg

In verschiedenen Pflanzenspezies zeigen einige Enzyme des Flavonoidbiosynthesewegs Unterschiede in der Präferenz oder Spezifität für die entsprechenden Substrate und modulieren somit den Flux ihrer Substrate und Produkte in verschiedene Abzweigungen dieses Stoffwechselwegs. Auf dem Weg zur Synthese blauer und violetter Anthocyane werden die Dihydroflavonole Dihydrokaempferol (DHK) und Dihydroquercetin (DHQ) in Hydroxylierungsreaktionen durch die *F3'5'H* zu Dihydromyricetin (DHM) umgesetzt (Abb. 28). Die *F3'5'H* ist jedoch nicht das einzige Enzym im Flavonoidsyntheseweg, das diese Dihydroflavonole als Substrate nutzt. DHK, DHQ sowie auch DHM gelten auch als Substrate in einem der Anthocyan-synthese vorgeschalteten Abzweig der Flavonoidsynthese, bei dem sie durch das Enzym Flavonolsynthase (FLS) zu den entsprechenden Flavonolen Kaempferol, Quercetin und Myricetin umgesetzt werden (Abb. 3). Somit fungiert die *F3'5'H* als wichtiger Verzweigungspunkt zwischen Flavonol- und Anthocyanbiosynthese. Olsen *et al.* (2010) beschrieben in diesem Zusammenhang für die nahe verwandte Spezies *Solanum lycopersicum* eine Konkurrenz zwischen FLS und *F3'5'H* um die Substrate DHK und DHQ. Zudem stellten sie die Vermutung auf, dass die Konzentration von DHK und/oder DHQ möglicherweise einen Schwellenwert überschreiten muss, damit die *F3'5'H*-Aktivität in Kraft treten kann und dieses Enzym schließlich verstoffwechselt, was die Kapazität der FLS übersteigt. Aufgrund des hohen Verwandtschaftsgrades zwischen *S. lycopersicum* und der im Fokus dieser Arbeit stehenden Spezies *S. tuberosum* kann für beide *Solanum*-Arten ein ähnlicher Mechanismus postuliert werden. In Bezug auf die Regulation der Synthese blauer/violetter Anthocyane in Kartoffelknollen würde gemäß dieser Hypothese das Überschreiten des besagten Dihydroflavonolschwellenwertes nur in blau-violetten Knollen/Geweben erfolgen, wohingegen die Produktion dieser delphinidinbasierten Anthocyane in roten Knollen weitestgehend der Konkurrenz durch die FLS erliegt.

Die beiden Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenasen *F3'5'H* und *F3'H* kontrollieren kompetitiv die Synthese von Delphinidin und Cyanidin, den Vorstufen blauer/violetter und

rötlicher Anthocyane (Winkel-Shirley 2001a; Olsen *et al.* 2010). Beide Enzyme konkurrieren dabei um die Substratrekrutierung von DHK und leiten ihre 3',5'- bzw. 3'-OH-Produkte in die parallele Synthese von Delphinidin und Cyanidin. Variationen im Anthocyanprofil sind daher auch assoziiert mit Unterschieden im Verhältnis von F3'5'H- zu F3'H-Expression (Castellarin und Di Gaspero 2007; Castellarin *et al.* 2007). So könnte beispielsweise ein erhöhtes F3'H-Level in roten Knollengewebe die Synthese roter Anthocyane begünstigen und dabei gleichzeitig die Verringerung der Syntheserate blauer/violetter Anthocyane bedingen. Bei der exemplarischen Betrachtung der Metabolitdaten für die Kartoffelakkzession „Königspurpur“ (Linie #16) als Vertreter für rotfleischige, rotschalige Knollenphänotypen wird deutlich, dass diese zwar über eine erkennbare F3'H Aktivität in der Schale (enthält auf F3'H-Aktivität zurückzuführende cyanidinbasierte Anthocyane), nicht jedoch im Fleisch verfügt (Abb. 11 und Abb. 28). Demnach ist zumindest in dem roten Knollenfleisch der Linie #16 eine Konkurrenz zwischen F3'5'H und F3'H, bzw. die Unterdrückung der F3'5'H-Aktivität durch die Konkurrenz zur F3'H, als bestimmender Faktor für die Anthocyanzusammensetzung und Färbung eher unwahrscheinlich. Falls eine solche Beziehung zwischen den beiden Hydroxylaseenzymen in Knollen von *S. tuberosum* besteht, so ist diese scheinbar gewebespezifisch. Bei zusätzlicher Betrachtung der Anthocyanidinprofile für die Profilgruppen 4 S und 13 S (jeweils violette Knollenschale mit bzw. ohne cyanidinbasierte Anthocyane, siehe Abb. 28) deutet sich zudem eine Kultivarspezifität dieser postulierten Wechselbeziehung an. Der entscheidende Faktor für die Farbgebung der Knollengewebe scheint im Hinblick auf diese Hypothese jedoch vermutlich eher in einem F3'H-vorgeschalteten Schritt der Anthocyanbiosynthese zu liegen, da der Anteil F3'H-basierter Cyaninderivate in allen untersuchten Geweben im Allgemeinen viel geringer ist als der Anteil pelargonidinbasierter Anthocyane. Die F3'H kann demnach nicht alleinig farbbestimmend sein.

Als Ursache für die möglicherweise unterschiedliche Beteiligung der *St*F3'5'H an der Synthese blauer/violetter 5'-hydroxylierter Anthocyane in farblich kontrastierenden Kartoffelgeweben ist neben der bereits beschriebenen Konkurrenz dieser Hydroxylase zu anderen Enzymen auch eine Konkurrenz zwischen verschiedenen Stoffwechselabzweigungen mit F3'5'H-Beteiligung denkbar. Abgesehen von der Anthocyanbiosynthese ist die F3'5'H ebenfalls in andere Zweige der Flavonoidsynthese, wie der Flavon- und Flavonolbiosynthese, involviert (https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00941, Enzym 1.14.14.81). Sie akzeptiert dabei u. a. Naringenin, Eriodictyol, Apigenin, Luteolin, Kaempferol und

Quercetin als Substrate und katalysiert somit versatil eine Reihe von 3'- bzw. 5'-Hydroxylierungsreaktionen am B-Ring verschiedener Flavonoide (Stotz und Forkmann 1982; Kaltenbach *et al.* 1999; Olsen *et al.* 2010). Diese Theorie wird durch die Ergebnisse der LC-MS/MRM-basierten Metabolitprofilanalyse untermauert. Beispielsweise ist Luteolin (P29), welches nicht nur ein mögliches Substrat sondern auch ein Produkt der F3'5'H darstellen kann, deutlich stärker abundant in allen roten Knollengewebe, im Vergleich zu blau-violetten Knollengewebe (siehe auch Abschnitt 4.1.4.). Es zeigt dabei die höchste Intensität im Fleischgewebe der Anthocyanprofilgruppe 6 F, das mit ~0,2 % gleichfalls den niedrigsten Anteil blauer/violetter delphinidinbasierte Anthocyane enthält. Der gelbe Pflanzenfarbstoff Luteolin wird im Zuge der Flavonsynthese vermutlich aus Apigenin synthetisiert, katalysiert durch die 3'-Hydroxylaseaktivität der F3'5'H. In roten Knollengewebe findet demnach möglicherweise eine stärkere Einspeisung der F3'5'H in andere Stoffwechselwege sowie im Gegenzug eine geringere Beteiligung an der Biosynthese blauer/violetter Anthocyane statt.

4.2.2.2. Möglicher Einfluss *Sr*F3'5'H-nachgeschalteter Enzyme auf die Akkumulation blauer/violetter Anthocyane

Obwohl nicht ersichtlich an der Menge finaler delphinidinbasierter Anthocyanprodukte könnte die *Sr*F3'5'H in rotem Gewebe ebenso aktiv sein wie in blau-violetter Gewebe. Demnach könnte die *Sr*F3'5'H-katalysierte Synthese von Dihydromyricetin in beiden farblich kontrastierenden Knollengewebe in vergleichbarer Stärke ablaufen und erst nachgeschaltete Enzyme für die differenzielle Gewebefärbung verantwortlich sein (Abb. 4 b, Unterpunkt (5)).

DHK, DHQ und DHM sind die direkten Vorstufen von Pelargonidin, Cyanidin und Delphinidin (Abb. 3). Am Scheitelpunkt des Anthocyanbiosynthesewegs, der zur zusätzlichen Produktion blauer, delphinidinbasierter Anthocyane führt, stellen DHK und DHQ die Substrate der F3'5'H dar, während DHM als finales Produkt der F3'5'H-katalysierten Hydroxylierungsreaktionen hervorgeht (Abb. 4 a). Mittels LC-UV/MS-Metabolitprofilanalyse sollte überprüft werden, ob in farblich kontrastierenden Kartoffelknollengewebe ähnliche Mengen dieser Dihydroflavonole vorliegen. Dies würde eine Theorie vergleichbarer *Sr*F3'5'H-Aktivitäten unterstützen. Dabei konnten jedoch weder in roten noch in blau-violetten Gewebeproben diese konstitutiven Metabolite detektiert werden (Abb. 26). Bei der zusätzlichen Analyse von DHK anhand einer zielgerichteten LC-

MS/MRM-Methode gelang der Nachweis in roten Geweben zumeist nur im unteren Detektionsbereich (Abb. 9). Im Großteil der blau-violetten Gewebeproben konnte DHK nicht detektiert werden. Als Substrate der DFR, der F3'H und der F3'5'H sind DHK und DHQ bedeutsame Metabolite in beinahe allen anthocyanhaltigen Pflanzengeweben. Die Ergebnisse der LC-MS-basierten Analysen lassen daher vermuten, dass unabhängig vom Knollenphänotyp ein schneller Umsatz beider Dihydroflavonole erfolgt. Dies könnte gleichfalls für das F3'5'H-Produkt DHM zutreffen.

In blau-violetter Knollengewebe erfolgt der Umsatz von DHM in Delphinidin, das anschließend wahrscheinlich einer ebenso raschen Metabolisierung unterliegt. Delphinidinderivate sind daher kaum nachweisbar, obwohl sie, wie auch das DHM, in blau-violetter Gewebe offenkundig essenzielle Intermediate des Syntheseweges violetter Anthocyane des Petunidin- und des Malvidintyps darstellen (Abb. 3). In rotem Knollengewebe hingegen könnte DHM selbst, bzw. die Enzyme oder Produkte F3'5'H-nachgeschalteter Reaktionsschritte größtenteils nicht in die zusätzliche Biosynthese blauer/violetter Anthocyane, sondern in andere Stoffwechselabzweigungen der Flavonoidsynthese eingespeist werden (https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00941). So könnte einerseits der Flux von DHM in rotem Gewebe durch einen eventuell verstärkten Umsatz dieses Dihydroflavonols in das Flavonol Myricetin durch die Flavonolsynthase (FLS) (Abb. 3) in Richtung der Flavonolsynthese verschoben werden (siehe auch Abschnitt 4.2.2.1.). Weiterhin könnte beispielweise die Dihydroflavonol-4-reduktase (DFR) in roten Geweben DHK und DHQ präferenziell als Substrate bevorzugen und vorrangig an der Synthese von pelargonidin- und cyanidinbasierten Anthocyanen mitwirken. Andererseits ist es denkbar, dass das DFR-Enzym in diesen Geweben daneben auch vermehrt in die Reduktion der zur Gruppe der Flavanonole gehörenden 5-Deoxydihydroflavonole Garbanzol bzw. Fustin zu den entsprechenden 5-Deoxyleucoanthocyanidinen Deoxyleucopelargonidin oder Deoxyleucocyanidin (Halbwirth *et al.* 2003) eingeht. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass Leukodelphinidin, das als Produkt aus der Reduktion von DHM durch die DFR hervorgeht (Winkel-Shirley 1999), hauptsächlich der enzymatischen Reduktion zu Galocatechin durch die Leukoanthocyanidinreduktase (LAR) unterliegt (Abb. 3). Ebenso könnte das von der Anthocyanidinsynthase (ANS) durch Oxidation von Leukodelphinidin (Schijlen *et al.* 2004) gebildete Delphinidin durch die Anthocyanidinreduktase (AR) zu Epigallocatechin reduziert werden (Abb. 3). Immerhin gehören die Isomere (+)-Galocatechin und (-)-Epigallocatechin

zu den vier am häufigsten vorkommenden Substanzen der Gruppe der Catechine und kommen als Zwischenstufen der Biosynthese anderer sekundärer Pflanzenstoffe (Flavanderivate) in vielen pflanzlichen Geweben vor. Die Mengen der Dihydroflavonole, die tatsächlich in die Anthocyanbiosynthese eingehen, können demnach scheinbar durch eine Vielzahl unterschiedlicher Faktoren beeinflusst werden, deren Zusammenhänge bisher nicht im Einzelnen aufgeklärt sind.

Interessanterweise konnte im Knollengewebe der Linie #16, dem im Zuge dieser Arbeit meistuntersuchten Vertreter für rotfleischige, rotschalige Knollenphänotypen, im Vergleich zum blau-violetten Gewebe der Akzession „Vitelotte“ (#57), etwa die doppelte Menge des DFR-Proteins detektiert werden (Abb. 27). Der DFR kommt in rotem Gewebe daher potenziell eine besondere Rolle in der spezifischen Synthese roter pelargonidin- und cyanidinbasierter Anthocyane zu. Die Daten unterstützen die zuvor erwähnte Möglichkeit einer Substratpräferenz der DFR für DHK, bei der die vornehmliche Synthese von Pelargonidinderivaten vermutlich direkt aus DHK eingeleitet werden würde. Demnach wäre die DFR indirekt an der Herabregulation der F3'5'H-Aktivität beteiligt. Zusammengenommen deutet dies eher auf ein Wechselspiel zwischen den Schlüsselenzymen DFR und F3'5'H entsprechend ihrer Mengenverhältnisse hin, als auf eine Regulation der Synthese blauer/violetter Anthocyane durch nur eines dieser Enzyme.

Die LC-MS basierte Analyse mikrosomaler Präparate lieferte weitere Kandidaten F3'5'H-nachgeschalteter Proteine, die an der Regulation der Akkumulation blauer/violetter Anthocyane beteiligt sein könnten. Diese zeigten z. B. in dem blau-violetten Knollengewebe der Akzession „Vitelotte“ eine weit höhere Abundanz als im roten Knollengewebe der Akzession „Königspurpur“ (Tab. 6). Bei einem dieser Proteine handelt es sich um die Adenosinkinase Isoform 2S (PGSC0003DMP400054630, AdK (2S); Abb. 27 c), die mutmaßlich an der Kontrolle der Aufrechterhaltung von Methylierungsreaktionen im Anthocyanbiosyntheseweg beteiligt ist. Nur drei der sechs hauptsächlich in der Natur vorkommenden Anthocyanidine besitzen Methylsubstituenten am B-Ring (Hydrochinon-Ring) des Molekülgerüsts. Diese sind Peonidin (3'-OCH₃), Petunidin (3'-OCH₃) und Malvidin (3'-OCH₃, 5'-OCH₃), von denen letzteres über den stärksten Methylierungsgrad verfügt. Das Knollengewebe der Linie #57 weist mit ~40 % des Gesamtanthocyangehaltes im Fleisch und etwa 60 % in der Schale (Abb. 11) den höchsten Gehalt malvidinbasierter Anthocyane unter sämtlichen analysierten Kartoffelknollengeweben auf. Demzufolge

erfordert das Anthocyanprofil in den Knollen dieser Linie eine höhere Frequenz an Methylierungsreaktionen als in anderen blau-violetten und insbesondere den roten Knollengewebe diverser Akzessionen.

Die Methylierung von Sekundärmetaboliten, wie beispielsweise der Anthocyanidine bzw. Anthocyane, erfolgt durch S-Adenosylmethionin (SAM) -abhängige O-Methyltransferasen (Jonsson *et al.* 1983; Hugueney *et al.* 2009; Lücker *et al.* 2010). Bei dieser Transmethylierung wird die hochreaktive Methylgruppe von SAM (Methyl donor) auf das Flavonoid übertragen, wobei ein Molekül S-Adenosylhomocystein (SAH) entsteht. Diese Substanz gilt wiederum als potenter Inhibitor der SAM-abhängigen Methyltransferasen (Poulton 1981). In pflanzlichen Geweben, welche durch SAM methylierte Substanzen wie z. B. Peonidin-, Petunidin- und Malvidinderivate akkumulieren, setzt der hohe Methylbedarf zu einer ausreichenden Menge des Substrates SAM voraus und zum anderen die Beseitigung des störenden Nebenproduktes SAH, um einer Rückkopplungsinhibierung der SAM-abhängigen Methyltransferasen vorzubeugen. In Spinat (*Spinacia oleracea*) und Arabidopsis untersuchten Weretilnyk und Kollegen in diesem Zusammenhang zwei Enzyme, die in den SAH-Metabolismus involviert sind (Weretilnyk *et al.* 2001). Die SAH-Hydrolase (SAHH) baut SAH zu Adenosin und Homocystein ab und die Adenosinkinase (AdK) katalysiert die anschließende Umwandlung von Adenosin zu Adenosinmonophosphat. Somit kann das Verhältnis zwischen SAM und SAH kontrolliert werden, welches vermutlich eine kritische Rolle bei der Regulation der Transmethylierungsaktivitäten spielt, wie es beispielsweise von Poulton und Butt für die Kaffeesäure-O-Methyltransferaseaktivität in Mangoldblättern (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*) postuliert wurde (Poulton und Butt 1975). Dabei konnten erhöhte SAHH- und AdK-Aktivitäten mit einer Erhöhung des Proteinlevels beider Enzyme in Verbindung gebracht werden, wie es für die AdK (2S) in blau-violettem Kartoffelknollengewebe, mit verstärkter Methylierungsaktivität, auch in der hier vorliegenden Arbeit beobachtet werden konnte. So wurde in Knollengewebe mit höherem Gehalt methylierter Anthocyane gleichfalls eine erhöhte AdK-Abundanz festgestellt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Gewebe mit höherem AdK-Gehalt in stärkerem Maße zur Methylierung von Anthocyanidinen/Anthocyanen befähigt sind. Somit bestünde in diesem Gewebe, trotz eventuell gleicher F3'5'H-Aktivität in farblich unterschiedlichen Kartoffelgeweben und somit unabhängig von dieser, ein höheres Potential zur Ausbildung blauer/violetter Petunidin- und Malvidinderivate.

Weiterhin wurden Protein-Kandidaten ausfindig gemacht, die am Transport bläulicher 3',5'-hydroxylierter Anthocyane in die Vakuole und somit an der Akkumulation dieser Pigmente beteiligt sein könnten. So zeigen sämtliche signifikant detektierten Untereinheiten der vakuolären H⁺-ATPase (V-Typ-ATPase) mit Abstand die höchste Abundanz in blauvioletterem Gewebe (Tab. 6), in welchem sie im Vergleich zu rotem Gewebe in etwa anderthalbfacher Menge vorkommen. V-ATPasen transportieren Protonen vom Cytosol in die Vakuole und sorgen somit u. a. für die Aufrechterhaltung des sauren pH-Wertes im Inneren der Vakuole (Ratajczak 2000). Diese sogenannten Protonenpumpen nutzen dabei die freiwerdende Energie aus der Hydrolyse von ATP zu ADP und Phosphat. Der bei diesem Prozess entstehende elektrochemische Protonengradient durch den Tonoplast dient dabei als treibende Kraft (*proton motive force*) für sekundäre, energieabhängige Transporter und wird zum Im- und Export anderer Moleküle, wie beispielsweise sekundärer Metabolite genutzt (Shiratake und Martinoia 2007). Zu den sekundären Transportern, die den Transport von Anthocyanen in die Vakuole steuern, zählen ABC (*ATP binding cassette*) - und MATE (*multidrug and toxin efflux*) -Transporter. Diese Transporterklassen nutzen einen H⁺-gekoppelten Flavonoidtransport und ihre Aktivitäten sind an die Protonengradienten gebunden, welche von den V-ATPasen generiert werden (Shiratake und Martinoia 2007). Ein Mechanismus für den differenziellen Transport unterschiedlich farbiger Anthocyane durch das Zusammenspiel von V-ATPasen und sekundären Transportern, wie er durch die erhöhte Abundanz dieser Anthocyanakkumulation-assoziierten Proteine in blauem Knollengewebe suggeriert wird, ist jedoch bisher nicht bekannt.

4.2.2.3. Komplexe Wechselwirkungen im Flavonoidbiosyntheseweg beeinflussen die differenzielle Ausprägung der Anthocyanprofile in Kartoffelknollen

Die unter 4.2.2.1. und 4.2.2.2. aufgeführten Proteine deuten eine wichtige Verbindung zur spezifischen Synthese bzw. der Akkumulation blauer/violetter, 3',5'-hydroxylierter Anthocyane in Kartoffelknollengewebe an. Entsprechende Zusammenhänge, die sich im differenziellen Detektionsprofil dieser Proteine abzeichnen, bekräftigen dabei die Annahme unterschiedlicher regulatorischer Mechanismen dieses Systems in farblich kontrastierenden Knollengeweben verschiedener Kartoffelakzessionen. Eine Reihe weiterer Enzyme scheint somit an der Ausbildung der sorten- und gewebecharakteristischen Anthocyankomposition beteiligt zu sein, wonach der StF3'5'H vermutlich nicht die alleinige Schlüsselfunktion in der

Ausprägung blau-violetter Knollenphänotypen zukommt. Zudem akzeptiert die F3'5'H viele verschiedene Substrate, darunter Flavone, Flavanone, Dihydroflavonole und Flavonole (Stotz und Forkmann 1982; Kaltenbach *et al.* 1999; Olsen *et al.* 2010) und ist in unterschiedlichem Maße auch in andere Zweige der Flavonoidbiosynthese involviert. Darüber hinaus wurden diverse Wechselwirkungen der F3'5'H und deren nachgeschalteter Enzyme mit anderen Enzymen der Flavonoidbiosynthese postuliert, welche vornehmlich der Konkurrenz um gemeinsame Substrate zuzuschreiben sind (Winkel-Shirley 1999; Winkel-Shirley 2001a; Olsen *et al.* 2010). Somit stellt die F3'5'H vermutlich einen wichtigen Verzweigungspunkt im komplexen System der Flavonoidbiosynthese dar, in welchem die Aktivitäten von FLS, F3'5'H, DFR und eventuell F3'H die Verteilung gemeinsamer Substrate und Produkte zwischen Flavonol- und Anthocyanbiosynthese regulieren (Olsen *et al.* 2010).

5. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation erfolgten Analysen der Anthocyankomposition und deren Regulation, mit speziellem Focus auf die Flavonoid-3',5'-hydroxylase (*StF3'5'H*), in verschiedenfarbigen tetraploiden Akzessionen von *Solanum tuberosum*. Dabei sollte geklärt werden, ob der *StF3'5'H* eine alleinige Schlüsselrolle bei der Bildung bläulicher delphinidinbasierter Pigmente zukommt und ob sich in verschiedenfarbigen Kartoffeln Hinweise auf eine unterschiedliche Regulation dieses Enzyms finden lassen.

Unter Verwendung des äußerst umfangreichen Kartoffelsortiments der IPK-Genbank wurden erstmalig in einer einzelnen Studie an 114 unterschiedlich gefärbten Kartoffelknollenproben (Fleisch und Schale) umfangreiche LC-MS-basierte Untersuchungen der Polyphenolkomposition durchgeführt, was letztlich zur Identifizierung von 24 Anthocyanprofilen führte. Besonders erwähnenswert ist hierbei die Detektion zweier Anthocyane, die bisher noch nicht für Kartoffelknollen beschrieben wurden. Diese wurden tentativ als Pelargonidin-feruloylxylosyl-glucosyl-galactosid und Cyanidin-3-*p*-coumaroylrutinoside-5-glucosid annotiert. Die erhobenen Daten wurden bereits publiziert (Oertel *et al.* 2017) und somit der akademischen und der züchterischen Forschung zugänglich gemacht. Außerdem bildeten sie die Basis für molekularbiologische Untersuchungen der *StF3'5'H* im weiteren Verlauf dieser Arbeit.

Die hier erstmals durchgeführte Analyse der allelischen Diversität am *Stf3'5'h*-Genlocus tetraploider Kartoffelkultivare offenbarte einen hohen Grad an Polymorphismen sowie Hinweise auf einen möglichen zweiten *Stf3'5'h*-Locus im Kartoffelgenom. Diese Indizien konnten durch weitere Untersuchungen in Form von Southern Blot Analysen untermauert werden. *In silico*-Analysen zeigten jedoch keine Auswirkungen dieser genomischen Diversität des *Stf3'5'h*-Gens auf die Proteinstruktur und lieferten keine Indizien für eine unterschiedliche *Stf3'5'h*-Regulation in roten und blauen Kartoffeln. Die Ergebnisse einer quantitativen *real time*-PCR-Analyse zeigten, dass *Stf3'5'h*-Transkriptlevel und Anthocyankomposition (roter oder blauer Knollenphänotyp) nicht korrelieren. Stattdessen konnte jedoch eine Abhängigkeit des *Stf3'5'h*-Transkriptlevels zur Knollenentwicklung (erhöht in intermediärem Entwicklungsstadium), zum Gewebetyp (erhöht in Knollenschale) und zur Kartoffelsorte festgestellt werden. Mittels LC-MS konnte das *StF3'5'H*-Protein sowohl in blau-violetter als auch in rotem Knollengewebe detektiert werden. In Anbetracht

sehr geringer Mengen delphinidinbasierter Anthocyane in roten Geweben deuten diese Ergebnisse auf zusätzliche Regulationsebenen der *StF3'5'H*-Aktivität hin. In diesem Zusammenhang deutet die Detektion größerer Mengen an Luteolin, einem Flavon das ebenfalls aus einer *F3'5'H*-katalysierten Reaktion hervorgeht, in roten Knollengeweben auf eine Konkurrenz der Synthese blauer/violetter 5'-hydroxylierter Anthocyane zu anderen Stoffwechselabzweigungen der Flavonoidbiosynthese hin. Die Detektion der etwa doppelten Menge an Dihydroflavonol-4-reduktase in rotem Gewebe erlaubt zudem die Vermutung, dass auch andere Enzyme im Anthocyanbiosyntheseweg einen Einfluss auf die Synthese der entsprechenden Pigmente haben.

Obwohl der *StF3'5'H* eine Schlüsselstellung in der Biosynthese blauer/violetter delphinidinbasierter Anthocyane in Kartoffelknollen gewiss ist, so konnte in der hier vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass diese nicht allein für die Ausbildung blau-violetter Knollenphänotypen verantwortlich sein kann.

6. Summary

In frame of this PhD thesis the anthocyanin composition and its regulation were analysed in differentially coloured tetraploid accessions of the species *Solanum tuberosum* focusing on the flavonoid 3',5'-hydroxylase (*StF3'5'H*) as a key enzyme in anthocyanin biosynthesis. Thereby it should be elucidated whether the *StF3'5'H* fulfills an exclusive key role during the production of delphinidin based bluish pigments and if there are indications for divergent regulation of this enzyme in the variously coloured potatoes.

Making use of the huge potato collection of the IPK gene bank comprehensive LC-MS based analyses on the polyphenolic composition of 114 differentially coloured potato tuber samples (flesh and peel) were conducted for the first time in a single study, leading to the identification of 24 individual anthocyanin profiles. Noteworthy is the detection of two anthocyanins previously not described for potato tuber, which were tentatively annotated as pelargonidin-feruloyl-xylosyl-glucosyl-galactosid and cyanidin-3-*p*-coumaroylrutinoside-5-glucosid. Collected data were published (Oertel *et al.* 2017) and thereby provided to academic and breeding research. Besides, these data lay the foundation for molecular analysis of the *StF3'5'H* in the ongoing process of this thesis.

In this study the allelic diversity of the *Stf3'5'h* gene in tetraploid potatoes was analysed in detail for the first time, revealing a high level of genomic polymorphism as well as indications for the existence of a putative second *Stf3'5'h* locus in the potato genome. This was further validated by southern blot analysis. However, *in silico* analyses did not show an impact of this genomic diversity on protein structure or gave other indications for a differential *Stf3'5'h* regulation in red and blue potatoes. Quantitative real time PCR analysis revealed that there is no correlation between *Stf3'5'h* transcript level and anthocyanin composition or tuber phenotype. Instead, dependency of the *Stf3'5'h* transcript level on developmental stage of the tuber (increased in intermediar tubers), tissue type (increased in tuber peel) and potato genotype was observed. Using LC-MS approaches the *StF3'5'H* protein was detected in blue as well as in red tuber tissue. Considering the low amounts of delphinidin derived anthocyanins in red tissues these results suggest additional regulatory levels of *StF3'5'H* activity.

In this regard the detection of large amounts of the flavone luteolin in red tuber tissue, which also results from a reaction catalysed by F3'5'H, suggests competitions between the synthesis of bluish 5'-hydroxylated anthocyanins and other branches of the flavonoid biosynthesis. Additionally, the detection of approximately twice the amount of dihydroflavonol 4-reductase in red tissue allows to speculate that also other anthocyanin biosynthetic enzymes influence the synthesis of the respective pigments.

Although the *St*F3'5'H does play a key role in the biosynthesis of blue delphinidin based anthocyanins in potato tuber, this study shows that the formation of the blue tuber phenotype can not be ascribed to the *St*F3'5'H enzyme alone.

7. Ausblick

Die im Zuge der vorliegenden Arbeit phytochemisch charakterisierten Kartoffelkultivare stellen ein wertvolles Mittel für die molekulare Analyse des genetischen Hintergrundes und der Regulation der Anthocyansenkettenmodifikation in zukünftigen Forschungsprojekten dar. Darüber hinaus bietet die hier auserlesene Genotypkollektion Material von hohem Wert für die Erforschung gewebespezifischer Akkumulation und Funktion der Anthocyane in Nutzpflanzen mit unterirdischen Speicherorganen.

Hier ermittelte Unterschiede in Anthocyanprofilen während verschiedener Anbauperioden sind vermutlich auf Umweltveränderungen während der Kultivierung zurückzuführen. Zudem wurde für Kreuzungspopulationen eine potenzielle Dominanz der Anthocyanprofile einiger Genotypen postuliert. Dies könnte wichtige Aspekte in künftigen Züchtungsprogrammen darstellen. Sowohl für zukünftige Untersuchungen von Umwelteinflüssen auf bestimmte Anthocyanprofile als auch für weiterführende Analysen bezüglich deren Vererbung sollten mehrjährige Studien durchgeführt und die Charakteristiken der Anthocyanprofile in Trendanalysen bewertet werden.

Aufbauend auf den hier erhobenen Daten zum *Stf3'5'h*-Genlocus, welche auf ein zweites *Stf3'5'h*-Gen hindeuten, sollten diese z. B. durch quantitative PCR verifiziert und erweitert werden. Auch die Re-Sequenzierung verschiedener Akzessionen würde zur Klärung dieser Frage beitragen können und zusätzlich möglicherweise Hinweise auf weitere, in *cis* oder *trans* wirkende, regulatorische Elemente geben können. Auch eine mögliche epigenetische Komponente könnte analysiert werden, indem so identifizierte CpG-Inseln im Bereich des *Stf3'5'h*-Locus oder anderen an der Anthocyan synthese beteiligten Genen auf ihren Methylierungsstatus hin untersucht werden.

LC-MS/MRM stellt die Methode der Wahl für die quantitative Analyse der *StF3'5'H* in Kartoffelknollengewebe dar. Dabei sollte das Auftreten möglicher post-translationaler Modifikationen berücksichtigt werden. In Erweiterung der hier durchgeführten Versuche könnten zusätzliche Kartoffelsorten in die Analyse integriert werden. So könnte z. B. durch die Einbeziehung mehrerer Sorten mit roten und mit blau-violetten Knollen ermittelt werden, ob die Beobachtungen genotypspezifisch sind, oder auch innerhalb eines Phänotyps zutreffen.

Sollten nachfolgende LC-MS/MRM-Analysen ähnliche *St*F3'5'H-Proteinabundanzen in rotem und blau-violetter Kartoffelknollengewebe aufzeigen, so könnte dies auf eine Regulation der *St*F3'5'H auf Proteinebene und beispielsweise auf eine Beeinträchtigung der Proteinfunktion oder -aktivität in rotem Gewebe hindeuten. In dem Fall könnte diese im Anschluss an den MRM-basierten Proteinnachweis in verschiedenfarbigen Knollen mit und ohne erkennbare F3'5'H-Aktivität anhand eines Enzymassays bestimmt werden. In diesem Zusammenhang wäre auch die Analyse verschiedener regulatorischer Ebenen des F3'5'H-Kofaktors Cyt b5 von Interesse.

Zusammengenommen lieferten die hier erhaltenen Ergebnisse Hinweise darauf, dass nicht ausschließlich die *St*F3'5'H für den Unterschied im Anthocyanprofil roter und blauer Kartoffelknollen verantwortlich sein kann. Um die Ursache für diesen Unterschied weiter aufzuklären, sollte zusätzlich die Regulation wichtiger Enzyme des Flavonoidstoffwechsels (Abschnitte 4.2.2.1. und 4.2.2.2.) untersucht werden. Dabei scheinen v. a. die FLS und die DFR von großer Bedeutung zu sein, für die bereits in früheren Studien anderer Pflanzenspezies eine Konkurrenz zur F3'5'H um die Dihydroflavonolsubstrate postuliert wurde.

I. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AdK	Adenosinkinase
AGMT	Anthocyanidinglycosid- <i>O</i> -methyltransferase (auch Anthocyan- <i>O</i> -methyltransferase)
ANOVA	Varianzanalyse (engl. <i>analysis of variance</i>)
ANS	Anthocyanidinsynthase
<i>aprt</i>	Adenin-Phosphoribosyltransferase
AR	Anthocyanidinreduktase
AS	Aminosäure
b	Basen
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA (engl. <i>complementary DNA</i>)
CE	Kollisionsenergie (engl. <i>collision energy</i>)
CoA	Acyl-Coenzym A
ct	Schwellenwertzyklus (engl. <i>cycle threshold</i>)
CV	Konusspannung (engl. <i>cone voltage</i>)
CYP	Cytochrom P450
DFR	Dihydroflavonol-4-reduktase
DHK	Dihydrokaempferol
DHM	Dihydroquercetin
DHQ	Dihydromyricetin
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DTE	Dithioerythrit
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>efl</i>	Elongationafactor 1- α
EIC	extrahiertes Ionenchromatogramm
engl.	englisch
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrosprayionisierung
F3H	Flavanon-3-hydroxylase
F3'H	Flavonoid-3'-hydroxylase
F3'5'H	Flavonoid-3',5'-hydroxylase
FLS	Flavonolsynthase
GLKS	Groß Lüsewitzer Kartoffel-Sortimente
HCA	zweifache Hierarchische Clusteranalyse (engl. <i>two-way hierarchical clustering analysis</i>)
InDel	Insertions-/Deletions- Polymorphismen
IRC	<i>inter-run calibration</i>
L2	cytoplasmatisches ribosomales Protein L2
LAR	Leukoanthocyanidinreduktase
LC	Flüssigchromatographie (engl. <i>liquid chromatography</i>)
LM	Laufmittel

MIQE	<i>minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments</i>
MITE	<i>miniature inverted-repeat transposable element</i>
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
MRM	multibles Reaktionsmonitoring (engl. <i>multiple reaction monitoring</i>)
mRNA	Boten-RNA (engl. <i>messenger RNA</i>)
MS	Massenspektrometrie
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese (1-D PAGE, eindimensionale PAGE)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PCA	Hauptkomponentenanalyse (engl. <i>principal component analysis</i>)
PDA	Photodiodenarray
<i>Pf</i>	<i>pigmented flesh</i> Genlocus
PGSC	<i>Potato Genome Sequencing Consortium</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (engl. <i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i>)
QTOF-MS	<i>quadrupole time of flight</i> Massenspektrometer
RF	Hochfrequenzspannung (engl. <i>radio frequency</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
RT	Retentionszeit (engl. <i>retention time</i>)
SAM	S-Adenosylmethionin
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAHH	SAH-Hydrolase
SCRs	strukturell konservierte Regionen (engl. <i>structural conserved regions</i>)
SD	Standardabweichung (engl. <i>standard deviation</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SE	Standardfehler (engl. <i>standard error</i>)
SNP	Einzelnukeotid-Polymorphismus (engl. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
SRS	Substraterkennungsstelle (engl. <i>substrate recognition site</i>)
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (engl. <i>Tris-buffered saline</i>)
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20
TF	Transkriptionsfaktor
TQMS	Triple-Quadrupol-Massenspektrometer
UDP	Uridindiphosphat
UHR-TOF-MS	<i>ultra-high resolution time-of-flight mass spectrometer</i>
UPLC	<i>ultra performance</i> Flüssigchromatographie
Vol	Volumen
V _{pp}	<i>peak-to-peak voltage</i>

II. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildungen

	Seite
Abb. 1: Pigmentvariation durch verschiedene Hydroxylierungs- und Methylierungsmuster am B-Ring des Flavonoidgerüsts.	1
Abb. 2: Variationen im Farbspektrum, hervorgerufen durch sekundäre Modifikationen, wie der Hydroxylierung durch verschiedene Enzyme.	2
Abb. 3: Schematische Übersicht des generellen Phenylpropanoidstoffwechsels.	7
Abb. 4: Die Flavonoid-3',5'-Hydroxylase (F3'5'H) als Schlüsselenzym der Anthocyanbiosynthese.	21
Abb. 5: Schema zum Gewächshausanbau und der Ernte von Kartoffelknollen unterschiedlicher Entwicklungsstadien.	25
Abb. 6: Schematischer Überblick der Arbeitsabläufe für das Metabolit-Screening farbiger Kartoffelgenotypen.	50
Abb. 7: Überlagernde Darstellung kontrastierender Anthocyanprofile zweier verschiedenfarbiger Kartoffelgenotypen, analysiert mittels LC-UV/MS.	51
Abb. 8: Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse von 114 Proben, gewonnen aus Knollenfruchtfleisch und -schale von 57 Kartoffelsorten.	52
Abb. 9: Ergebnis der zweifachen Hierarchischen Clusteranalyse, visualisiert anhand einer kombinierenden Darstellung aus Dendrogramm und Heatmap.	61
Abb. 10: Ergebnisse der Korrelationsanalyse nach Pearson, dargestellt in Form einer Heatmap.	63
Abb. 11: Fünf ausgewählte Kartoffelgenotypen, mit hoher Varianz in Anthocyankomposition und -akkumulationsmuster im Knollengewebe.	67
Abb. 12: <i>Solanum tuberosum</i> f3'5'h-Locus.	68
Abb. 13: Schematische Darstellung der <i>Stf3'5'h</i> -Allele in fünf ausgewählten, kontrastierenden Kartoffelakzessionen.	69
Abb. 14: Schematische Darstellung des aus 509 Aminosäuren bestehenden <i>StF3'5'H</i> -Proteins.	74
Abb. 15: Hypothetisches 3D-Strukturmodell des exemplarisch von Allel 1 abgeleiteten <i>StF3'5'H</i> Proteins.	76
Abb. 16: Southern Blot-Analyse zur Ermittlung der Kopienzahl des <i>Stf3'5'h</i> -Locus für fünf Kartoffelgenotypen.	78
Abb. 17: Auswahl zweier Kartoffelgenotypen mit hoher Varianz in Anthocyankomposition und -akkumulierungsmuster im Knollengewebe.	79
Abb. 18: Visuelle Analyse von Anthocyan Gehalt und -verteilung in Knollenschale und Knollenfleisch sieben repräsentativer Kartoffelakzessionen für drei Stadien der Entwicklung.	81

Abb. 19:	Gelelektrophoretische Überprüfung der RNA-Integrität.	82
Abb. 20:	Relative Abundanz des <i>Stf3'5'h</i> -Transkriptes in Knollengewebe sieben ausgewählter Kartoffelgenotypen während drei verschiedener Entwicklungsstadien.	83
Abb. 21:	Vorhersage transmembraner Helices in <i>StF3'5'H</i> .	85
Abb. 22:	Aminosäuresequenz des <i>StF3'5'H</i> -Peptides zur Generierung eines spezifischen Antikörpers und Validierung der Sequenzspezifität.	86
Abb. 23:	Ergebnis der Western Blot-Analyse zum Nachweis der <i>StF3'5'H</i> in farblich kontrastierenden Kartoffelknollengewebe.	88
Abb. 24:	LC-MS-basierte Detektion der <i>StF3'5'H</i> in blauem und rotem Kartoffelknollengewebe nach Konzentrierung des Analyten mittels SDS-PAGE.	90
Abb. 25:	Relative Abundanzen einiger ausgewählter, mittels LC-MS quantifizierter Proteine mit möglicher Assoziation zur Anthocyanbiosynthese.	94
Abb. 26:	Extrahierte Ionenchromatogramme (EICs) der drei Dihydroflavonole zeigen ein Defizit dieser Anthocyanvorstufen in blau-violetter und roter Fleisch reifer Kartoffelknollen.	96
Abb. 27:	F3'5'H-Aktivität in Kartoffelsorten mit gelben Knollen.	98
Abb. 28:	Schematische Übersicht des Anthocyanbiosynthesewegs in Kartoffelknollen.	108

Tabellen

	Seite	
Tab. 1:	19 ausgewählte farbige Kartoffelakzessionen für die quantitative Bewertung der Polyphenolkomposition mittels LC-MS/MRM.	55
Tab. 2:	MRM-Bedingungen für die quantitative Analyse von Kartoffelanthocyanen.	58
Tab. 3:	MRM-Bedingungen für die quantitative Analyse von Kartoffelpolyphenolen.	59
Tab. 4:	Beispiele für positive oder negative Korrelationen zwischen polyphenolischen Substanzen in Kartoffelknollen, bestätigt durch die Korrelationsanalyse nach Pearson.	64
Tab. 5:	Ausgewählte Daten zur Charakterisierung der <i>Stf3'5'h</i> -Allele fünf ausgewählter Kartoffelgenotypen.	70
Tab. 6:	Proteine mit möglicher Assoziation zu Anthocyanbiosynthese oder -akkumulation.	93

III. Literaturverzeichnis

- Abdulrazzak N, Pollet B, Ehrling J, Larsen K, Asnagli C, Ronseau S, Proux C, Erhardt M, Seltzer V, Renou J-P (2006) A coumaroyl-ester-3-hydroxylase insertion mutant reveals the existence of nonredundant meta-hydroxylation pathways and essential roles for phenolic precursors in cell expansion and plant growth. *Plant Physiology* 140 (1):30-48
- Aguiar M, Masse R, Gibbs BF (2005) Regulation of cytochrome P450 by posttranslational modification. *Drug Metabolism Reviews* 37 (2):379-404
- Albert NW, Davies KM, Lewis DH, Zhang H, Montefiori M, Brendolise C, Boase MR, Ngo H, Jameson PE, Schwinn KE (2014) A conserved network of transcriptional activators and repressors regulates anthocyanin pigmentation in eudicots. *The Plant Cell* 26 (3):962-980
- Albert NW, Lewis DH, Zhang H, Schwinn KE, Jameson PE, Davies KM (2011) Members of an R2R3-MYB transcription factor family in *Petunia* are developmentally and environmentally regulated to control complex floral and vegetative pigmentation patterning. *The Plant Journal* 65 (5):771-784
- Algarra M, Fernandes A, Mateus N, de Freitas V, da Silva JCE, Casado J (2014) Anthocyanin profile and antioxidant capacity of black carrots (*Daucus carota* L. ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) from Cuevas Bajas, Spain. *Journal of Food Composition and Analysis* 33 (1):71-76
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215 (3):403-410
- Ampomah YA, Friend J (1988) Insoluble phenolic compounds and resistance of potato tuber disc to *Phytophthora* and *Phoma*. *Phytochemistry* 27 (8):2533-2541
- Ananga A, Phills B, Ochieng J, Georgiev V, Tsolova V (2013) Production of anthocyanins in grape cell cultures: A potential source of raw material for pharmaceutical, food, and cosmetic industries. *The Mediterranean Genetic Code - grapevine and olive*:247-287
- Andersen ØM, Jordheim M (2006) The anthocyanins. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. CRC press:471-552
- Andersen ØM, Jordheim M (2010) Anthocyanins. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. eLS. John Wiley and Sons, Ltd, Chichester 12.
- Andersen ØM, Jordheim M (2013) Basic anthocyanin chemistry and dietary sources. *Anthocyanins in Health and Disease* 1:13-89
- Andersen ØM, Opheim S, Aksnes DW, Frøystein NÅ (1991) Structure of petanin, an acylated anthocyanin isolated from *Solanum tuberosum*, using homo- and hetero-nuclear two-dimensional nuclear magnetic resonance techniques. *Phytochemical Analysis* 2 (5):230-236
- Andre CM, Ghislain M, Bertin P, Oufir M, del Rosario Herrera M, Hoffmann L, Hausman J-F, Larondelle Y, Evers D (2007a) Andean potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) as a source of antioxidant and mineral micronutrients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (2):366-378
- Andre CM, Oufir M, Guignard C, Hoffmann L, Hausman J-F, Evers D, Larondelle Y (2007b) Antioxidant profiling of native Andean potato tubers (*Solanum tuberosum* L.) reveals cultivars with high levels of β -carotene, α -tocopherol, chlorogenic acid, and petanin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (26):10839-10849
- Appelhagen I, Wulff-Vester AK, Wendell M, Hvoslef-Eide A-K, Russell J, Oertel A, Martens S, Mock H-P, Martin C, Matros A (2018) Colour bio-factories: towards scale-up production of anthocyanins in plant cell cultures. *Metabolic engineering* 48:218-232
- Bagchi D, Sen C, Bagchi M, Atalay M (2004) Anti-angiogenic, antioxidant, and anti-carcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula. *Biochemistry (Moscow)* 69 (1):75-80
- Bak S, Beisson F, Bishop G, Hamberger B, Höfer R, Paquette S, Werck-Reichhart D (2011) Cytochromes P450. *The Arabidopsis Book*, American Society of Plant Biologists 9
- Batard Y, LeRet M, Schalk M, Robineau T, Durst F, Werck-Reichhart D (1998) Molecular cloning and functional expression in yeast of CYP76B1, a xenobiotic-inducible 7-ethoxycoumarin O-de-ethylase from *Helianthus tuberosus*. *The Plant Journal* 14 (1):111-120
- Baudry A, Heim MA, Dubreucq B, Caboche M, Weisshaar B, Lepiniec L (2004) TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of BANYULS and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 39 (3):366-380
- Beld M, Martin C, Huits H, Stuitje AR, Gerats AG (1989) Flavonoid synthesis in *Petunia hybrida*: partial characterization of dihydroflavonol-4-reductase genes. *Plant Molecular Biology* 13 (5):491-502

- Borkowski T, Szymusiak H, Gliszczyńska-Świgło A, Tyrakowska B (2005) The effect of 3-O-glycosylation on structural transformation of anthocyanins. *Food Research International* 38 (8):1031-1037
- Boss PK, Davies C, Robinson SP (1996) Expression of anthocyanin biosynthesis pathway genes in red and white grapes. *Plant Molecular Biology* 32 (3):565-569
- Bridle P, Timberlake C (1997) Anthocyanins as natural food colours-selected aspects. *Food Chemistry* 58 (1):103-109
- Brosch M, Yu L, Hubbard T, Choudhary J (2009) Accurate and sensitive peptide identification with Mascot Percolator. *Journal of Proteome Research* 8 (6):3176-3181
- Brouillard R (1982) Chemical structure of anthocyanins. IN: "Anthocyanins as Food Colors" (P. Markakis, Ed.). Academic Press, New York:1-40
- Brown C, Wrolstad R, Durst R, Yang C-P, Clevidence B (2003) Breeding studies in potatoes containing high concentrations of anthocyanins. *American Journal of Potato Research* 80 (4):241-249
- Brown CR, Culley D, Bonierbale M, Amorós W (2007) Anthocyanin, carotenoid content, and antioxidant values in native South American potato cultivars. *HortScience* 42 (7):1733-1736
- Burbulis IE, Winkel-Shirley B (1999) Interactions among enzymes of the Arabidopsis flavonoid biosynthetic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (22):12929-12934
- Bureau TE, Wessler SR (1994) Stowaway: a new family of inverted repeat elements associated with the genes of both monocotyledonous and dicotyledonous plants. *The Plant Cell* 6 (6):907-916
- Burlingame B, Mouillé B, Charrondiere R (2009) Nutrients, bioactive non-nutrients and anti-nutrients in potatoes. *Journal of Food Composition and Analysis* 22 (6):494-502
- Burton W (1989) The potato: Third Editon. Longman Scientific and Technical New York
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 55 (4):611-622
- Butelli E, Titta L, Giorgio M, Mock H-P, Matros A, Peterek S, Schijlen EG, Hall RD, Bovy AG, Luo J (2008) Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. *Nature Biotechnology* 26 (11):1301-1308
- Carvalho E, Fraser PD, Martens S (2013) Carotenoids and tocopherols in yellow and red raspberries. *Food Chemistry* 139 (1):744-752
- Castaneda-Ovando A, de Lourdes Pacheco-Hernández M, Páez-Hernández ME, Rodríguez JA, Galán-Vidal CA (2009) Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* 113 (4):859-871
- Castellarin SD, Di Gaspero G (2007) Transcriptional control of anthocyanin biosynthetic genes in extreme phenotypes for berry pigmentation of naturally occurring grapevines. *BMC Plant Biology* 7 (1):46
- Castellarin SD, Pfeiffer A, Sivilotti P, Degan M, Peterlunger E, Di Gaspero G (2007) Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in ripening fruits of grapevine under seasonal water deficit. *Plant, Cell and Environment* 30 (11):1381-1399
- Chalker-Scott L (1999) Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochemistry and Photobiology* 70:1-9
- Chang W-C, Lee T-Y, Huang H-D, Huang H-Y, Pan R-L (2008) PlantPAN: Plant promoter analysis navigator, for identifying combinatorial cis-regulatory elements with distance constraint in plant gene groups. *BMC Genomics* 9 (1):561
- Chiu L-W, Zhou X, Burke S, Wu X, Prior R, Li L (2010) The purple cauliflower arises from activation of a MYB transcription factor. *Plant Physiology* 154 (3):1470-1480
- Clifford MN (2000) Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80 (7):1063-1072
- Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21 (18):3674-3676
- Dangles O, Saito N, Brouillard R (1993) Anthocyanin intramolecular copigment effect. *Phytochemistry* 34 (1):119-124
- De Jong H (1987) Inheritance of pigmented tuber flesh in cultivated diploid potatoes. *American Potato Journal* 64 (7):337-343
- De Jong W, De Jong D, De Jong H, Kalazich J, Bodis M (2003) An allele of dihydroflavonol 4-reductase associated with the ability to produce red anthocyanin pigments in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 107 (8):1375-1383
- de Vetten N, Quattrocchio F, Mol J, Koes R (1997) The an11 locus controlling flower pigmentation in petunia encodes a novel WD-repeat protein conserved in yeast, plants, and animals. *Genes and Development* 11 (11):1422-1434

- de Vetten N, ter Horst J, van Schaik H-P, de Boer A, Mol J, Koes R (1999) A cytochrome b5 is required for full activity of flavonoid 3',5'-hydroxylase, a cytochrome P450 involved in the formation of blue flower colors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (2):778-783
- Dodds K, Long D (1955) The inheritance of colour in diploid potatoes: I. Types of anthocyanidins and their genetic loci. *Journal of Genetics* 53 (1):136-149
- Dong X, Braun EL, Grotewold E (2001) Functional conservation of plant secondary metabolic enzymes revealed by complementation of Arabidopsis flavonoid mutants with maize genes. *Plant Physiology* 127 (1):46-57
- Dueholm B, Krieger C, Drew D, Olry A, Kamo T, Taboureaux O, Weitzel C, Bourgaud F, Hehn A, Simonsen HT (2015) Evolution of substrate recognition sites (SRSs) in cytochromes P450 from Apiaceae exemplified by the CYP71AJ subfamily. *BMC Evolutionary Biology* 15 (1):122
- Durst F, Nelson DR (1995) Diversity and evolution of plant P450 and P450-reductases. *Drug Metabolism and Drug Interactions* 12 (3-4):189-206
- Eichhorn S, Winterhalter P (2005) Anthocyanins from pigmented potato (*Solanum tuberosum* L.) varieties. *Food Research International* 38 (8):943-948
- Espley RV, Hellens RP, Putterill J, Stevenson DE, Kutty-Amma S, Allan AC (2007) Red colouration in apple fruit is due to the activity of the MYB transcription factor, MdMYB10. *The Plant Journal* 49 (3):414-427
- Falginella L, Castellarin SD, Testolin R, Gambetta GA, Morgante M, Di Gaspero G (2010) Expansion and subfunctionalisation of flavonoid 3',5'-hydroxylases in the grapevine lineage. *BMC Genomics* 11 (1):562
- FAOSTAT, <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>, Durchschnittswerte für 1986-2016.
- Fischer M, Glomb MA (2015) *Moderne Lebensmittelchemie* 1. Auflage, Kapitel 1 „Lebensmittelinhaltsstoffe“:211.
- Forkmann G, Ruhnau B (1987) Distinct substrate specificity of dihydroflavonol 4-reductase from flowers of *Petunia hybrida*. *Zeitschrift für Naturforschung C* 42 (9-10):1146-1148
- Fournier-Level A, Hugueney P, Verriès C, This P, Ageorges A (2011) Genetic mechanisms underlying the methylation level of anthocyanins in grape (*Vitis vinifera* L.). *BMC Plant Biology* 11 (1):179
- Friedman M (1997) Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols. A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (5):1523-1540
- Furtado A (2014) RNA Extraction from Developing or Mature Wheat Seeds. In: Henry RJ, Furtado A (eds) *Cereal Genomics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol 1099. Springer, New York
- Gauche C, Malagoli EdS, Bordignon Luiz MT (2010) Effect of pH on the copigmentation of anthocyanins from Cabernet Sauvignon grape extracts with organic acids. *Scientia Agricola* 67 (1):41-46
- Gebhardt C, Ritter E, Debener T, Schachtschabel U, Walkemeier B, Uhrig H, Salamini F (1989) RFLP analysis and linkage mapping in *Solanum tuberosum*. *Theoretical and Applied Genetics* 78 (1):65-75
- Gerats A (1985) *Mutable systems: their impact on flavonoid synthesis in Petunia hybrida*. Ph. D. Thesis, University of Amsterdam
- Gopu V, Kothandapani S, Shetty PH (2015) Quorum quenching activity of *Syzygium cumini* (L.) Skeels and its anthocyanin malvidin against *Klebsiella pneumoniae*. *Microbial Pathogenesis* 79:61-69
- Goto T, Kondo T, Tamura H, Imagawa H, Iino A, Takeda K (1982) Structure of gentiodelphin, an acylated anthocyanin isolated from *Gentiana makinoi*, that is stable in dilute aqueous solution. *Tetrahedron Letters* 23 (36):3695-3698
- Gotoh O (1992) Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. *Journal of Biological Chemistry* 267 (1):83-90
- Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Williams TD, Nagaraj SH, Nueda MJ, Robles M, Talón M, Dopazo J, Conesa A (2008) High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Research* 36 (10):3420-3435
- Goymer P (2007) Genetic variation: Synonymous mutations break their silence. *Nature Reviews Genetics* 8 (2):92
- Guo Y, Qiu L-J (2013) Allele-specific marker development and selection efficiencies for both flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3',5'-hydroxylase genes in soybean subgenus *soja*. *Theoretical and Applied Genetics* 126 (6):1445-1455
- Hahlbrock K (1981) Flavonoids. In: Conn EE (ed) "The biochemistry of plants: a comprehensive treatise", vol 7. Secondary Plant Products. Academic Press, New York:425-456
- Halbwirth H, Martens S, Wienand U, Forkmann G, Stich K (2003) Biochemical formation of anthocyanins in silk tissue of *Zea mays*. *Plant Science* 164 (4):489-495

- Harborne J (1964) Plant polyphenols - XI.: The structure of acylated anthocyanins. *Phytochemistry* 3 (2):151-160
- Harborne J (1967) Comparative biochemistry of the flavonoids Acad. Press, London:1
- Harborne JB, Williams CA (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55 (6):481-504
- Hardigan MA, Crisovan E, Hamilton JP, Kim J, Laimbeer P, Leisner CP, Manrique-Carpintero NC, Newton L, Pham GM, Vaillancourt B (2016) Genome reduction uncovers a large dispensable genome and adaptive role for copy number variation in asexually propagated *Solanum tuberosum*. *The Plant Cell*, 28 (2):388-405
- Harrison HF, Peterson JK, Snook ME, Bohac JR, Jackson DM (2003) Quantity and potential biological activity of caffeic acid in sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] storage root periderm. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (10):2943-2948
- Hasemann CA, Kurumbail RG, Boddupalli SS, Peterson JA, Deisenhofer J (1995) Structure and function of cytochromes P450: a comparative analysis of three crystal structures. *Structure* 3 (1):41-62
- Hawkes JG (1990) The potato: evolution, biodiversity and genetic resources. Belhaven Press
- Hawkes JG (1992) History of the potato. In: The potato crop. Springer, Dordrecht:1-12
- He J, Giusti MM (2010) Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annual Review of Food Science and Technology* 1:163-187
- Hejtmánková K, Kotíková Z, Hamouz K, Pivec V, Vacek J, Lachman J (2013) Influence of flesh colour, year and growing area on carotenoid and anthocyanin content in potato tubers. *Journal of Food Composition and Analysis* 32 (1):20-27
- Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology* 8 (2):R19
- Heller W, Forkmann G (1994) Biosynthesis of Flavonoids. In: "The Flavonoids. Advances in Research since 1986" (J. B. Harborne, Ed.). Chapman and Hall, London:499-535
- Herrmann KM (1995) The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism. *Plant Physiology* 107 (1):7
- Hillebrand S, Naumann H, Kitzinski N, Köhler N, Winterhalter P (2009) Isolation and characterization of anthocyanins from blue-fleshed potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *Food* 3 (1):96-101
- Hillebrand S, Winterhalter P (2009) Pigmentierte Kartoffeln – alte Kartoffelsorten neu entdeckt? Die Aktuelle Wochenschau der Lebensmittelchemie (GDCh) Woche 8
- Hirochika H (1993) Activation of tobacco retrotransposons during tissue culture. *The EMBO Journal* 12 (6):2521-2528
- Hirsch CD, Hamilton JP, Childs KL, Cepela J, Crisovan E, Vaillancourt B, Hirsch CN, Habermann M, Neal B, Buell CR (2014) Spud DB: A resource for mining sequences, genotypes, and phenotypes to accelerate potato breeding. *The Plant Genome* 7 (1)
- Holton TA, Brugliera F, Lester DR, Tanaka Y, Hyland CD, Menting JG, Lu C-Y, Farcy E, Stevenson TW, Cornish EC (1993) Cloning and expression of cytochrome P450 genes controlling flower colour. *Nature* 366 (6452):276
- Holton TA, Cornish EC (1995) Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *The Plant Cell* 7 (7):1071
- Hopp W, Seitz HU (1987) The uptake of acylated anthocyanin into isolated vacuoles from a cell suspension culture of *Daucus carota*. *Planta* 170 (1):74-85
- Howard H (1970) Genetics of the potato *Solanum tuberosum*. Logos Press Ltd., London:126
- http://solanaceae.plantbiology.msu.edu/pgsc_download.shtml: *S. tuberosum* Group Phureja DM1-3 Assembly Version 3 DM, Version 4.04 Pseudomolecule Sequence
- <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>
- http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?pathway+sot00942
- <https://swissmodel.expasy.org>
- <https://www.uniprot.org/uniprot/C7AE94>
- Huguency P, Provenzano S, Verriès C, Ferrandino A, Meudec E, Batelli G, Merdinoglu D, Cheynier V, Schubert A, Ageorges A (2009) A novel cation-dependent O-methyltransferase involved in anthocyanin methylation in grapevine. *Plant Physiology* 150 (4):2057-2070
- Hunziker A (2001) Genera *Solanacearum*: the genera of Solanaceae illustrated, arranged according to a new system. ARG Gantner Verlag KG: Ruggell, Liechtenstein
- Innocenzi V, Arnone S, Lai A, Musmeci S, Gambino P (2004) Eliciting of Resistance against Potato Tuber Moth Larvae in Tubers of *Solanum tuberosum* (+) *S. pinnatisectum* Hybrids. In: Meeting of the Physiology Section of the European Association for Potato Research 684:135-142
- International Potato Center, <http://cipotato.org/potato/>

- Ishii G, Mori M, Umemura Y (1996) Antioxidative activity and food chemical properties of anthocyanins from the colored tuber flesh of potatoes. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology* 43 (8):962-966
- Jackson D, Roberts K, Martin C (1992) Temporal and spatial control of expression of anthocyanin biosynthetic genes in developing flowers of *Antirrhinum majus*. *The Plant Journal* 2 (4):425-434
- Janson CH (1983) Adaptation of fruit morphology to dispersal agents in a Neotropical forest. *Science (Washington)* 219 (4581):187-189
- Jin J-Q, Ma J-Q, Yao M-Z, Ma C-L, Chen L (2017) Functional natural allelic variants of flavonoid 3',5'-hydroxylase gene governing catechin traits in tea plant and its relatives. *Planta* 245 (3):523-538
- Johnson ET, Ryu S, Yi H, Shin B, Cheong H, Choi G (2001) Alteration of a single amino acid changes the substrate specificity of dihydroflavonol 4-reductase. *The Plant Journal* 25 (3):325-333
- Jones P, Vogt T (2001) Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta* 213 (2):164-174
- Jonsson LM, Donker-Koopman WE, Uitslager P, Schram AW (1983) Subcellular localization of anthocyanin methyltransferase in flowers of *Petunia hybrida*. *Plant Physiology* 72 (2):287-290
- Jozefowicz AM, Matros A, Witzel K, Mock H-P (2018) Mini-scale isolation and preparation of plasma membrane proteins from potato roots for LC/MS analysis. In: *Plant Membrane Proteomics*. Springer:195-204
- Jun JH, Liu C, Xiao X, Dixon RA (2015) The transcriptional repressor MYB2 regulates both spatial and temporal patterns of proanthocyanidin and anthocyanin pigmentation in *Medicago truncatula*. *The Plant Cell* 27 (10): 2860-2879
- Jung CS, Griffiths HM, De Jong DM, Cheng S, Bodis M, De Jong WS (2005) The potato P locus codes for flavonoid 3',5'-hydroxylase. *Theoretical and Applied Genetics* 110 (2):269-275
- Jung CS, Griffiths HM, De Jong DM, Cheng S, Bodis M, Kim TS, De Jong WS (2009) The potato developer (D) locus encodes an R2R3 MYB transcription factor that regulates expression of multiple anthocyanin structural genes in tuber skin. *Theoretical and Applied Genetics* 120 (1):45-57
- Jurd L, Asen S (1966) The formation of metal and "co-pigment" complexes of cyanidin 3-glucoside. *Phytochemistry* 5 (6):1263-1271
- Kaeppler SM, Kaeppler HF, Rhee Y (2000) Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. In: *Plant Gene Silencing*. Springer:59-68
- Käll L, Storey JD, MacCoss MJ, Noble WS (2007) Posterior error probabilities and false discovery rates: two sides of the same coin. *Journal of Proteome Research* 7 (1):40-44
- Kaltenbach M, Schröder G, Schmelzer E, Lutz V, Schröder J (1999) Flavonoid hydroxylase from *Catharanthus roseus*: cDNA, heterologous expression, enzyme properties and cell-type specific expression in plants. *The Plant Journal* 19 (2):183-193
- Kammerer D, Carle R, Schieber A (2003) Detection of peonidin and pelargonidin glycosides in black carrots (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 17 (21):2407-2412
- Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M (2015) KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Research*:1070
- Kim HJ, Park WS, Bae J-Y, Kang SY, Yang MH, Lee S, Lee H-S, Kwak S-S, Ahn M-J (2015) Variations in the carotenoid and anthocyanin contents of Korean cultural varieties and home-processed sweet potatoes. *Journal of Food Composition and Analysis* 41 (1):188-193
- Kim HW, Kim JB, Cho SM, Chung MN, Lee YM, Chu SM, Che JH, Kim SN, Kim SY, Cho YS (2012) Anthocyanin changes in the Korean purple-fleshed sweet potato, Shinzami, as affected by steaming and baking. *Food Chemistry* 130 (4):966-972
- Kiple KF, Ornelas KC (2000) *The Cambridge World History of Food, Volume One*. Cambridge University Press, Grande-Bretagne
- Koes R, Verweij W, Quattrocchio F (2005) Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends in Plant Science* 10 (5):236-242
- Kovinich N, Kayanja G, Chanoca A, Riedl K, Otegui MS, Grotewold E (2014) Not all anthocyanins are born equal: distinct patterns induced by stress in Arabidopsis. *Planta* 240 (5):931-940
- Kumar GM, Iyer S, Knowles NR (2007) Extraction of RNA from fresh, frozen, and lyophilized tuber and root tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (5):1674-1678
- Kusano K, Sakaguchi M, Kagawa N, Waterman MR, Omura T (2001) Microsomal P450s use specific proline-rich sequences for efficient folding, but not for maintenance of the folded structure. *The Journal of Biochemistry* 129 (2):259-269
- Lachman J, Hamouz K (2005) Red and purple coloured potatoes as a significant antioxidant source in human nutrition-a review. *Plant Soil and Environment* 51 (11):477

- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259):680
- Lescot M, Déhais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de Peer Y, Rouzé P, Rombauts S (2002) PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Research* 30 (1):325-327
- Lester R, Hasan S, Hawkes J, Nee M, Estrada N (1991) *Solanaceae III. (Taxonomy, Chemistry, Evolution)*. Royal Botanic
- Lewis CE, Walker JR, Lancaster JE (1999) Changes in anthocyanin, flavonoid and phenolic acid concentrations during development and storage of coloured potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79 (2):311-316
- Lewis CE, Walker JR, Lancaster JE, Sutton KH (1998) Determination of anthocyanins, flavonoids and phenolic acids in potatoes. I: Coloured cultivars of *Solanum tuberosum* L. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 77 (1):45-57
- Liakopoulos G, Nikolopoulos D, Klouvatou A, Vekkos K-A, Manetas Y, Karabourniotis G (2006) The photoprotective role of epidermal anthocyanins and surface pubescence in young leaves of grapevine (*Vitis vinifera*). *Annals of Botany* 98 (1):257-265
- Lila MA (2004) Anthocyanins and human health: an in vitro investigative approach. *BioMed Research International* 2004 (5):306-313
- Lisch D (2009) Epigenetic regulation of transposable elements in plants. *Annual Review of Plant Biology* 60:43-66
- Liu S, Ju J, Xia G (2014) Identification of the flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3',5'-hydroxylase genes from Antarctic moss and their regulation during abiotic stress. *Gene* 543 (1):145-152
- Liu Y, Lin-Wang K, Espley RV, Wang L, Yang H, Yu B, Dare A, Varkonyi-Gasic E, Wang J, Zhang J (2016) Functional diversification of the potato R2R3 MYB anthocyanin activators AN1, MYBA1, and MYB113 and their interaction with basic helix-loop-helix cofactors. *Journal of Experimental Botany* 67 (8):2159-2176
- Lopez-Lazaro M (2009) Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 9 (1):31-59
- Lücker J, Martens S, Lund ST (2010) Characterization of a *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon 3', 5'-O-methyltransferase showing strong preference for anthocyanins and glycosylated flavonols. *Phytochemistry* 71 (13):1474-1484
- Ma LL, Wang XN, Jia WJ, Duan Q, Cui GF, Wang JH (2015) Cloning and expression pattern analysis of *Av-F3'5'H* gene from *Aconitum vilmorinianum*. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences* 28 (6):2438-2443
- Machida-Hirano R (2015) Diversity of potato genetic resources. *Breeding Science* 65 (1):26-40
- Mano H, Ogasawara F, Sato K, Higo H, Minobe Y (2007) Isolation of a regulatory gene of anthocyanin biosynthesis in tuberous roots of purple-fleshed sweet potato. *Plant Physiology* 143 (3):1252-1268
- Manza LL, Stamer SL, Ham AJL, Codreanu SG, Liebler DC (2005) Sample preparation and digestion for proteomic analyses using spin filters. *Proteomics* 5 (7):1742-1745
- Martin C, Prescott A, Mackay S, Bartlett J, Vrijlandt E (1991) Control of anthocyanin biosynthesis in flowers of *Antirrhinum majus*. *The Plant Journal* 1 (1):37-49
- Mateus N, de Pascual-Teresa S, Rivas-Gonzalo JC, Santos-Buelga C, de Freitas V (2002) Structural diversity of anthocyanin-derived pigments in port wines. *Food Chemistry* 76 (3):335-342
- Mattoo AK, Shukla V, Fatima T, Handa AK, Yachha SK (2010) Genetic engineering to enhance crop-based phytonutrients (nutraceuticals) to alleviate diet-related diseases. In: *Bio-Farms for Nutraceuticals*. Springer:122-143
- Mazza G (2007) Anthocyanins and heart health. *Annali - Istituto Superiore di Sanità* 43 (4):369
- Mazza G, Brouillard R (1990) The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions. *Phytochemistry* 29 (4):1097-1102
- McClintock B (1950) The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 36 (6):344-355
- Mol J, Grotewold E, Koes R (1998) How genes paint flowers and seeds. *trends in plant science* 3 (6):212-217
- Momose M, Abe Y, Ozeki Y (2010) Miniature inverted-repeat transposable elements of Stowaway are active in potato. *Genetics* 186 (1):59-66
- Müller ML, Irkens-Kiesecker U, Rubinstein B, Taiz L (1996) On the mechanism of hyperacidification in lemon. Comparison of the vacuolar H(+)-ATPase activities of fruits and epicotyls. *Journal of Biological Chemistry* 271 (4):1916-1924
- Muth J, Hartje S, Twyman RM, Hofferbert HR, Tacke E, Prüfer D (2008) Precision breeding for novel starch variants in potato. *Plant Biotechnology Journal* 6 (6):576-584

- Naito K, Umemura Y, Mori M, Sumida T, Okada T, Takamatsu N, Okawa Y, Hayashi K, Saito N, Honda T (1998) Acylated pelargonidin glycosides from a red potato. *Phytochemistry* 47 (1):109-112
- Nara K, Miyoshi T, Honma T, Koga H (2006) Antioxidative activity of bound-form phenolics in potato peel. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 70 (6):1489-1491
- Nebert DW, Nelson DR (1991) P450 gene nomenclature based on evolution. In: *Methods in Enzymology* 206 (1):3-11
- Nelson DR (2009) The cytochrome p450 homepage. *Human Genomics* 4 (1):59
- Nicot N, Hausman J-F, Hoffmann L, Evers D (2005) Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* 56 (421):2907-2914
- Niederhauser JS (1993) International cooperation and the role of the potato in feeding the world. *American Potato Journal* 70 (5):385-403
- Oertel A, Matros A, Hartmann A, Arapitsas P, Dehmer KJ, Martens S, Mock H-P (2017) Metabolite profiling of red and blue potatoes revealed cultivar and tissue specific patterns for anthocyanins and other polyphenols. *Planta* 246 (2):281-297
- Ohgami K, Ilieva I, Shiratori K, Koyama Y, Jin X-H, Yoshida K, Kase S, Kitaichi N, Suzuki Y, Tanaka T (2005) Anti-inflammatory effects of aronia extract on rat endotoxin-induced uveitis. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 46 (1):275-281
- Olsen KM, Hehn A, Jugdé H, Slimestad R, Larbat R, Bourgaud F, Lillo C (2010) Identification and characterisation of CYP75A31, a new flavonoid 3'5'-hydroxylase, isolated from *Solanum lycopersicum*. *BMC Plant Biology* 10 (1):21
- Ono E, Fukuchi-Mizutani M, Nakamura N, Fukui Y, Yonekura-Sakakibara K, Yamaguchi M, Nakayama T, Tanaka T, Kusumi T, Tanaka Y (2006) Yellow flowers generated by expression of the aurone biosynthetic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (29):11075-11080
- Oplowska-Stachowiak M, Elliott CT (2017) Food colors: Existing and emerging food safety concerns. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 57 (3):524-548
- Parker CE, Mocanu V, Mocanu M, Dicheva N, Warren MR (2010) Mass spectrometry for post-translational modifications. *Neuroproteomics* 2010:PMID: 21882444
- Pauling L (1939) Recent work on the configuration and electronic structure of molecules; with some applications to natural products. *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe* 3:203-235
- Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis: An International Journal* 20 (18):3551-3567
- Peschke V, Phillips R (1991) Activation of the maize transposable element Suppressor-mutator (Spm) in tissue culture. *Theoretical and Applied Genetics* 81 (1):90-97
- Pichersky E, Noel JP, Dudareva N (2006) Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science* 311 (5762):808-811
- Planetary Biodiversity Inventory (PBI) Solanum Project: A worldwide treatment. Solanaceae Source: <http://www.solanaceaesource.org/content/diversity-solanaceae> (Stand August 2018)
- Pompon D, Louerat B, Bronine A and Urban P (1996) Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environment. *Methods in Enzymology* 272:51-64
- Porter TD (2002) The roles of cytochrome b5 in cytochrome P450 reactions. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 16 (6):311-316
- Potato Genome Sequencing Consortium (2011) Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature* 475 (7355):189-195
- Poulton Je (1981) Transmethylation and demethylation reactions in the metabolism of secondary plant products. *The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise* 7:667-723
- Poulton JE, Butt VS (1975) Purification and properties of S-adenosyl-methionine: Caffeic acid o-methyltransferase from leaves of spinach Beet (*Beta vulgaris* L.). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology* 403 (2):301-314
- Prior RL (2003) Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *The American Journal of Clinical Nutrition* 78 (3):570S-578S
- Quattrocchio F, Wing JF, Va K, Mol JN, Koes R (1998) Analysis of bHLH and MYB domain proteins: species-specific regulatory differences are caused by divergent evolution of target anthocyanin genes. *The Plant Journal* 13 (4):475-488
- Ratajczak R (2000) Structure, function and regulation of the plant vacuolar H⁺-translocating ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1465 (1-2):17-36
- RCoreTeam (2016) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria

- Renault H, Bassard J-E, Hamberger B, Werck-Reichhart D (2014) Cytochrome P450-mediated metabolic engineering: current progress and future challenges. *Current Opinion in Plant Biology* 19 (1):27-34
- Reyes L, Miller J, Cisneros-Zevallos L (2004) Environmental conditions influence the content and yield of anthocyanins and total phenolics in purple-and red-fleshed potatoes during tuber development. *American Journal of Potato Research* 81 (3):187
- Reyes L, Miller J, Cisneros-Zevallos L (2005) Antioxidant capacity, anthocyanins and total phenolics in purple-and red-fleshed potato (*Solanum tuberosum* L.) genotypes. *American Journal of Potato Research* 82 (4):271
- Rickert AM, Kim JH, Meyer S, Nagel A, Ballvora A, Oefner PJ, Gebhardt C (2003) First-generation SNP/InDel markers tagging loci for pathogen resistance in the potato genome. *Plant Biotechnology Journal* 1 (6):399-410
- Rieu I, Powers SJ (2009) Real-time quantitative RT-PCR: design, calculations, and statistics. *The Plant Cell* 21 (4):1031-1033
- Rodriguez-Saona LE, Giusti MM, Wrolstad RE (1998) Anthocyanin pigment composition of red-fleshed potatoes. *Journal of Food Science* 63 (3):458-465
- Rohn H, Junker A, Hartmann A, Grafahrend-Belau E, Treutler H, Klapperstück M, Czauderna T, Klukas C, Schreiber F (2012) VANTED v2: a framework for systems biology applications. *BMC Systems Biology* 6 (1):1
- Sachse J (1973) Anthocyane in den kartoffelsorten Urgenta und Desirée (*Solanum tuberosum* L.). *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* 153 (5):294-300
- Saito N, Toki K, Honda T, Kawase K (1988) Cyanidin 3-malonylglucuronylglucoside in *Bellis* and cyanidin 3-malonylglucoside in *Dendranthema*. *Phytochemistry* 27 (9):2963-2966
- Sakaguchi M, Mihara K, Sato R (1984) Signal recognition particle is required for co-translational insertion of cytochrome P-450 into microsomal membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81 (11):3361-3364
- Salaman RN (1910) The inheritance of colour and other characters in the potato. *Journal of genetics* 1 (1):7-46
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. vol Ed. 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74 (12):5463-5467
- Sato M, Kawabe T, Hosokawa M, Tatsuzawa F, Doi M (2011) Tissue culture-induced flower-color changes in *Saintpaulia* caused by excision of the transposon inserted in the flavonoid 3',5'-hydroxylase (F3' 5' H) promoter. *Plant Cell Reports* 30 (5):929-939
- Saxena A, Singh P, Yadav DK, Sharma P, Alam S, Khan F, Thul ST, Shukla RK, Gupta V, Sangwan NS (2013) Identification of cytochrome P450 heme motif in plants proteome. *Plant Omics* 6 (1):1
- Schieber A, Saldaña MDA (2009) Potato peels: a source of nutritionally and pharmacologically interesting compounds-a review. *Food* 3 (2):23-29
- Schijlen EG, De Vos CR, van Tunen AJ, Bovy AG (2004) Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry* 65 (19):2631-2648
- Schneider K, Weisshaar B, Borchardt DC, Salamini F (2001) SNP frequency and allelic haplotype structure of *Beta vulgaris* expressed genes. *Molecular Breeding* 8 (1):63-74
- Schoch GA, Morant M, Abdulrazzak N, Asnaghi C, Goepfert S, Petersen M, Ullmann P, Werck-Reichhart D (2006) The meta-hydroxylation step in the phenylpropanoid pathway: a new level of complexity in the pathway and its regulation. *Environmental Chemistry Letters* 4 (3):127-136
- Seitz C, Ameres S, Forkmann G (2007) Identification of the molecular basis for the functional difference between flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3',5'-hydroxylase. *FEBS letters* 581 (18):3429-3434
- Seitz C, Eder C, Deiml B, Kellner S, Martens S, Forkmann G (2006) Cloning, functional identification and sequence analysis of flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3',5'-hydroxylase cDNAs reveals independent evolution of flavonoid 3',5'-hydroxylase in the Asteraceae family. *Plant Molecular Biology* 61 (3):365-381
- Sepelev I, Galoburda R (2015) Industrial potato peel waste application in food production: a review. *Research for Rural Development* 1:130-136
- Shahidi F, Nacz M (2004) Contribution of phenolic compounds to flavor and color characteristics of foods. *Phenolics in Food and Nutraceuticals*:443-461
- Shiratake K, Martinoia E (2007) Transporters in fruit vacuoles. *Plant Biotechnology* 24 (1):127-133
- Sigurdson GT, Robbins RJ, Collins TM, Giusti MM (2018) Impact of location, type, and number of glycosidic substitutions on the color expression of o-dihydroxylated anthocyanidins. *Food Chemistry* 268 (1):416-423
- Sigurdson GT, Tang P, Giusti MM (2017) Natural colorants: Food colorants from natural sources. *Annual Review of Food Science and Technology* 8 (1):261-280

- Simko I, Haynes KG, Jones RW (2006) Assessment of linkage disequilibrium in potato genome with single nucleotide polymorphism markers. *Genetics* 173 (4): 2237-2245
- Smith HB (1927) Chromosome counts in the varieties of *Solanum tuberosum* and allied wild species. *Genetics* 12 (1):84
- Smoliński A, Walczak B, Einax J (2002) Hierarchical clustering extended with visual complements of environmental data set. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 64 (1):45-54
- Spelt C, Quattrocchio F, Mol J, Koes R (2002) ANTHOCYANIN1 of petunia controls pigment synthesis, vacuolar pH, and seed coat development by genetically distinct mechanisms. *The Plant Cell* 14 (9):2121-2135
- Spelt C, Quattrocchio F, Mol JN, Koes R (2000) anthocyanin1 of petunia encodes a basic helix-loop-helix protein that directly activates transcription of structural anthocyanin genes. *The Plant Cell* 12 (9):1619-1631
- Spooner DM, McLean K, Ramsay G, Waugh R, Bryan GJ (2005) A single domestication for potato based on multilocus amplified fragment length polymorphism genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (41):14694-14699
- Springob K, Nakajima J-i, Yamazaki M, Saito K (2003) Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins. *Natural Product Reports* 20 (3):288-303
- Stafford HA (1990) *Flavonoid metabolism*. CRC press,
- Steyn W, Wand S, Holcroft D, Jacobs G (2002) Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytologist* 155 (3):349-361
- Stotz G, Forkmann G (1982) Hydroxylation of the B-ring of flavonoids in the 3'-and 5'-position with enzyme extracts from flowers of *Verbena hybrida*. *Zeitschrift für Naturforschung C* 37 (1-2):19-23
- Strack D (1994) The anthocyanins. *The Flavonoids, Advances in Research since 1986*:1-22
- Strack D, Wray V, Metzger JW, Grosse W (1992) Two anthocyanins acylated with gallic acid from the leaves of *Victoria amazonica*. *Phytochemistry* 31 (3):989-991
- Stushnoff C, Ducreux LJ, Hancock RD, Hedley PE, Holm DG, McDougall GJ, McNicol JW, Morris J, Morris WL, Sungurtas JA (2010) Flavonoid profiling and transcriptome analysis reveals new gene-metabolite correlations in tubers of *Solanum tuberosum* L. *Journal of Experimental Botany* 61 (4):1225-1238
- Sumner LW, Amberg A, Barrett D, Beale MH, Beger R, Daykin CA, Fan TW-M, Fiehn O, Goodacre R, Griffin JL (2007) Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. *Metabolomics* 3 (3):211-221
- Sun J, Cao X, Liao X, Hu X (2010) Comparative analyses of copigmentation of cyanidin 3-glucoside and cyanidin 3-sophoroside from red raspberry fruits. *Food Chemistry* 120 (4):1131-1137
- Sun Y, Li H, Huang J-R (2012) Arabidopsis TT19 functions as a carrier to transport anthocyanin from the cytosol to tonoplasts. *Molecular Plant* 5 (2):387-400
- Sundaramoorthy J, Park GT, Chang JH, Lee J-D, Kim JH, Seo HS, Chung G, Song JT (2016) Identification and molecular analysis of four new alleles at the *W1* locus associated with flower color in soybean. *PLoS one* 11 (7):e0159865
- Suzuki H, Nakayama T, Yonekura-Sakakibara K, Fukui Y, Nakamura N, Yamaguchi M-a, Tanaka Y, Kusumi T, Nishino T (2002) cDNA cloning, heterologous expressions, and functional characterization of malonyl-coenzyme A: anthocyanidin 3-O-glucoside-6"-O-malonyltransferase from dahlia flowers. *Plant Physiology* 130 (4):2142-2151
- Syed K, Mashele SS (2014) Comparative analysis of P450 signature motifs EXXR and CXG in the large and diverse kingdom of fungi: identification of evolutionarily conserved amino acid patterns characteristic of P450 family. *PLoS One* 9 (4):e95616
- Takeda K, Kumegawa C, Harborne JB, Self R (1988) Pelargonidin 3-(6"-succinyl glucoside)-5-glucoside from pink *Centaurea cyanus* flowers. *Phytochemistry* 27 (4):1228-1229
- Talbert WF (1987) History of potato processing. In: Talbert WF, Smith O (eds) *Potato Processing*, vol 4. The AVI Publishing Co., Inc. Westport, CT
- Tanaka Y, Brugliera F (2007) Flower Colour: Flowering and its manipulation. *Annual Plant Reviews*, Volume 20, Chapter 9. Oxford University Press
- Tanaka Y, Brugliera F (2013) Flower colour and cytochromes P450. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 368 (1612):20120432
- Tariverdian G, Buselmaier W (2004) Multifaktorielle (polygene) Vererbung. In: *Humangenetik*. Springer:231-250
- Timberlake C, Bridle P (1966) Spectral studies of anthocyanin and anthocyanidin equilibria in aqueous solution. *Nature* 212 (5058):158
- Tsuda T (2016) Recent progress in anti-obesity and anti-diabetes effect of berries. *Antioxidants* 5 (2):13
- Udvardi MK, Czechowski T, Scheible W-R (2008) Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. *The Plant Cell* 20 (7):1736-1737

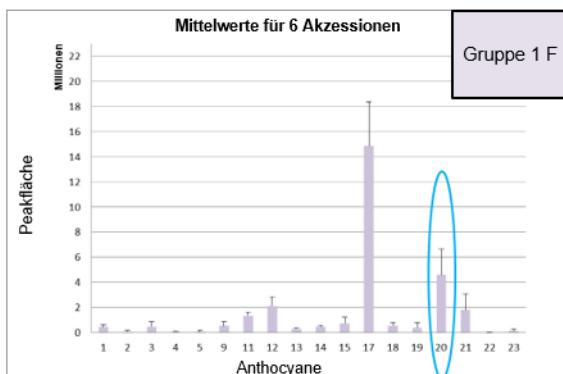
- Uitdewilligen JG, Wolters A-MA, Bjorn B, Borm TJ, Visser RG, van Eck HJ (2013) A next-generation sequencing method for genotyping-by-sequencing of highly heterozygous autotetraploid potato. *PLoS one* 8 (5):e62355
- United States Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service, National Nutrient Database for Standard Reference. Version 28, vollständiger Bericht 11352
- Valiñas MA, Lanteri ML, ten Have A, Andreu AB (2015) Chlorogenic acid biosynthesis appears linked with suberin production in potato tuber (*Solanum tuberosum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63 (19):4902-4913
- van Eck HJ, Jacobs JM, van den Berg PM, Stiekema WJ, Jacobsen E (1994) The inheritance of anthocyanin pigmentation in potato (*Solanum tuberosum* L.) and mapping of tuber skin colour loci using RFLPs. *Heredity* 73 (4):410
- van Eck HJ, Jacobs JM, van Dijk J, Stiekema WJ, Jacobsen E (1993) Identification and mapping of three flower colour loci of potato (*S. tuberosum* L.) by RFLP analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 86 (2-3):295-300
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paeppe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3 (7):research0034. 0031
- Vogt T (2010) Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular plant* 3 (1):2-20
- Vom Endt D, Kijne JW, Memelink J (2002) Transcription factors controlling plant secondary metabolism: what regulates the regulators? *Phytochemistry* 61 (2):107-114
- Vrhovsek U, Masuero D, Gasperotti M, Franceschi P, Caputi L, Viola R, Mattivi F (2012) A versatile targeted metabolomics method for the rapid quantification of multiple classes of phenolics in fruits and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (36):8831-8840
- Wang H, Cao G, Prior RL (1997) Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (2):304-309
- Wang J, Ming F, Han Y, Shen D (2006) Flavonoid-3',5'-hydroxylase from *Phalaenopsis*: a novel member of cytochrome P450s, its cDNA cloning, endogenous expression and molecular modeling. *Biotechnology Letters* 28 (5):327-334
- Wang Q, Cao Y, Zhou L, Jiang C-Z, Feng Y, Wei S (2015) Effects of postharvest curing treatment on flesh colour and phenolic metabolism in fresh-cut potato products. *Food Chemistry* 169:246-254
- Warnes G, Bolker B, Bonebakker L, Gentleman R, Liaw W, Lumley T (2015) gplots: Various R Programming Tools for Plotting Data. R package version 3.0., 1.
- Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, Heer FT, de Beer TAP, Rempfer C, Bordoli L (2018) SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*
- Watzl B, Briviba K, Rechkemmer G (2002) Anthocyanins. *Ernährungs-Umschau* 49 (4):148-150
- Wegener CB, Jansen G (2007) Soft-rot resistance of coloured potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.): the role of anthocyanins. *Potato Research* 50 (1):31-44
- Weretilnyk EA, Alexander KJ, Drebenstedt M, Snider JD, Summers PS, Moffatt BA (2001) Maintaining methylation activities during salt stress. The involvement of adenosine kinase. *Plant Physiology* 125 (2):856-865
- Wessel D, Flüge U (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical Biochemistry* 138 (1):141-143
- Wiering H (1974) Genetics of flower colour in *Petunia hybrida* Hort. *Genen en phaenen*
- Wietschel G, Reznik H (1980a) Die Flavonoid-Muster der knollentragenden Solanum-Arten II. Die Flavonoid-Glycoside der Arten aus Series I–XVI. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 97 (1):79-88
- Wietschel G, Reznik H (1980b) Die Flavonoid-Muster der knollentragenden Solanum-Arten III. Die Flavonoid-Glycoside der Arten aus Series XVII. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 99 (2):149-158
- Willson MF, Whelan CJ (1990) The evolution of fruit color in fleshy-fruited plants. *American Naturalist*:790-809
- Winkel-Shirley B (2001a) Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology* 126 (2):485-493
- Winkel-Shirley B (1999) Evidence for enzyme complexes in the phenylpropanoid and flavonoid pathways. *Physiologia Plantarum* 107 (1):142-149
- Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M (2009) Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature Methods* 6 (5):359
- Xie S, Song C, Wang X, Liu M, Zhang Z, Xi Z (2015) Tissue-specific expression analysis of anthocyanin biosynthetic genes in white-and red-fleshed grape cultivars. *Molecules* 20 (12):22767-22780

- Yin L, Chen T, Li Y, Fu S, Li L, Xu M, Niu Y (2016) A comparative study on total anthocyanin content, composition of anthocyanidin, total phenolic content and antioxidant activity of pigmented potato peel and flesh. *Food Science and Technology Research* 22 (2):219-226
- Yoshida K, Mori M, Kondo T (2009) Blue flower color development by anthocyanins: from chemical structure to cell physiology. *Natural Product Reports* 26 (7):884-915
- Zhang H, Yang B, Liu J, Guo D, Hou J, Chen S, Song B, Xie C (2017) Analysis of structural genes and key transcription factors related to anthocyanin biosynthesis in potato tubers. *Scientia Horticulturae* 225:310-316
- Zhang Y, Butelli E, Martin C (2014) Engineering anthocyanin biosynthesis in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 19:81-90
- Zhang Y, Cheng S, De Jong D, Griffiths H, Halitschke R, De Jong W (2009) The potato R locus codes for dihydroflavonol 4-reductase. *Theoretical and Applied Genetics* 119 (5):931-937
- Zubko MK, Schmeer K, Gläßgen WE, Bayer E, Seitz HU (1993) Selection of anthocyanin-accumulating potato (*Solanum tuberosum* L.) cell lines from calli derived from seedlings produced by gamma-irradiated seeds. *Plant Cell Reports* 12 (10):555-558

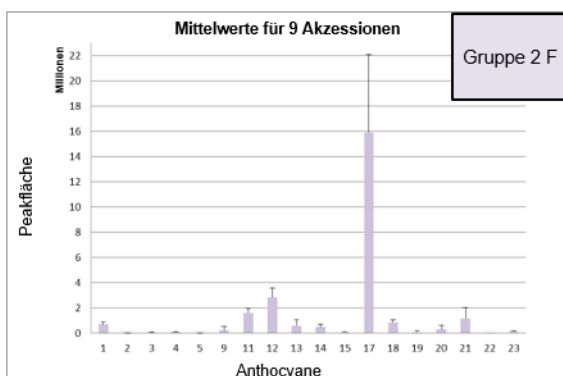
IV. Appendix



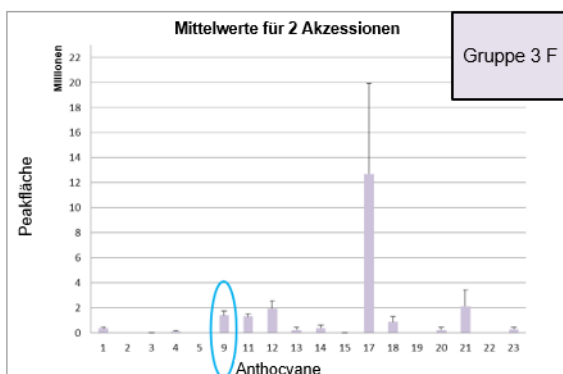
Abb. A1: Veränderungen im Anthocyangehalt von Kartoffelknollen nach Insektenbefall. Knollen der Linie „Rote Emmalie“ zeigen eine deutlich sichtbare Reduktion des Anthocyangehaltes nach Weißfliegenbefall (*Trialeurodes vaporariorum*) oberirdischer Pflanzenorgane (oben), im Vergleich zu den Knollen gesunder Kartoffelpflanzen (unten).

a

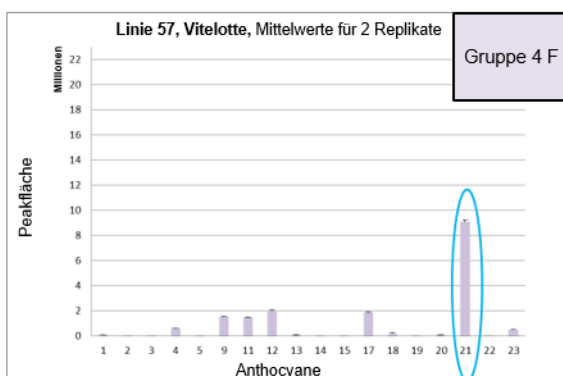
#	Name	Akzession
1	Violettfleischige x Blue Marker – A1	K2007_01_003
2 *	Violettfleischige x Blue Marker – B	K2007_01_008
4	(Violettfleischige) – B	S2007_01_033
29	Kefermarkter Blaue	12033
46	Blaue Anneliese	10408
50	Violettfleischige x Blue Marker – A2	K2007_01_003



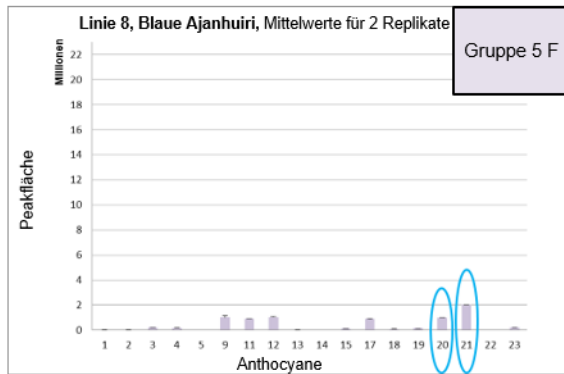
#	Name	Akzession
5	(Blue Marker) – A	S2007_02_008
6	(Blue Marker) – B	S2007_02_013
40	Blaue aus Finnland	12475
41	Purple	12484
47	Blaue St, Galler	/
48	Violettfleischige x Blue Marker – C	K2007_01_016
51	(Violettfleischige) – C	S2007_01_004
52	Valfi	/
53 *	Violettfleischige x Blue Marker – D	K2007_01_015



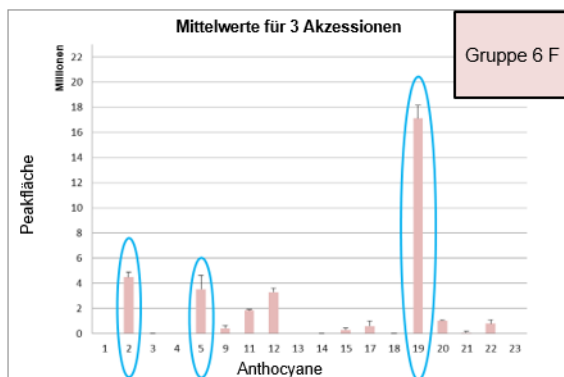
#	Name	Akzession
3 *	(Violettfleischige) – A1	S2007_01_001
54	(Violettfleischige) – A2	S2007_01_001



#	Name	Akzession
57 *	Vitelotte	/

b

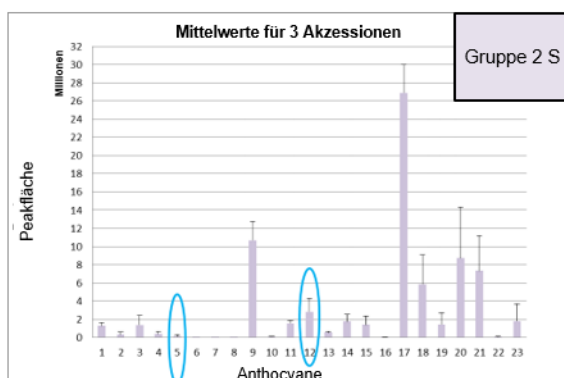
#	Name	Akzession
8 *	Blaue Ajanhuiri	20003



#	Name	Akzession
16	Königspurpur	10097
49 *	Rote Emmalie	10414
56	Rosemarie	10413

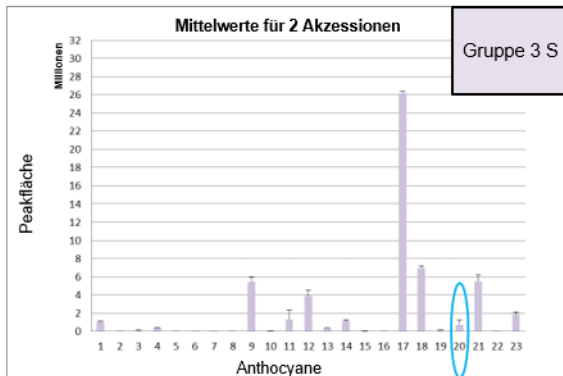


#	Name	Akzession
1	Violettfleischige x Blue Marker – A1	K2007_01_003
2 *	Violettfleischige x Blue Marker – B	K2007_01_008
4	(Violettfleischige) – B	S2007_01_033
50	Violettfleischige x Blue Marker – A2	K2007_01_003

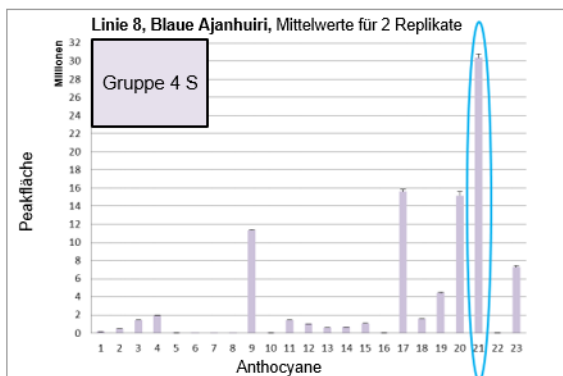


#	Name	Akzession
3 *	(Violettfleischige) – A1	S2007_01_001
34	Runde Blaue Anden	12201
46	Blaue Anneliese	10408

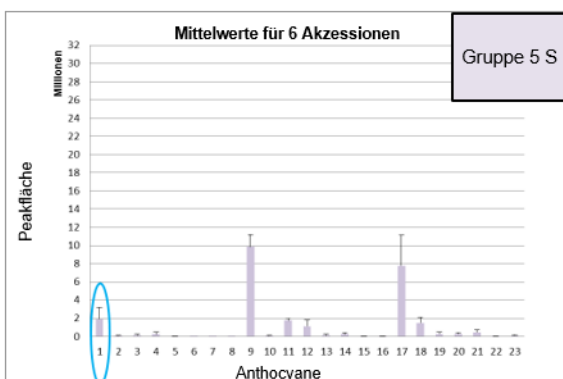
C



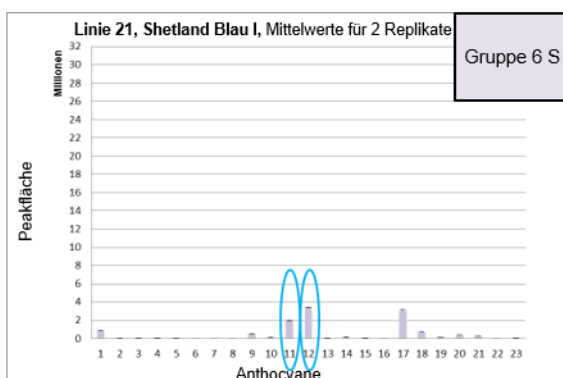
#	Name	Akzession
5	(Blue Marker) – A	S2007_02_008
6 *	(Blue Marker) – B	S2007_02_013



#	Name	Akzession
8 *	Blaue Ajanhuiri	20003

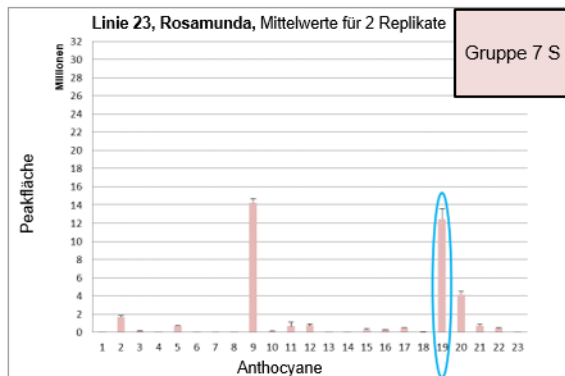


#	Name	Akzession
24	Prince Edward Island Blue	12005
26	Ryecroft Purple	12014
27	Bell's Purple	12022
28 *	Mrs, Moerle's Purple Baker	12029
36	Ungarische Schramayer	12273
37	Shetland lila	12279

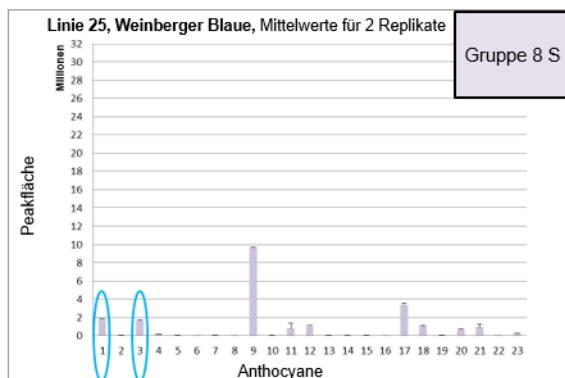


#	Name	Akzession
21 *	Shetland Blau I	11041

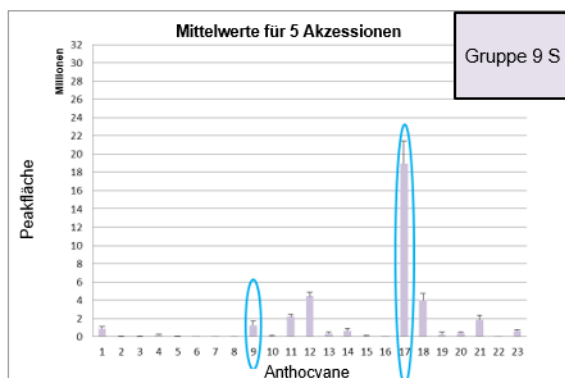
d



#	Name	Akzession
23 *	Rosamunda	11806



#	Name	Akzession
25 *	Weinberger Blaue	12012

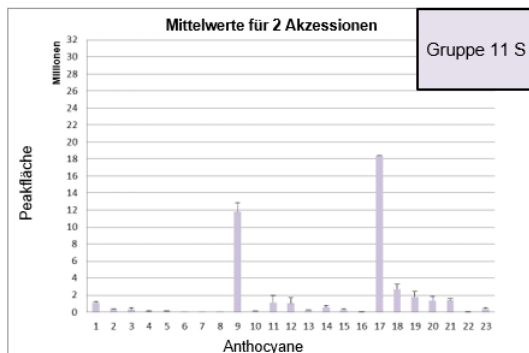


#	Name	Akzession
29	Kefermarkter Blaue	12033
40	Blaue aus Finnland	12475
41 *	Purple	12484
47	Blaue St, Galler	/
52	Valfi	/

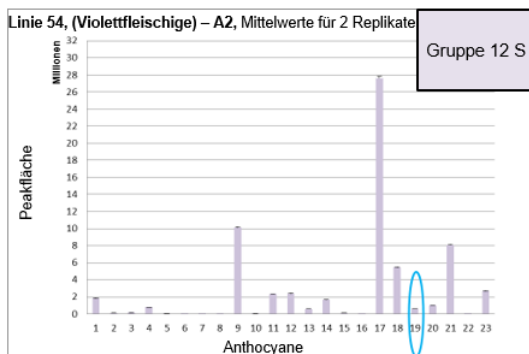


#	Name	Akzession
31	Heidzel Blau	12177
48	Violett fleischige x Blue Marker – C	K2007_01_016
51	(Violett fleischige) – C	S2007_01_004
53 *	Violett fleischige x Blue Marker – D	K2007_01_015

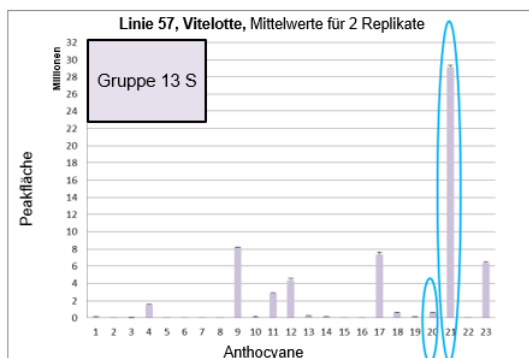
e



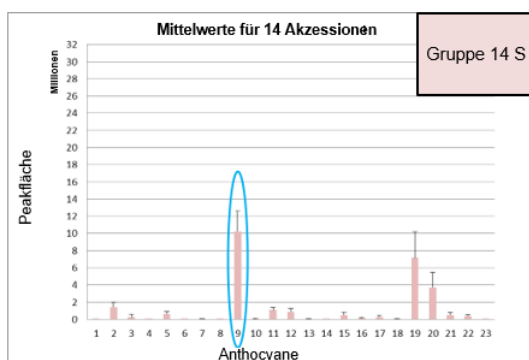
#	Name	Akzession
38	Schwarze Ungarin	12283
39 *	Vogländische Blaue	12299



#	Name	Akzession
54 *	(Violettfleischige) – A2	S2007_01_001

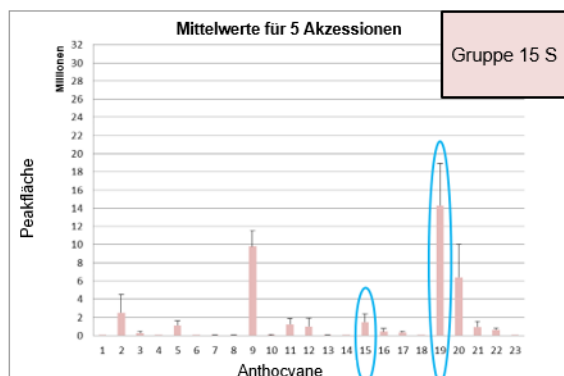


#	Name	Akzession
57 *	Vitelotte	/

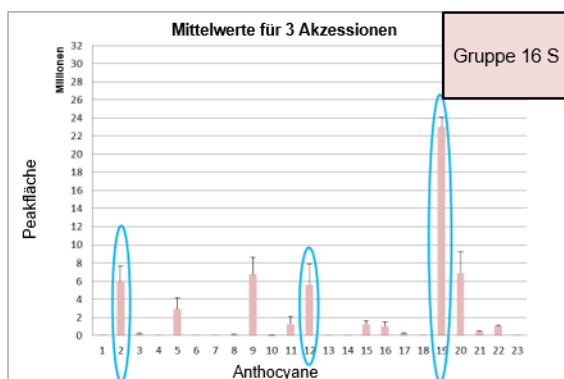


#	Name	Akzession
7	Oreb	10386
9 *	Bangladesh	22153
10	Lal Shil	26444
12	MPI 84,146/2 D	11120
15	Red La Soda	12101
20	Südtiroler 2	10965
22	Cati	11337
30	Vakon	12062
32	Hunsrücker Rote	12182
33	Roter Kuß	12199
35	Ungarische Lange	12272
42	Alhamra	12509
43	Mr, Bresee	12672
45	Cerni Kartofeli	12722

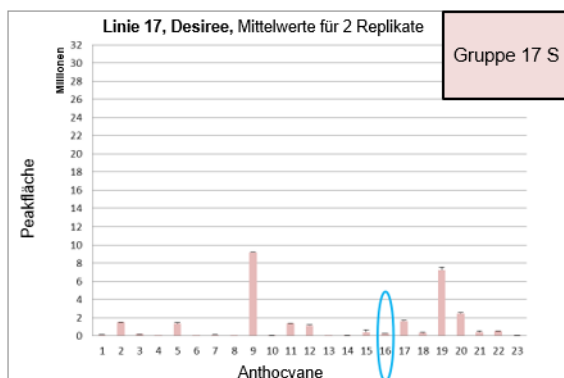
f



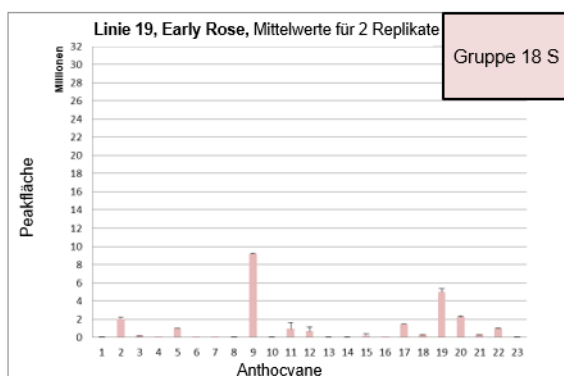
#	Name	Akzession
11	R 93/025	11035
14	Rosalie	11805
16 *	Königspurpur	10097
44	Ursula	12686
55	Miss Blush	/



#	Name	Akzession
13	Linzer Rose	11597
49	Rote Emmalie	10414
56 *	Rosemarie	10413



#	Name	Akzession
17 *	Desiree	10230



#	Name	Akzession
19 *	Early Rose	10722

g

#	RT/Masse-Paar	Tentative Annotation	Zugehörig zu MRM-Annotation Nr.	Literaturreferenzen
1	3,25min/787,23m/z	Petunidin-3-rutinosid-5-glucosid	1	a
2	3,57min/741,22m/z	Pelargonidin-3-rutinosid-5-glucosid	2	b, c
3	3,86min/771,22m/z	Peonidin-3-rutinosid-5-glucosid, Petunidin-3- <i>p</i> -coumaroylrutinosid	3, 20	a, b
4	4,00min/801,24m/z	Malvidin-3-rutinosid-5-glucosid	4	a
5	4,24min/579,17m/z	Pelargonidin-3-rutinosid	6	b, c
6	4,65min/1082,31m/z	Cyanidin-3-caffeoyl- <i>p</i> -coumarylsophorosid-5-glucosid		d
7	4,67min/625,18m/z	Petunidin-3-rutinosid	5	a
8	4,95min/757,22m/z	Delphinidin-3- <i>p</i> -coumaroylrutinosid		a
9	4,96min/695,36m/z	Pelargonidin-3-(6''-succinylglucoside)-5-glucosid		e
10	4,99min/1114,17m/z	Gentiodelphin		f
11	4,99min/551,11m/z	Delphinidin-3-(6''-malonyl)-glucosid		c
12	5,02min/731,17m/z	Cyanidin-3- <i>p</i> -hydroxybenzoyl-sophorosid		d
13	5,53min/919,25m/z	Delphinidin-3- <i>p</i> -coumaroylrutinosid-5-glucosid	9	a, c
14	5,57min/949,24m/z	Petunidin-3-caffeoylrutinosid-5-glucosid	8	a
15	5,97min/903,26m/z	Pelargonidin-feruloyl-xylosyl-glucosyl-galactosid, Cyanidin-3- <i>p</i> -coumaroylrutinosid-5-glucosid	10, 11	c, g
16	6,06min/757,22m/z	Pelargonidin-3-sophorosid-5-glucosid		h
17	6,09min/933,27m/z	Petunidin-3- <i>p</i> -coumaroylrutinosid-5-glucosid	12	a, c
18	6,27min/963,27m/z	Petunidin-3-feruloylrutinosid-5-glucosid	13	a
19	6,42min/887,26m/z	Pelargonidin-3- <i>p</i> -coumaroylrutinosid-5-glucosid	14	a, b
20	6,58min/917,27m/z	Peonidin-3- <i>p</i> -coumaroylrutinosid-5-glucosid, Pelargonidin-3-feruloylrutinosid-5-glucosid	15, 17	a, b, c
21	6,69min/947,26m/z	Malvidin-3- <i>p</i> -coumaroylrutinosid-5-glucosid, Peonidin-3-feruloylrutinosid-5-glucosid	16, 18	a, b, c
22	6,70min/725,21m/z	Pelargonidin-3- <i>p</i> -coumaroylrutinosid	21	a, b
23	6,88min/977,27m/z	Malvidin-3-feruloylrutinosid-5-glucosid	19	a

^a Hillebrand *et al.* (2009)

^b Zhang *et al.* (2009)

^c http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?pathway+sot00942

^d Kim *et al.* (2012)

^e Takeda *et al.* (1988)

^f Goto *et al.* (1982)

^g Kammerer *et al.* (2003)

^h Naito *et al.* (1998)

Abb. A2 a-g 24 Anthocyanprofilgruppen, sechs in Knollenfleisch (Gruppe 1-6 F, **a** und **b**) und 18 in Knollenschale (Gruppe 1-18 P, **b** bis **f**) identifizierte Profile. Balkendiagramme (links) zeigen die Peakflächen extrahierter Ionenchromatogramme von bis zu 23 tentativ annotierten Anthocyanen (**g**), gemittelt innerhalb einer jeden Gruppe. *Rote* und *blaue* Balken repräsentieren die dominierenden Farben der entsprechenden Gewebe. Anthocyane, die hauptsächlich zur Varianz der Gruppen beitragen, sind blau umrandet. Tabellen (rechts) beinhalten alle Linien/Gewebe, welche den jeweiligen Gruppen zugeordnet wurden. * Kultivare mit der höchsten Abundanz der Hauptanthocyane entsprechender Profilgruppen und daher als Gruppen-representative Proben für MRM-Analysen ausgewählt. ^{a-g} Referenzen zur Substanzannotation (Goto *et al.* 1982; Takeda *et al.* 1988; Naito *et al.* 1998; Hillebrand *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2009; Kim *et al.* 2012; http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?pathway+sot00942).

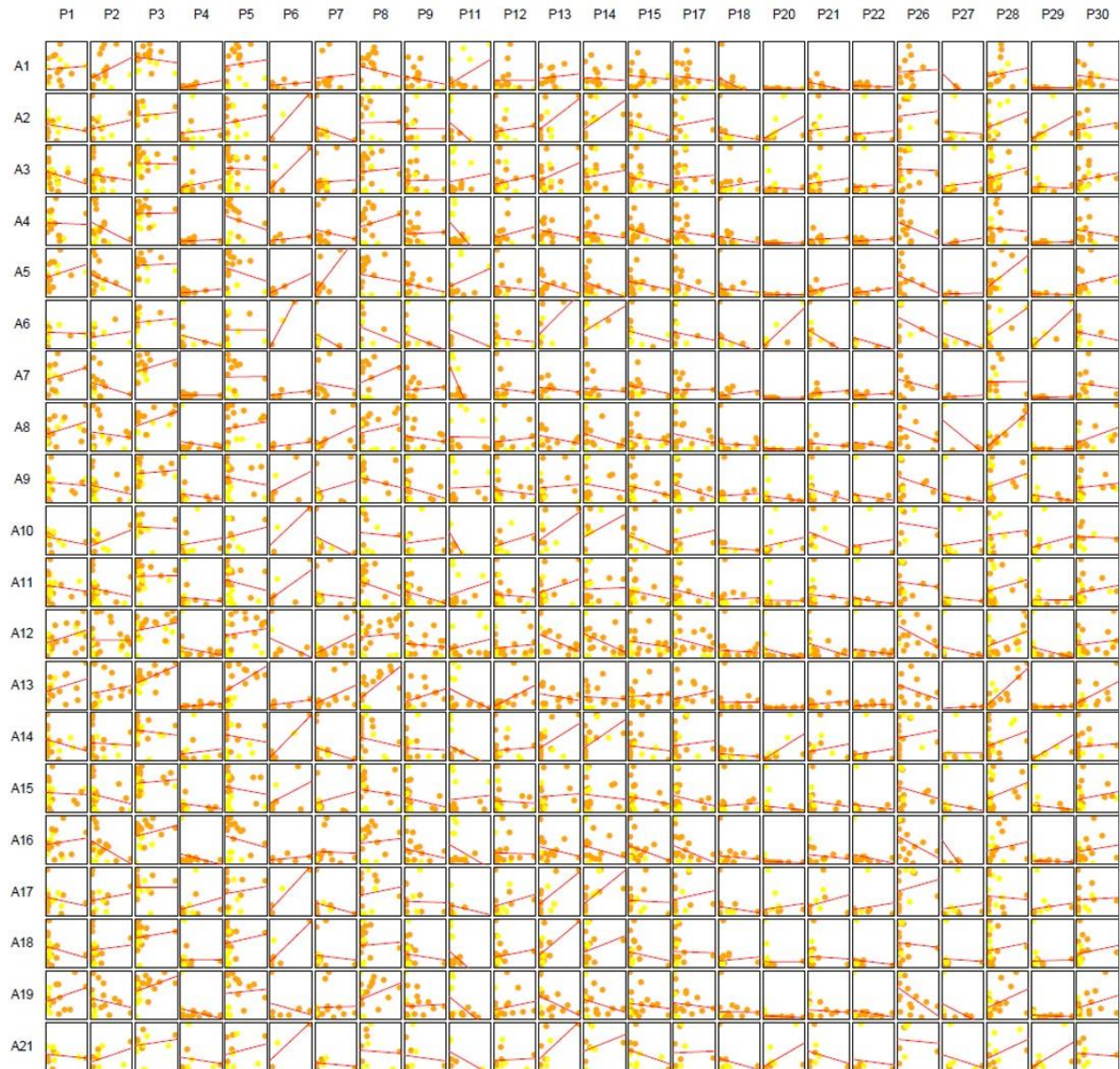


Abb. A3: Farbige Knollen von 19 Kartoffelgenotypen mit unterschiedlichen Anthocyanprofilen in Fleisch und Schale, ausgewählt mittels LC-UV/MS-Profilanalyse.

a

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P11	P12	P13	P14	P15	P17	P18	P20	P21	P22	P26	P27	P28	P29	P30
A1	0.072	0.33	0.15	0.47	0.093	0.21	0.045	0.17	0.18	0.39	0.0044	0.094	0.049	0.1	0.11	0.32	0.07	0.39	0.11	0.034	0.85	0.16	0.069	0.066
A2	0.22	0.2	0.096	0.095	0.14	0.96*	0.33	0.015	0.0014	0.33	0.13	0.55*	0.47*	0.26	0.12	0.15	0.49*	0.098	0.07	0.088	0.044	0.31	0.51*	0.2
A3	0.27	0.093	0.022	0.18	0.029	0.84**	0.047	0.064	0.02	0.088	0.18	0.33	0.12	0.16	0.05	0.17	0.039	0.11	0.044	0.031	0.095	0.18	0.044	0.16
A4	0.035	0.3	0.019	0.26	0.2	0.43	0.17	0.2	0.042	0.36	0.2	0.23	0.14	0.32	0.11	0.15	0.21	0.12	0.3	0.34	0.22	0.064	0.3	0.13
A5	0.29	0.27	0.053	0.37	0.21	0.7	0.63*	0.13	0.21	0.31	0.098	0.42	0.38	0.23	0.29	0.087	0.094	0.21	0.46	0.24	0.11	0.6*	0.26	0.22
A6	0.058	0.19	0.11	0.25	0.0046	1*	0.3	0.26	0.19	0.34	0.12	0.47	0.27	0.25	0.089	0.2	0.87***	0.34	0.15	0.25	0.36	0.56*	0.9***	0.16
A7	0.24	0.25	0.31	0.0035	0.011	0.46	0.12	0.25	0.094	0.6*	0.089	0.18	0.078	0.22	0.018	0.34	0.0081	0.2	0.29	0.23	0.18	0.0086	0.17	0.095
A8	0.38	0.13	0.44*	0.2	0.14	0.58	0.51*	0.22	0.15	0.017	0.12	0.37	0.33	0.18	0.23	0.058	0.16	0.15	0.18	0.41	0.7	0.91***	0.16	0.46*
A9	0.1	0.24	0.099	0.14	0.16	0.37	0.27	0.19	0.28	0.041	0.12	0.089	0.16	0.24	0.29	0.079	0.15	0.2	0.15	0.23	0.1	0.31	0.16	0.13
A10	0.32	0.48	0.049	0.14	0.21	0.88	0.43	0.06	0.12	0.61	0.36	0.52	0.41	0.36	0.17	0.18	0.19	0.36	0.13	0.13	0.12	0.094	0.24	0.05
A11	0.14	0.17	0.022	0.091	0.19	0.67	0.097	0.24	0.27	0.21	0.069	0.3	0.034	0.19	0.2	0.053	0.0085	0.092	0.14	0.093	0.084	0.22	0.0029	0.18
A12	0.43*	0.001	0.27	0.25	0.15	0.41	0.57*	0.09	0.099	0.25	0.13	0.49*	0.47*	0.2	0.28	0.085	0.37*	0.36	0.17	0.51*	0.26	0.41*	0.4*	0.18
A13	0.33	0.15	0.56*	0.52*	0.47*	0.57	0.4	0.64**	0.38	0.41	0.51*	0.26	0.066	0.089	0.22	0.0097	0.39	0.24	0.29	0.36	0.36	0.82**	0.4	0.54*
A14	0.27	0.042	0.12	0.14	0.13	0.97***	0.25	0.15	0.046	0.22	0.066	0.49*	0.49*	0.12	0.087	0.074	0.66***	0.18	0.15	0.13	0.00079	0.29	0.65**	0.075
A15	0.056	0.23	0.1	0.14	0.15	0.41	0.25	0.12	0.22	0.095	0.059	0.076	0.11	0.19	0.22	0.11	0.12	0.11	0.13	0.22	0.1	0.35	0.14	0.22
A16	0.14	0.37	0.23	0.24	0.17	0.39	0.035	0.078	0.17	0.26	0.025	0.23	0.2	0.31	0.3	0.072	0.2	0.16	0.21	0.4	0.53	0.16	0.2	0.15
A17	0.22	0.15	0.0014	0.26	0.12	0.95*	0.26	0.14	0.029	0.092	0.24	0.61*	0.6*	0.045	0.15	0.15	0.14	0.24	0.16	0.2	0.12	0.061	0.14	0.05
A18	0.21	0.075	0.13	0.0071	0.12	0.83*	0.09	0.045	0.1	0.19	0.13	0.56*	0.24	0.16	0.021	0.089	0.0061	0.049	0.099	0.073	0.061	0.12	0.023	0.16
A19	0.34	0.17	0.37	0.26	0.074	0.27	0.026	0.3	0.046	0.47*	0.18	0.41	0.24	0.12	0.11	0.014	0.28	0.11	0.19	0.54*	0.37	0.39*	0.21	0.31
A21	0.19	0.47	0.19	0.15	0.24	0.9	0.3	0.06	0.1	0.55	0.077	0.65*	0.3	0.35	0.029	0.24	0.56*	0.26	0.11	0.074	0.28	0.46	0.62*	0.1

b



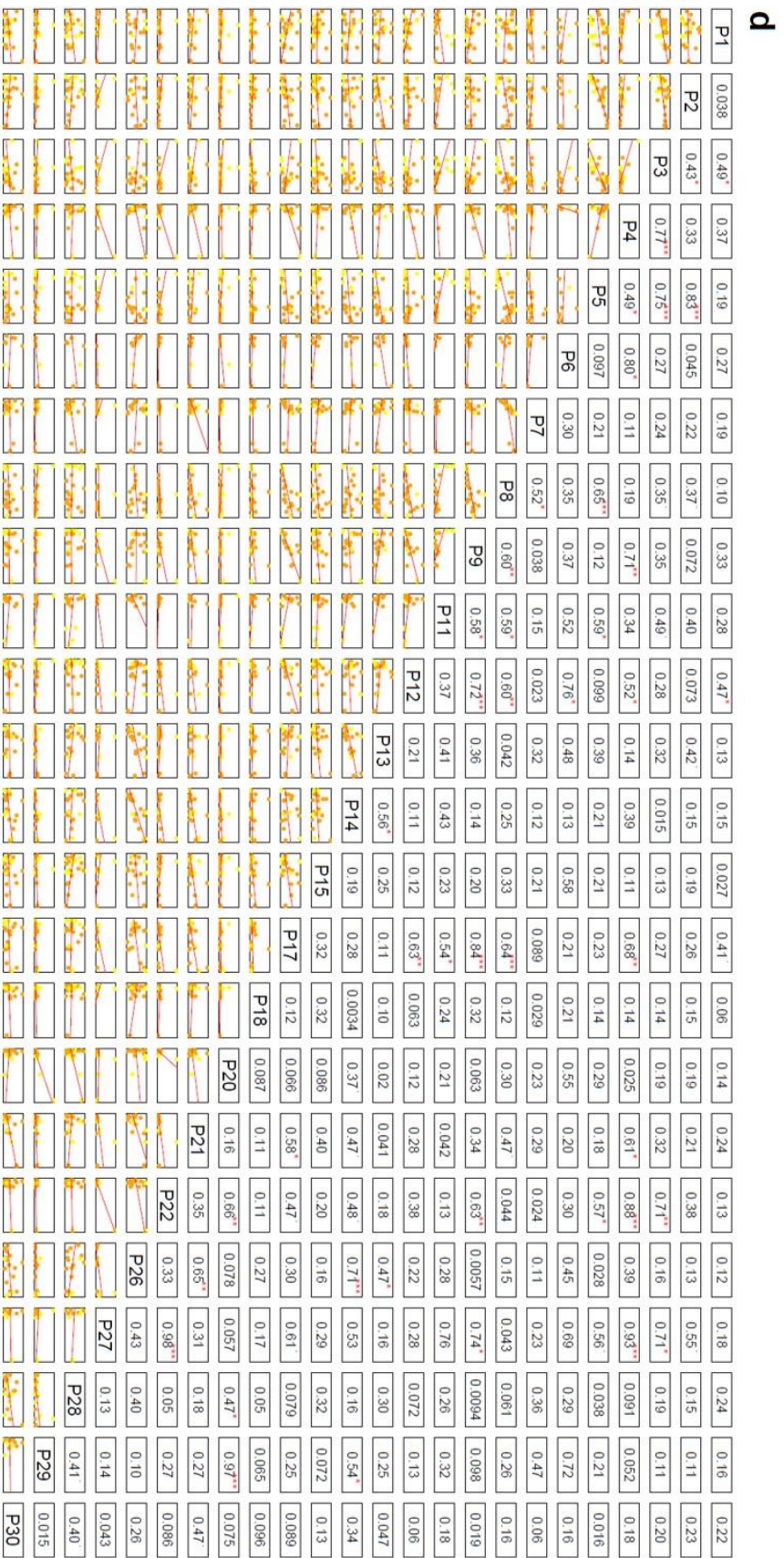


Abb. A4 a-d: Ergebnisse der Korrelationsanalyse nach Pearson zeigen die $|r|$ -Werte der Korrelationskoeffizienten und die Signifikanzwerte in Kategorien *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$, $\cdot P < 0,1$, sowie *Scatter Plots* (Regressionsgerade (rot), Datenpunkte für unterschiedliche Gewebe separat dargestellt (gelb = Knollenfleisch, orange = Knollenschale)) für die mittels LC-MS/MRM in Kartoffelknollengewebe ermittelten Korrelationen zwischen sämtlichen Anthocyanen (A1 bis A 21) und zusätzlichen polyphenolischen Komponenten (P1 bis P31) (a, b), innerhalb der Anthocyanen (c) und unter den übrigen Polyphenolen (d). Abkürzungen der Substanzen entsprechen den Auflistungen in Tabelle 2 und 3.

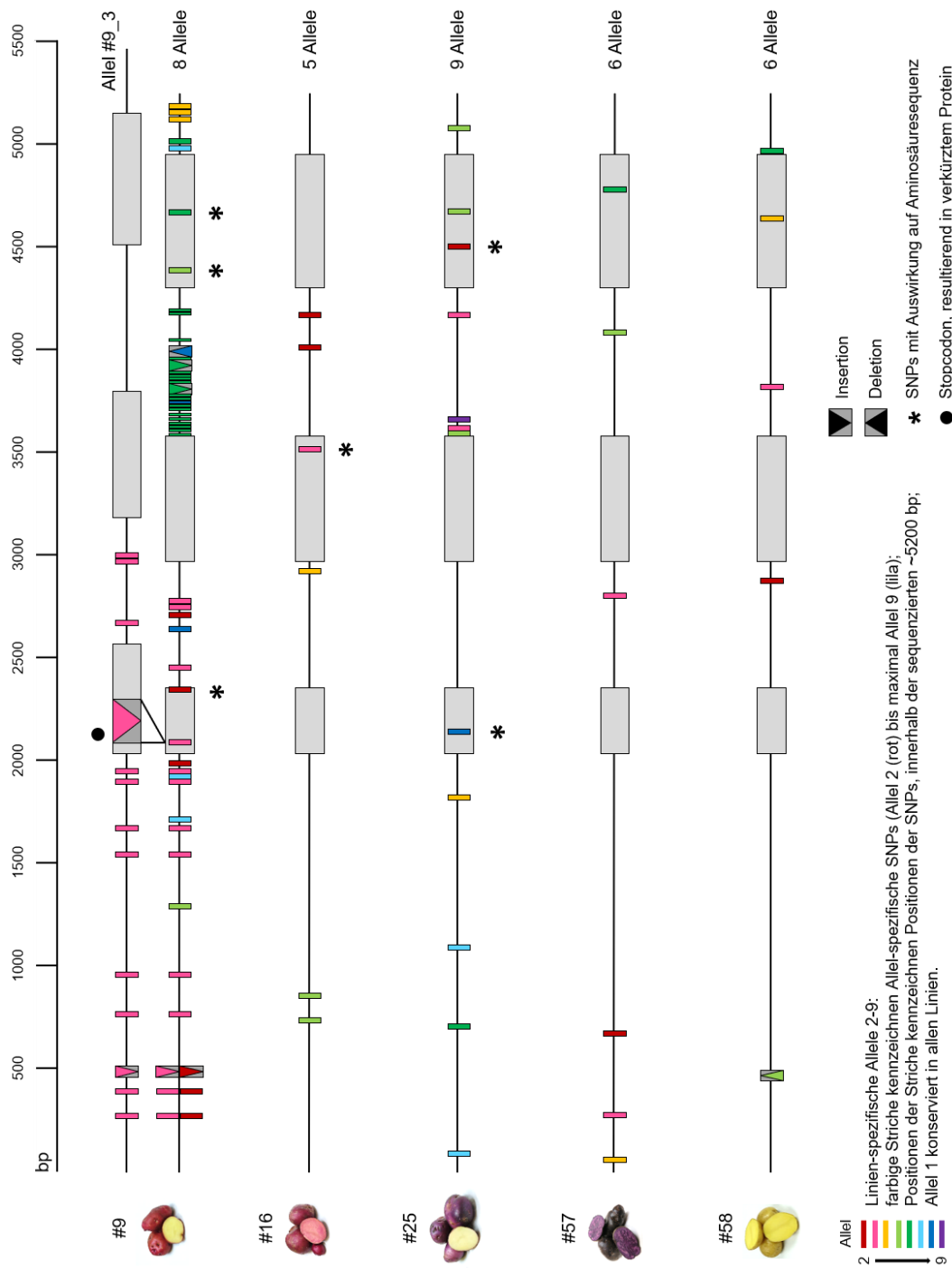


Abb. A5: Zusammenfassende Übersicht der *Stf3'5'h*-Allele fünf ausgewählter Kartoffelgenotypen. Kodierende Sequenzabschnitte sind als graue Boxen dargestellt. Sequenzunterschiede und deren genaue Position innerhalb eines sequenzierten 5,2kb-Fragments des *Stf3'5'h*-Locus, sind in Form verschiedener, farbiger Symbole veranschaulicht. Der gewählte Farbcodier gilt jeweils für die Allele innerhalb einer Kartoffelgenotypenlinie.

TGGAAAAATG	ACTCTGGGTA	AAGATCAATT	GCTATTATGT	GTTTATTATA	TATAAATGGT	CATTCATTAT	AAGAATTTAA	TGAATATATT	90
CAACAAAATA	ACAAATTCAA	CTATGCAATA	TTGAAAACCC	TTAATACAAG	GTAAATGATG	CTTCATAGAT	ATTAGGTAGT	GTAACAGAAT	180
CATTAATTA	ATAGTGCTAT	ACTAATCAAT	CTAAATTAGG	GTGGGCATAG	TATGATACAA	TAATTAATA	TTCAATCAAG	TAATTTGGTA	270
TTTATTTTTT	AAGAAAATTA	TATCATTTTC	ATATTAATA	ATTTCCGTAT	GATTTGATTT	TAAAGTTTGA	TTTCAATATT	TTATAGTATG	360
GTAATTCGAT	AAACACAAAT	TATTCAACTT	TAGTTTTATAT	ATACTCATAT	AATAAAGAAAT	GACCTCAATC	TTTCAAAAAA	AACATCTTAA	450
TATATCATAA	TAACACTTTA	CACAAGTGTG	TGTATATATA	TATATAAATA	TATAAAGTAT	GAGCAATTC	CTTTAATTTG	CTAATCAATT	540
ACATAAAAAA	TATTTTAATC	AAAGATACAG	TAGTCAAAAT	TTCAATATCT	AAACATTTGA	GTTTATACAA	GTACTAGCTT	GTATGTTTGT	630
TAATATTATA	TATGATAATA	TACATAAATT	ATTTATATAA	CTATATATTT	CGATAAGGTA	TTTGGTATTT	AGATACTTTA	TTTATAACTA	720
TCAAATATCA	AAAGATTTAA	AATATATATC	ATATACCATA	TCATAATATA	AAAAATACGA	TAACAAAAAG	TTTGTTTTGA	TATAATATAT	810
AAATCCGTAC	CTACCGTATT	ATGGCCATCT	CTAATCTAGA	TGGAGGACCA	TGAAAGAATT	TAAAGATAAT	AAATTCAGTC	AACGTATAAT	900
ACATACTCCA	TTTTAATTTA	TGTGAGTTAG	TTTGACTTGA	CATAGAGTTT	AAAAAGTAAA	GAAAAACTTT	TGAAATATGG	TTATAAATCA	990
TTTCACTTAT	GATAAAATGA	ATATTTTAAA	GTTAAATTTG	TATTAATAT	AAAAATATAT	CATTCCTTTT	AAAATTAAC	AAAAATAAA	1080
GTTATATATA	GAAAAATTTAA	ATTTACTTAA	GTTTAAATAA	TTAGTCCATT	TTGCAAAACGA	ATATTAAGT	ATTGCTATAT	TTGGAAAAAT	1170
TTAAAAAATC	TATGTCCAAA	TATTATCCCA	AAAAAGTAAAT	AAAAAGAAAA	GTGGTAGCTG	AGTGAATGT	AGGTTGTAAA	TTGTAATTTA	1260
TCTTCTAT	ACTAATTTGGT	TAAGTAAAGG	CTGTAATTTG	GTTCTTATG	CTATTTGGTT	AAGTGTATAT	ATCCAAGGGA	TGGGACCGAT	1350
TATGTTCCGA	TCAGTTTACA	CGTATTTGCA	TTAGTTTTAA	GAAATACTTG	TTATCTTCAT	CGATACAAAT	ATTGGATAAA	TTCATCCACA	1440
AAGTAATATT	CTCTCCCTCT	ATTAAGTAGT	ATAATTTCTA	TTTCAATTTA	TGTAGCGATG	TTTGACTGAA	CACAAAGTTT	TAGAAAAAAA	1530
GAAAGAAAGA	AAGAGACTTT	AGAAATTTAT	GGTCCAAAAC	AAACACCCAC	ATTTGTCCGG	GTAATATATA	TTGGATCCTT	ACATAAAAAAT	1620
AAATAGCTGT	CAGATTCATT	TTTATATATT	TTTTGTCACT	ATACATAAGT	TAAGCATTTG	TTATATATAG	ATATATATCT	CAATTTAAGC	1710
TATTAATTTG	AACAACATTT	CAAAATTAAT	CTTTCAATAT	TTAATTTGAG	CCACAATCAC	TTTTAAATGCA	ACTAATCCAC	TATGAAATGT	1800
TTGAACGGTA	GATACAAAAA	AACTTCAACG	TGACATTCAC	TTACAATTTT	AATACCTACC	AAACCCCTAT	GTCCATTTTT	TTAAAAATA	1890
AAATAAAATC	CAACTTCTCA	TTCAATTTCC	TTCTACTTCA	TTCTCACTCT	ATCTATATAT	AAAGAAATTTG	TGATATTGAA	AAATTAGAAG	1980
TATTAAAACT	ATATATTATA	AGCTTTATAT	TATATCTTCG	ATTTTAATCA	TGGCATTACG	TATTAGTGAG	TTGTTTGGCC	CGGCTTTAAT	2070
ATATATCATA	GTACATATTA	TTATTTCAA	ATTAATAGCC	ACCGTCCGGG	AGCGGGGGCG	GAGGCTACCG	CGGGTCCAA	CGGGTGGCC	2160
GGTGATCCGA	GCACTATCAC	TTTTAGGTTC	AATGCCACAT	GTTGCACCTG	CAAAAATGGC	CAAAAAATAT	GGACCTATTA	TGTATTTAAA	2250
AGTTGGTACA	TGTGGGATGG	TTGTTGCTTC	TACCCCTAAT	GCTGCAAAAG	CTTCTTTGAA	AACACTTGAT	ATTAATTTTT	CCAATCGTCC	2340
ACCTAATGCA	GGTAAAAATA	TTAGTAGTAA	TTTGTAAATA	TTATAAATTT	ATAGTATATG	GTAGGGTTAT	CAATTAATG	AGTTCATAAG	2430
GTTTGTGGTA	TTTGTGTGTT	CTTGTAGGTA	AAAGCATCGT	CTCTGTGAGA	CCTAGGTCAC	AGGTTCCGAGT	TGTGAAATCA	TCTATTGATA	2520
TTTGAGTTAG	GGTAGAACAT	CTATGTCAAA	CTCTATTGCG	ACGTTGTCTT	TTCTCGGACC	CGATGTGAAT	ACGGGATGCT	TTATGTATCA	2610
ATCAATTAGC	TTTTATCATA	GTTTTTCGAC	ATCATACCAA	GTTCATCTGA	ACACAATATT	TTTATATAAA	ACTTTTCTAT	ATGAAAAACA	2700
CTAAGATTTT	AACATAGTAT	AAATTCATTT	GAACCTTTTA	AAGGTCAAGC	ACATTAATTT	TAAATCATGA	ATCTGTTGCT	GTTCTAGAAC	2790
TTTATTTTTG	GATTTTAAAG	CGATATAAAG	TCTTATCTTG	AGGTAAGTTT	AGAATTAAC	TCTTGTACCT	ATAAAAATACC	CCATTTTTAT	2880
TATCATTTTG	CATTTAAAAA	CTCTCAAAAT	CTTCTAACAA	TTAATCTTAGT	GTACTTTTTA	TTGATCCTCT	AAATTAGGTG	CCACACATTT	2970
GGCCTATAAT	CCCCAAGACA	TGGTTTTTTC	ACCCTATGGA	CCTCGTTGGA	AGTGTCTTAAG	GAAATTGAGC	AACTCACACA	TGCTAGGTGG	3060
AAAAGCCTTA	GAAAAATGGG	CCAATGTTTC	TGCCAATGAG	CTAGGTCACA	TGCTAAAAAT	GATGTTCCGAT	GCAAGCCATG	TGGGCGAATG	3150
TGTGGTGAT	GCTGATATGT	TGACATTCGC	AATGGCCAAAT	ATGATTGGTC	AAGTATGTTT	AAGTAAGAGA	GTGTTCCGTT	AAAAAGGGGT	3240
GGAGGTTAAT	GAATTTAAGA	ATATGGTTGT	GGAAATTAATG	ACGGTTCGAG	GATATTTTAA	TATTGGTGAT	TTTTATCCTA	AATTAGCTTG	3330
GATGGATTTA	CAAGGAATTT	AAAAAGGGAT	GAAAAGTTTG	CATAAAAAAT	TTGATGATTT	ATTGACAAAA	ATGTTTAAATG	AACATGAAGC	3420
AACTACCTAT	GAAGAAAAAG	AAATCCTGTA	TTTTCTTGAT	GTTGTTATGG	CAAAATAGGA	TAATTTCTGAA	GGAGAAAGGC	TTAGTACAA	3510
AAATATCAAA	GCACTTTTTC	TGGTATGTAT	CAACTAAATA	TTACTATATC	TGTCCACTTT	TAATTTGTCAT	AGATTTCTTT	TTTAGATGCA	3600
AACGATAATA	ACTTTGACTA	ACATTTTATA	ATGTATTTTT	TCATCATATT	GATATGCAAA	AAGTTGGAAT	TTATAGTACT	TTTCATATAG	3690
TTTTTTGAATA	TCTAAATTTT	TTGTTTTAAA	TATCGAATTA	ATGTAATTTA	ATTTAATTTT	AAAAATTAAT	CAACTTTTCA	AAAGCATAAC	3780
ATGACAACTA	AAAGTGGACA	GAGAGAGTAT	CAATTTGTAG	ATCAAGATTT	ACTTTGAAAC	TATGTTGTTT	AGACTCTTGC	TAAAAAAAAT	3870
TGTGTTTTAT	TTGAAAAATA	GGTAAAGATA	TTATATATAT	GGAAAAAAA	AATTAATAGT	TTTTATCCTAT	ATTGTTTGTCT	CTCTTAAGAT	3960
ATTTGTTGTC	TCATATTTGA	TCTTTTAAA	AAATACTAAT	TCTTTTAAAG	AGTTTTCCTT	TGCACACGTT	CATTCATPAC	ACTGAAAAAA	4050
AAGGAATTAG	ATTGACAAC	TCTATGGCTA	AACAATGAAA	CTGCTAATCC	CATTTAATGA	CGAATTAGCA	ACAAATTTAT	ACAAAAAAT	4140
ATGTTAGCCA	CGAGCTGTTT	CTTTTATTTT	TTGTAAGAAA	GGTGTCTATT	AATTAGATTT	ATTTTCTCTT	TCTAATTAAT	ATATTCTGAC	4230
ATATTATTTT	TTGACAATAT	TTTGTACAG	AATTTGTCA	CAGCTGGTAC	AGACACTTCA	TCTAGTGTAA	TAGAATGGGC	CCTTGCAGAA	4320
ATGATGAAAA	ATCCTCAAAT	TTTCAAAAAA	GTACAAGAA	AAATGGACCA	AGTAATTTGGC	AAAAATAGAC	GTTTAAATGA	ATCTGATATT	4410
CCAAATCTTC	CTTATTTTACG	TGCAATTTGC	AAAGAAACAT	TTCGGAAACA	TCCTTCAACA	CCACTAAATC	TCCCTAGAGT	ATCGACCGAG	4500
CCGTGCACTG	TCGATGGTTA	CTACATACCG	AAAAATACTA	GACTTAGTGT	CAACATATGG	GCAATCCGGAC	GAGATCCTGA	TGTGTGGGAG	4590
AATCCCGCTG	AGTTCAATCC	CGAGAGGTTT	CTGAGCGGGA	AAAACGCAAA	GATGTAACCT	CGTGGGAACG	ATTTTGTAGT	AATTCATTTT	4680
TGGGCAGGAC	GAAGGATTTG	CGCGGGGACA	AGGATGGGAA	TAGTGATGTT	GGAATATATA	TTGGGAACCT	TGGTTCATTC	ATTTGATTGG	4770
AAATTACCAA	ATGATGTTAT	TGATATTAAT	ATGGAGGAAT	CTTTTGGATT	AGCTTTGCAA	AAAGCTGTCC	CTCTTGAAGC	TATGGTTACT	4860
CCAAGGCTAT	CTTTGGACGT	TTATCGTTGC	TGATCGAGCG	AGCCTTTCTA	ACCATTTATA	GTGCAACATA	TTTGCTAAGG	ATCGTAATGT	4950
GAGGAATACA	GGTGTAGCT	ATATATAAAA	ATAATGATAG	TGCGATACCT	TGAAGGGATT	TGTTTTGTAA	TTTGCTTGGC	TTTCTTCTAA	5040
TAAACTTATG	TGCTCGTAGA	TTTTTTTTTC	TTGATATTTG	AATACTAGGG	CTTGAGACCT	TTGATTTATT	TCATAATATT	CAAAATTTTT	5130
TTTTTTTTTT	TTAATAAAGA	GGAGGATAAC	AAACTTGTAT	ATTAATTCAA	GTAGCGCGTT	AAAACAATG			5199

Abb. A6: 5199 bp Nukleotidsequenz des in fünf kontrastierenden Kartoffelgenotypen konservierten Allel 1 des *Stf3 5'h*-Locus. Start- und Stopcodon des *Stf3 5'h*-Gens sind unterstrichen und in roter Schrift dargestellt. Angaben zur Exon-Intron-Struktur können Abbildung 12 a und 13 a entnommen werden. Die Nummerierung am rechten Rand dient als Orientierungshilfe für die Position der Basen innerhalb des ~5,2kb-Fragments.

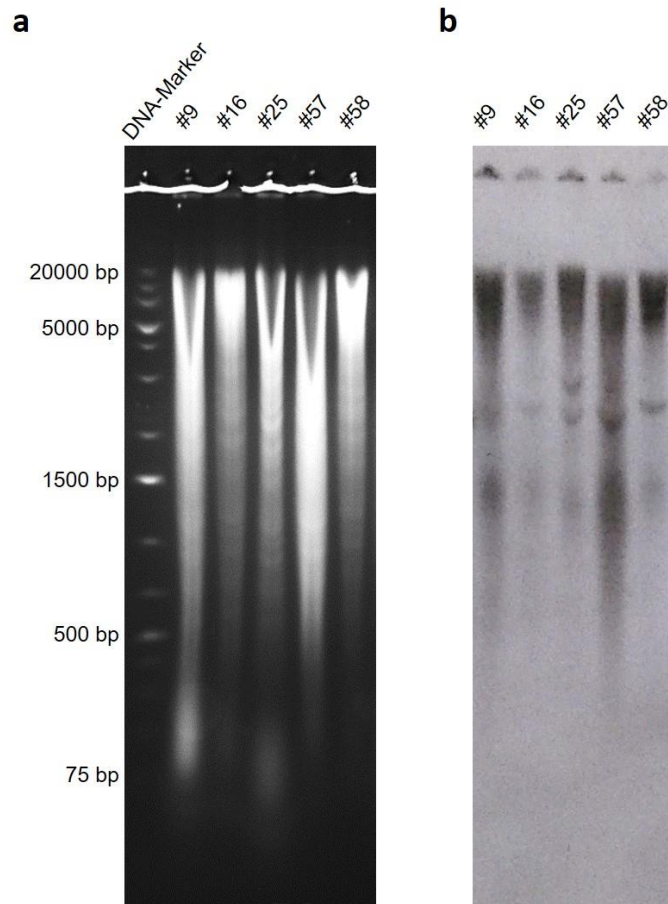


Abb. A7: Kontrolle der elektrophoretischen Auftrennung enzymatisch geschnittener, genomischer DNA fünf ausgewählter Kartoffelgenotypen (a), für die Southern Blot-basierte Analyse der *Stf3* 5' h-Kopienzahl (b). Der Restriktionsverdau von je 10 µg DNA erfolgte mit *Bam*HI und *Nde*I. Für die Auftrennung der DNA-Fragmente wurde ein 1%-iges Agarosegel verwendet. Die Nummerierung der Linien entspricht der Auflistung in Tabelle 1. DNA-Marker: GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder.

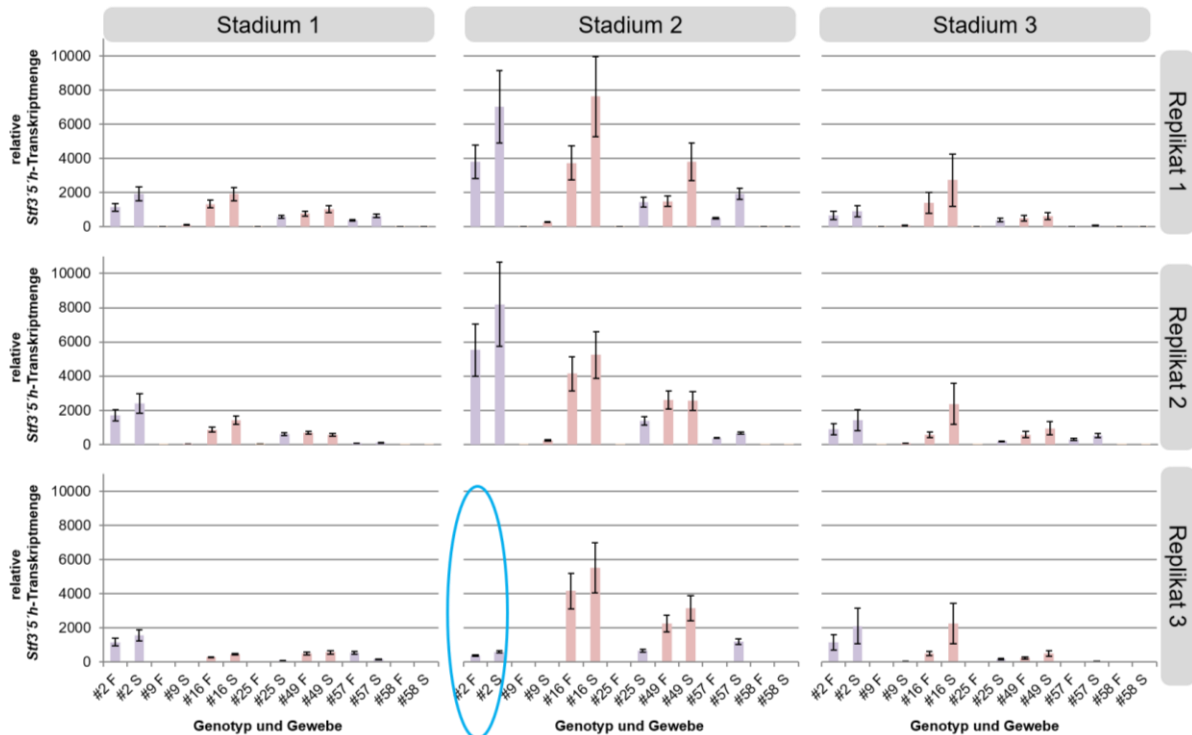


Abb. A8: Relative Abundanz des *Stf3* 5' h-Transkriptes in Knollengewebe (Fleisch, F; Schale, S) sieben ausgewählter Phänotypen während drei verschiedener Stadien der Entwicklung. Transkriptanalysen erfolgten in drei Wiederholungen in Form biologischer Replikate (Wiederholung von Anbau und Ernte) für jedes Entwicklungsstadium (1: junge Knollen nach Bestandschluss, 2: mittlere Knollengröße, 3: erntereife Knollen, entsprechend Abb. 5 b und Abb. 18). Alle Proben wurden aus Knollen von jeweils vier Pflanzen pro Anbau gepoolt. Blaue Umrandung kennzeichnet abweichende Ergebnisse (Ausreißer) innerhalb biologischer Replikate. Fehlerbalken repräsentieren die Standardfehler (\pm SE) der relativen Transkriptmengen. Die Berechnung der Größe dieser Fehlerbalken schließt alle relevanten Fehler ein: Variabilität technischer Replikate (\pm SD (n=3)), Unsicherheit der geschätzten Amplifikationseffizienzen, Fehler der Normalisierungsfaktoren (Referenzgene, IRC). Die Daten wurden normalisiert zu den Referenzgenen *efl*, *L2* und *aprt*. Berechnungen erfolgten mittels qBase+ 2.3 (Vandesompele *et al.* 2002; Hellemans *et al.* 2007). Die Darstellung der Werte entspricht deren linearer Skalierung zur „Kontrollgruppe“ (*gelbes* Gewebe). Den Liniennummern (#) entsprechende Sortennamen sind Tabelle 1 zu entnehmen. Die Farben der Balken repräsentieren die dominierende Farbe der jeweiligen Gewebe.

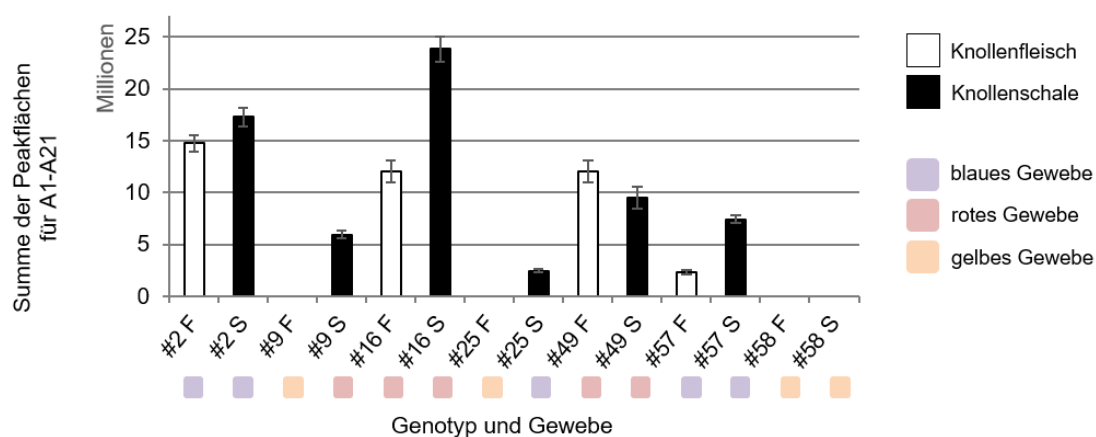


Abb. A9: Gesamtanthocyangehalt in Knollengeweben sieben ausgewählter Kartoffelgenotypen. Der relative Gesamtanthocyangehalt der Gewebe (Fleisch, F; Schale, S) reifer Kartoffelknollen ergibt sich aus der Summe der Peakflächen 21 tentativ annotierter Anthocyane (Anthocyan A1-A21, entsprechend Tabelle 2). Die dargestellten Werte basieren auf LC-MS- (für *gelbes* Gewebe, \pm SD (n=2)) bzw. LC-MS/MRM-Daten (für anthocyanhaltiges *rotes* und *blaues* Gewebe, \pm SD (n=6)). Den Liniennummern (#) entsprechende Sortennamen sind Tabelle 1 zu entnehmen.

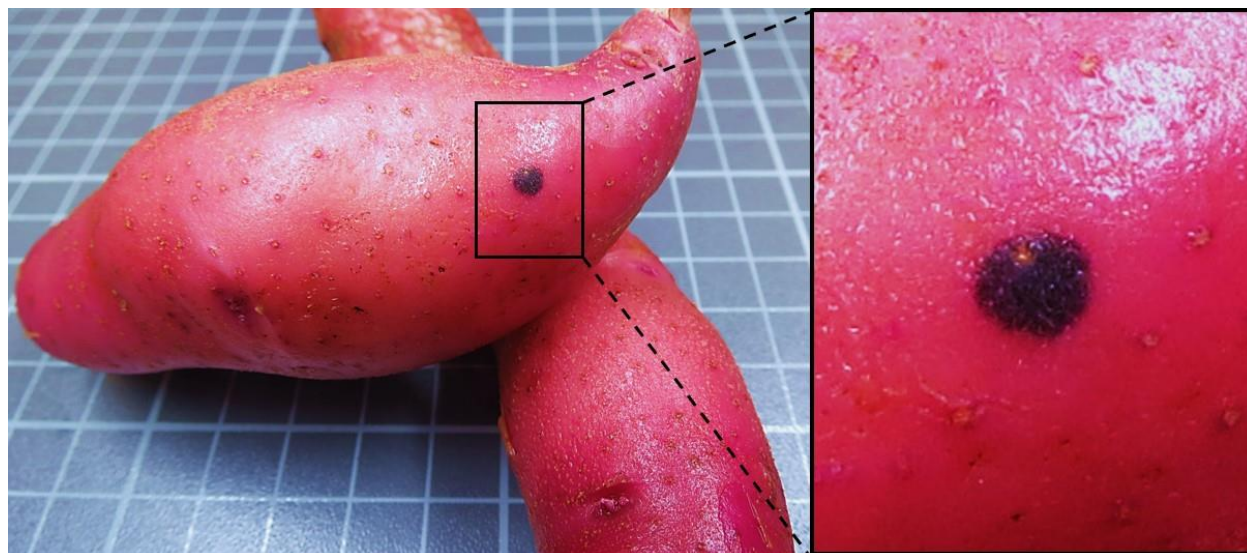


Abb. A10: Erscheinungsform einer chimären Knolle der Kartoffelsorte „Rote Emmalie“, mit punktförmiger, violetter Variegation in der ansonsten roten Knollenschale.

Tab. A1: 57 Farbige Kartoffelgenotypen, analysiert mittels LC-UV/MS zum initialen Anthocyanprofilung. Mit Sternchen (*) versehene Kultivare und Gewebe wurden für nachfolgende MRM Analysen ausgewählt (Verweis zu Tabelle 1). ^a Züchtung des IPK Groß Lüsewitz.

#	Name	Akzession	Ursprung	Farbe		Jahr der Kultivierung
				Fleisch	Schale	
1	Violettfleischige x Blue Marker – A1	K2007_01_003	DEU (2007) ^a	violett	violett	2013/2015
2 *	Violettfleischige x Blue Marker – B	K2007_01_008	DEU (2007) ^a	violett *	violett *	2013/2015
3 *	(Violettfleischige) – A1	S2007_01_001	DEU (2007) ^a	violett *	violett *	2013/2015
4	(Violettfleischige) – B	S2007_01_033	DEU (2007) ^a	violett	violett	2013/2015
5	(Blue Marker) – A	S2007_02_008	DEU (2007) ^a	violett	violett	2013/2015
6 *	(Blue Marker) – B	S2007_02_013	DEU (2007) ^a	violett	violett *	2013/2015
7	Oreb	10386	CZE (1983)	gelb	rot	2013/2015
8 *	Blaue Ajanhuiri	20003	UN	violett *	violett *	2013/2015
9 *	Bangladesh	22153	BGD	gelb	rot *	2013/2015
10	Lal Shil	26444	BGD	gelb	rot	2013/2015
11	R 93/025	11035	ROM	gelb	rot	2013/2015
12	MPI 84.146/2 D	11120	DEU	gelb	rot	2013/2015
13	Linzer Rose	11597	AUT (1969)	gelb	rot	2013/2015
14	Rosalie	11805	FRA (1971)	gelb	rot	2013/2015
15	Red La Soda	12101	USA (1953)	gelb	rot	2013/2015
16 *	Königspurpur	10097	DEU (1860)	rot	rot *	2014/2015
17 *	Desiree	10230	NLD (1962)	gelb	rot *	2014/2015
18	Reichskanzler	10344	DEU	gelb	rot	2014/2015
19 *	Early Rose	10722	USA (1867)	gelb	rot *	2014/2015
20	Südtiroler 2	10965	AUT	gelb	rot	2014/2015
21 *	Shetland Blau I	11041	UN	gelb	violett *	2014/2015
22	Cati	11337	ROM (1982)	gelb	rot	2014/2015
23 *	Rosamunda	11806	SWE (1974)	gelb	rot *	2014/2015
24	Prince Edward Island Blue	12005	CAN	gelb	violett	2014/2015
25 *	Weinberger Blaue	12012	AUT	gelb	violett *	2014/2015
26	Ryecroft Purple	12014	GBR	gelb	violett	2014/2015
27	Bell's Purple	12022	USA	gelb	violett	2014/2015
28 *	Mrs. Moerle's Purple Baker	12029	USA	gelb	violett *	2014/2015
29	Kefermarkter Blaue	12033	AUT	violett	violett	2014/2015
30	Vakon	12062	NLD	gelb	rot	2014/2015
31	Heidzel Blau	12177	UN	gelb	violett	2014/2015
32	Hunsrücker Rote	12182	DEU	gelb	rot	2014/2015
33	Roter Kuß	12199	DEU	gelb	rot	2014/2015
34	Runde Blaue Anden	12201	PER	gelb	violett	2014/2015
35	Ungarische Lange	12272	UN	gelb	rot	2014/2015
36	Ungarische Schramayer	12273	UN	gelb	violett	2014/2015
37	Shetland lila	12279	GBR	gelb	violett	2014/2015
38	Schwarze Ungarin	12283	HUN	gelb	violett	2014/2015
39 *	Vogtländische Blaue	12299	DEU	gelb	violett *	2014/2015
40	Blaue aus Finnland	12475	UN	violett	violett	2014/2015
41 *	Purple	12484	UN	violett	violett *	2014/2015
42	Alhamra	12509	GBR	gelb	rot	2014/2015
43	Mr. Bresee	12672	USA	gelb	rot	2014/2015
44	Ursula	12686	NLD (1967)	gelb	rot	2014/2015
45	Cerni Kartoffeli	12722	GEO	gelb	rot	2014/2015
46	Blaue Anneliese	10408	DEU (2004)	violett	violett	2014/2015
47	Blaue St. Galler	/	CHE (2004)	violett	violett	2014/2015
48	Violettfleischige x Blue Marker – C	K2007_01_016	DEU (2007) ^a	violett	violett	2014/2015
49 *	Rote Emmalie	10414	DEU (2012)	rot *	rot	2014/2015
50	Violettfleischige x Blue Marker – A2	K2007_01_003	DEU (2007) ^a	violett	violett	2014/2015
51	(Violettfleischige) – C	S2007_01_004	DEU (2007) ^a	violett	violett	2014/2015
52	Valfi	/	/	violett	violett	2014/2015
53 *	Violettfleischige x Blue Marker – D	K2007_01_015	DEU (2007) ^a	violett *	violett *	2014/2015
54 *	(Violettfleischige) – A2	S2007_01_001	DEU (2007) ^a	violett	violett *	2014/2015
55	Miss Blush	/	/	gelb	rot	2014/2015
56 *	Rosemarie	10413	DEU (2010)	rot	rot *	2014/2015
57 *	Vitelotte	/	FRA	violett *	violett *	2014/2015

Tab. A2 NCBI-Akzessionsnummern identifizierter *Stf3* '5'-Allele. Die Akzessionsnummern sind den im Fließtext verwendeten Allelbezeichnungen zugeordnet (linke Spalte). Zusätzlich sind die Kartoffellinien angegeben, in denen die Allele detektiert wurden (rechts).

Allel		Kartoffellinie	
Bezeichnung	NCBI-Akzessionsnummer	Nummer	Name
1	MN256403	#9, #16, #25, #57, #58	
#9_2	MN256404	#9	Bangladesh
#9_3	MN256405	#9	Bangladesh
#9_4	MN256406	#9	Bangladesh
#9_5	MN256407	#9	Bangladesh
#9_6	MN256408	#9	Bangladesh
#9_7	MN256409	#9	Bangladesh
#9_8	MN256410	#9	Bangladesh
#16_2	MN256411	#16	Königspupur
#16_3	MN256412	#16	Königspupur
#16_4	MN256413	#16	Königspupur
#16_5	MN256414	#16	Königspupur
#25_2	MN256415	#25	Weinberger Blaue
#25_3	MN256416	#25	Weinberger Blaue
#25_4	MN256417	#25	Weinberger Blaue
#25_5	MN256418	#25	Weinberger Blaue
#25_6	MN256419	#25	Weinberger Blaue
#25_7	MN256420	#25	Weinberger Blaue
#25_8	MN256421	#25	Weinberger Blaue
#25_9	MN256422	#25	Weinberger Blaue
#57_2	MN256423	#57	Vitelotte
#57_3	MN256424	#57	Vitelotte
#57_4	MN256425	#57	Vitelotte
#57_5	MN256426	#57	Vitelotte
#57_6	MN256427	#57	Vitelotte
#58_2	MN256428	#58	Gala
#58_3	MN256429	#58	Gala
#58_4	MN256430	#58	Gala
#58_5	MN256431	#58	Gala
#58_6	MN256432	#58	Gala

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation, abgesehen von der Beratung durch den Betreuer, selbstständig verfasst habe und keine weiteren Quellen und Hilfsmittel als die hier angegebenen verwendet habe. Diese Dissertation wurde weder ganz noch zum Teil einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Inhalte eines Teils dieser Arbeit (Abschnitt 2.2., Abschnitt 3.1. und Abschnitt 4.1.) wurden bereits in einer wissenschaftlichen Fachzeitschrift veröffentlicht (Oertel *et al.* 2017, doi: 10.1007/s00425-017-2718-4). Diese Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden. Außerdem versichere ich, dass mir noch nie ein akademischer Grad aberkannt wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Anne Oertel

Danksagung

An dieser Stelle danke ich allen, die direkt oder indirekt zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke PD Dr. Hans-Peter Mock dafür, dass ich diese Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anfertigen konnte. Dr. Mock, Dr. Andrea Matros und Dr. Stefan Martens bin ich dankbar dafür, dass sie mir durch die Mitarbeit an dem kollaborativen Projekt AnthoPLUS den Einstieg in die wissenschaftliche Forschung ermöglicht haben.

Prof. Dr. Dietrich Ober (Christian-Albrechts-Universität, Kiel) danke ich für die Begutachtung meiner Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Andrea Matros, die mir in Fragen rund um die biochemische Analytik immer zur Seite stand, mich an Ihrer langjährigen Erfahrung und Sachkenntnis als Wissenschaftlerin teilhaben lies und mich auch in sonstigen Lebenslagen inspiriert und unterstützt hat.

Dr. Martin Giersberg danke ich sehr für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, was mir die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglichte.

Dr. Sebastian Worch und Dr. Falko Matthes danke ich herzlich für die vielen anregenden und lehrreichen Diskussionen, ihre Geduld und seelische und moralische Unterstützung insbesondere während des Schreibens meiner Dissertation.

Dr. Anja Hartmann möchte ich für ihre engagierte Hilfe bei der Visualisierung der komplexen LC-MS-Metabolitdaten danken und Dr. Anna Maria Jozefowicz für die freundliche Unterstützung bei der LC-MS-basierten Proteinanalyse.

Vielen Dank an Elena Brückner, Annegret Wolf, Petra Linow und Jacqueline Fuge für ihre ausgezeichnete technische Unterstützung.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, Freunden sowie derzeitigen und früheren Kollegen die mich immer unterstützt, wenn nötig aufgebaut und manchmal auch angetrieben haben.