

# Antioxidanter i havre; kloning av gener för avenantramid-biosyntes

## Bakgrund

I Sverige, såväl som i andra västländer, ökar sjukvårdkostnaderna på ett alarmerande sätt. Vi äter för mycket mat, för fet mat och mat med en felaktig näringssammansättning. Hjärtinfarkt är den största orsaken till för tidig död både i Sverige och i USA (National Centre for Health Statistics). Det är helt nödvändigt att vända denna trend och istället övergå till mer hälsosamma matvanor. Detta skulle både öka livskvaliteten och minska belastningen på vår sjukvård (Collins, 1989; Duve and White, 1991; Peterson, 2002; Tian and White, 1994). En långsiktig vision är att få människor att äta mer havre, detta eftersom havre har flera dokumenterade positiva hälsoeffekter. Det finns goda data som visar att en havre-diet sänker blodkolesterolvärdet i vissa riskgrupper vilket har fått Food and Drug Administration (FDA) att konstatera "a diet high in soluble fiber from whole oats and low in saturated fat and cholesterol may reduce the risk of heart disease" (Kerckhoffs *et al.*, 2003). Speciellt viktiga ur hälsosynpunkt är havrens unika  $\beta$ -glukaner och antioxidanter, fr.a. avenantramider. Det finns goda data som visar ett regelbundet intagande av mat rik på naturliga fiber och antioxidanter motverkar hjärt-kärlsjukdomar och tjocktarmskancer (Collins, 1989; Duve and White, 1991; Peterson, 2002; Tian and White, 1994). Under senare år har flera nyttoprodukter baserade på havre lanserats, t.ex Proviva, Oatly och Magiform. Uppenbarligen börjar konsumenten få upp ögonen för havre. Genom att ytterligare öka halterna av de hälsobefrämjande bioaktiva komponenter som redan finns i havre, och genom att påvisa dessa effekter i biologiska testsystem, borde havre kunna utvecklas till en ännu bättre "functional food" gröda.

Att havrekärnor har ett gott naturligt skydd mot härskning har varit känt sedan länge. Redan på 1930-talet konstaterades att havre innehåller höga endogena halter av antioxidanter (Peters and Musher, 1937). Senare visades att ett flertal av dessa är av vilka de s.k. avenantramiderna är dominerande. Det finns indikationer på att dessa förutom antioxidantaktivitet även har lipogenase-inhiberande aktivitet, och att vissa kan fungera som antiallergener. Endast havre verkar innehålla dessa unika antioxidanter (Peterson, 2002). De endogena halterna av avenantramider i havrekärnan varierar dock mycket inte bara mellan olika havresorter, men också inom samma sort och från år till år och från lokal till lokal. Halterna kan variera 100 till 1000-faldigt! (Määttä *et al.*, 1999; Bryngelsson *et al.*, 2003; Dimberg *et al.*, 2001). Orsakssambandet är inte utrett, och litet är känt om regleringen av avenantramidbiosyntesen i cellen. Eftersom avenantramiderna normalt förekommer i relativt låga koncentrationer på ca 25-100 mg/kilo i kärnan är det också svårt att utvinna tillräckliga mängder för mer ingående studier eller att få fram extrakt med tillräckligt höga halter för att kunna visa på biologiska effekter i olika testsystem.

En havre med förhöjda avenantramidhalter skulle å andra sidan eventuellt kunna ersätta tillsatsen av antioxidanter till smågrisfoder, kunna ersätta vete i fiskfoder och en havreolja extraherad från hög antioxidanthavre skulle vara intressant att tillsätta diverse livsmedelsprodukter som t.ex. margariner, majonäser o.d. En förutsättning för att en sådan högavenantramidhavre skall kunna tas fram är dock att mer kunskap om regleringen av avenantramidbiosyntesen i cellen tas fram. Detta projekt syftade till att ta fram just sådan kunskap.

## Uppnådda resultat

### *Kloning och karakterisering av AtHHT genen.*

Projektets övergripande och viktigaste målsättning var att klona och karakterisera den/de gener som kodar hydroxycinnamoyl-CoA:hydroxyantranilate-N-hydroxycinnamoyl transferas (HHT) aktivitet i havre (Matsukawa *et al.*, 2000, Ishihara *et al.*, 1999, Ishihara *et al.*, 1998, Ishihara *et al.*, 1997).

Vid projektets start fanns det ingen publik sekvensinformation för *HHT* gener eller enzymer. Vår strategi var därför att analysera DNA sekvensen från ett antal gener från olika växter som kodar för enzymet HCBT (N-hydroxynamoyl-benzoyltransferase), och med hjälp av denna information designa degenerade primrar som för att amplifiera upp DNA från närbesläktade gener. HCBT enzymet valdes därför att dess enzymatiska aktivitet påminner om HHT. Genom RT-PCR amplifiering av totalt RNA isolerat från unga havreblad lyckades vi efter diverse optimeringar av reaktionsförhållandena, amplifiera upp ett flertal olika DNA sekvenser. En närmare analys av dessa visade att de flesta som väntat motsvarade varianter av HCBT genen. En sekvens avvek dock och var endast ca 80% lik HCBT genen. Då vi sökte med denna sekvens i publika databaser fick vi två träffar som båda visade sig vara opublicerade sekvenser från *Avena sativa* cvs. Shokan, deponerade av en Japansk grupp. Trots ett flertal tidigare sökningar av oss med sökord som HHT, Avena, cinnamoyl etc. hade vi tyvärr inte lyckats få fram dessa sekvenser ur den enorma informationsmängd som finns på Internet. Via korrespondens med den Japanska gruppen fick vi reda på att en publikation var på gång på Shokan sekvensen. Under februari 2004 kom publikationen ut, där det visades att dessa sekvenser mycket riktigt motsvarade *AtHHT* genen eftersom *in vitro* studier i ett expressionssystem med denna gen visade att den kodade för hydroxycinnamoyl-CoA:hydroxy-antranilat N-hydroxycinnamoyltransferas aktivitet (Yang et al., 2004).

Genom chromosome walking teknik isolerade vi en fullängdsklon av *AtHHT* genen från Sang och även 615 bp av dess promotersekvens. Den kodande delen innehåller en öppen läsram (open reading frame) på 1321 bp som motsvarar en proteinsekvens på 441 aminosyror. Vid jämförande studier av *HHT* generna från *Avena sativa* v. Sang och Shokan, visade det sig att dessa två gener var 99% homologa över hela den kodande delen. Mer överraskande var dock att Sang genen var 588 bp kortare än Shokan genen (figure 1). Eftersom läsramen var opåverkad och eftersom splice liknande signaler fanns runt den saknade biten tolkade vi detta som att *AtHHT* genen kan förekomma i olika splicevarianter. En teori är då att dessa olika varianter (isoformer) av enzymet kan ha något olika aktiviteter och därmed syntetiserar olika avenantramider.

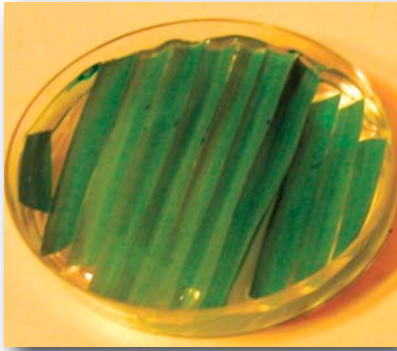


**Figure 1. HHT gener från *A. sativa* v Sang och *A. sativa* v Shokan.**

Grå färg indikerar promoter sekvens, svart färg är gemensam sekvens för Sang och Shokan medan vit färg indikerar unik 588 bp sekvens för Shokan. Siffran 1 anger förmodat transkriptionsstart, 131 translationsstart av HHT proteinet, 1454 translationsstop och 1755 polyadenyleringsställen (stopp av transkription). -600 indikerar slutet på promotersekvensen.

### ***Expression av ATHHT genen.***

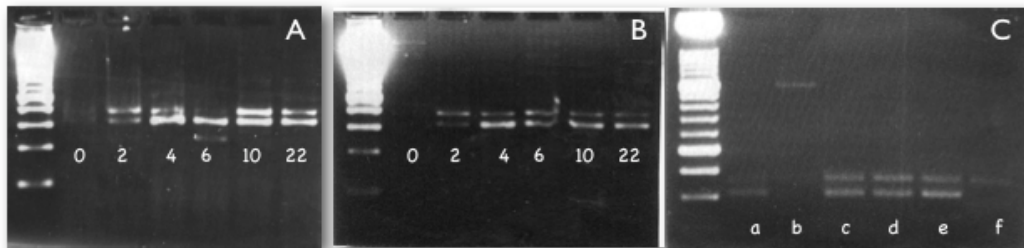
Genom att använda sekvensinformationen från *AtHHT* generna för att konstruera primers och genom att göra direkta prober från sekvenserna studerade vi regleringen av HHT genen med RT-PCR i ett flertal olika havresorter under ett flertal olika induktionsbetingelser. För att göra detta på ett systematiskt sätt utvecklade vi ett system där vi tog bort epidermis på unga blad som därefter stressades på likartat sätt genom att inkubera de tillsammans med olika inducers (figure 2). Ett antal olika stressparametrar såsom mekanisk stress (nålstick, klipp, skör), abiotisk stress (kyla, torra) och olika elicitorer (oligosaccarider, bakterieextrakt, Ca-ionoforer) testades. Efter detta togs bladbitar för RNA isolering vid ett flertal olika tidpunkter och uttrycket av *AtHHT* genen undersöktes.



**Figure 2. System för att testa avenantramid induktion i havre.**

Bladen togs från ca 6 dagar gamla plantor, epidermis togs bort på undersidan av bladen som därefter fick flyta på buffertlösning innehållande olika inducers.

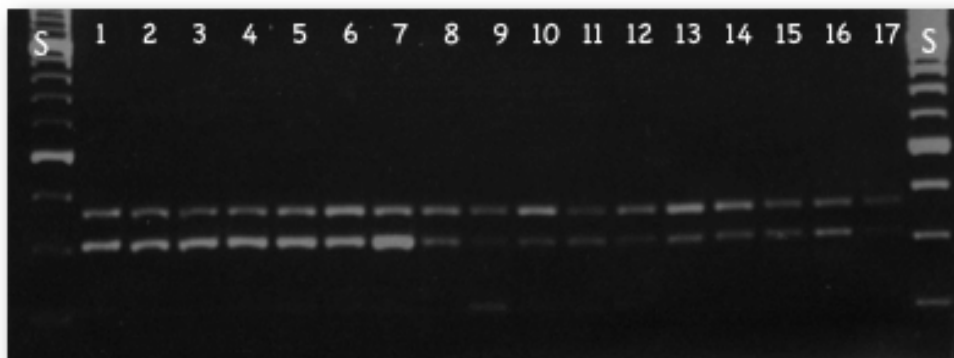
Som framgår så induceras AtHHT expressionen i ett flertal fall och vid olika tidpunkter. I majoriteten av fallen inducerades ett band motsvarande den kortare formen av enzymet, men i vissa fall erhöles även den längre formen (figur 3C. spår b). Vidare visade experimentet med den bakteriella inducern, i detta fall ett extrakt från *Pseudomonas fluorescens* benämmt FPT 9601, att induktion skedde redan efter 2 timmar i båda de testade sorterna. Trots ett stort antal försök lyckade vi dock varken få en riktig reproducerbarhet i induktionskinetiken eller definiera vilken inducer som var mest effektiv. Uppenbarligen är regleringen mycket komplex, där även differentiell splicing kan ingå som en del.



**Figure 3. RT-PCR experiment på AtHHT expression under olika induktionsförhållanden och tider.**

A. sativa Absolutem mutique inkuberade 0 till 22 minuter (angivet under gelbanden) med en bakteriell inducer. B. A sativa Emma inkuberade 0 till 22 minuter (angivet under gelbanden) med en bakteriell inducer. C. Test av olika stimuli. a, ingen behandling; b, epidermis avlägsnat; c, nålstick; d, gnuggning; e, hackning; f, köldbekämpning.

Slutligen testade vi *AsHHT* expressionen i olika havresorter. I detta fall inducerade vi alla med FTC elicitor under 4 timmar innan RNA isolering och RT-PCR analys. Detta visade att det finns en stor variation i *AtHHT* expression mellan olika havresorter där t.ex SW Betania och Jaune geante a grappes visade ett relativt högt uttryck medan Euro hade betydligt lägre och Matilda och SW Seger i princip inget uttryck alls av *AtHHT* genen (figur 4).

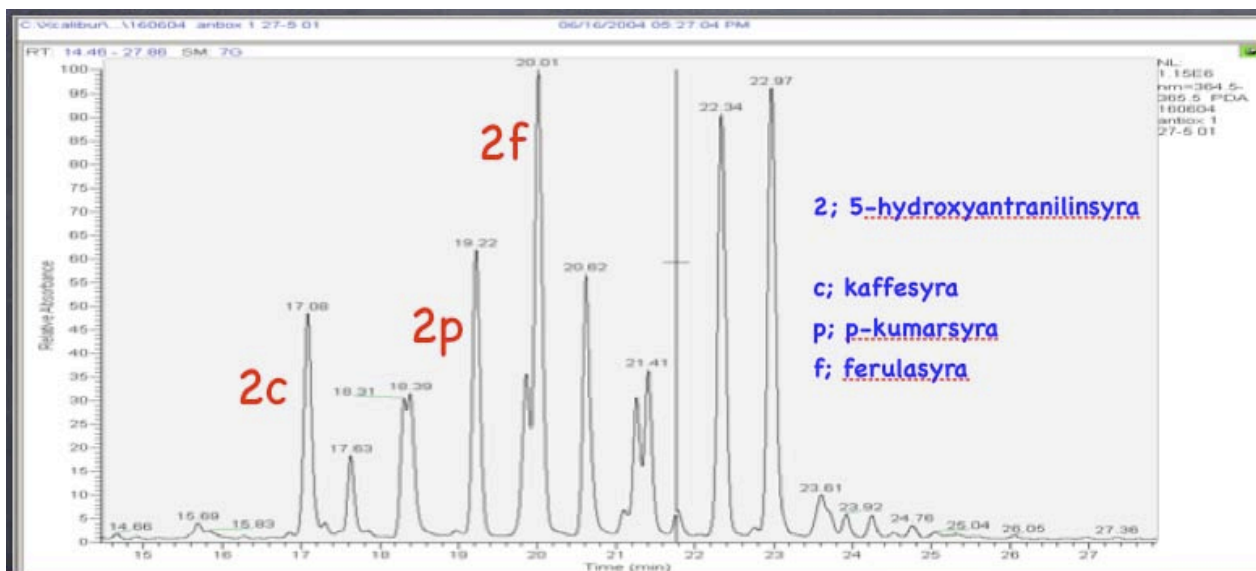


**Figur 4. RT-PCR analys av AtHHT expression i 17 olika havresorter**

S, 100 bp stege (storlekskontroll); 1, Gotland; 2, Grise d'auvergne; 3, Stormogul; 4, Endress weiss; 5, Noire semi nuda orientalis; 6, SW Betania; 7, Jaune geante a grappes; 8, Blanche du vieux moulin; 9, SW01168; 10, Euro; 11, SW Matilda; 12, Bullion; 13, Rouge du centre; 14, SW Sang; 15, SW00327; 16, SW Seger; 17, SW Akt och S, 100 bp stege (storlekskontroll).

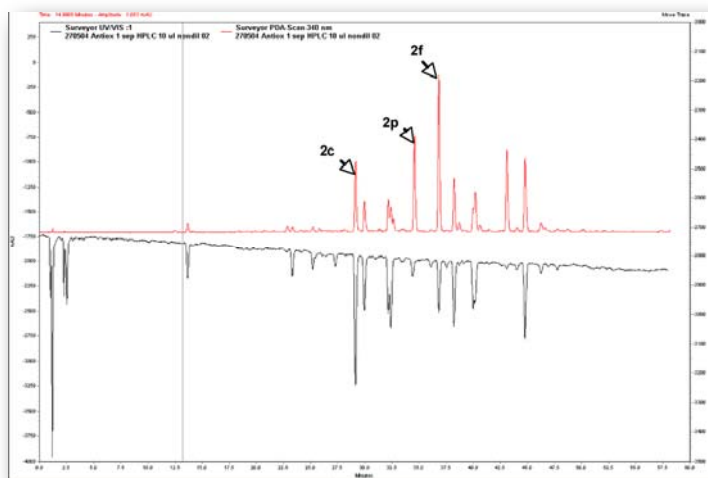
## Post-transkriptionell kontroll av avenantramid biosyntes

Förutom den komplexa och svår-reproducerade variationen i *AtHHT* genregleringen kan även den mängd avenantramider som slutligen syntetiseras också påverkas av post-transkriptionella regleringsmekanismer. För att undersöka detta utarbetade vi en metod för direkt kvantifiering av avenantramider. Vi utarbetade först en extraktions- och separations assay för frön och kalibrerade systemet m.h.a. tre olika standars (erhållna från D. Peterson, USA). Dessa var 2c, 2p och 2f (5-hydroxyantranilin - kaffesyra, 5-hydroxyantranilin - p kumarsyra och 5-hydroxyantranilin - ferulsyra). Vi identifiera därefter dessa tre avenantramider i extrakt från Sang frön (figur 5).



**Figure 5. HPLC separation av avenantramider extraherade från Sang frön.**  
2c, 2p och 2f indikerar identifierade avenantramider.

Genom att köra avenantramid separationen i närvaro av ett ämne, ABTS (2,2'-azinobis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate), som ändrar färg då den direkt reagerar med antioxidanter i HPLC separationsmixen kunde vi bekräftad avenantramiderna antioxidantaktivitet (figur 6). Detta försök visade också att den mest aktiva avenantramiden är 2c medan 2p var minst aktiv.



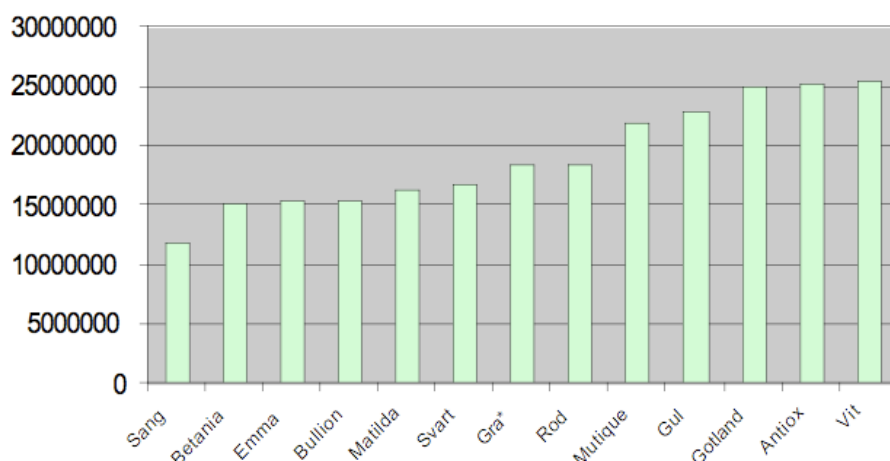
**Figure 6. HPLC separation av avenantramider i närvaro av ABTC.**  
Pilar indikerar avenantramider detekterade med PDA. Svarta toppar under pilarna indikerar antioxidantaktivitet detekterade med UV/VIS.

Vi fortsatte därefter med att extrahera avenantramider från frön från 13 olika havresorter (tabell 1) som tidigare rapporteras ha olika halter av avenantramider. Vi analyserade dessa i ABTC systemet och fann då att aktiviteten varierade ca en faktor 2 mellan de högsta och lägsta halterna (Figur 7).

Short name	Scientific Name	Weight [g] Sample 1	Weight [g] Sample 2
Antiox	SW 00327	0.4972	0.4953
Betania	SW Betania	0.4811	0.5141
Bullion	Bullion	0.5101	0.5061
Emma	SW 01168	0.4960	0.4988
Gotland	NGB 4874	0.4891	0.4968
Gra	Grise d'auvergne	0.5105	0.5078
Gul	Jaune geante a grappes	0.4974	0.4927
Matilda	Matilda	0.5062	0.5044
Mutique	Absolument mutique	0.5061	0.4963
Rod	Rouge du centre	0.4843	0.5030
Sang	Sang	0.5037	0.4980
Svart	Noire semi nuda orientalis	0.5036	0.4893
Vit	Blanche du vieux moulin	0.4896	0.4870

Tabell 1. Använda havresorter i denna studie.

Högst antioxidantaktivitet uppmättes i frön från havresorterna Blanche du vieux moulin ("vit"), SW00327 ("antiox") och NGB4874 ("Gotland"), medan Sang uppvisade lägst aktivitet (figur 7).



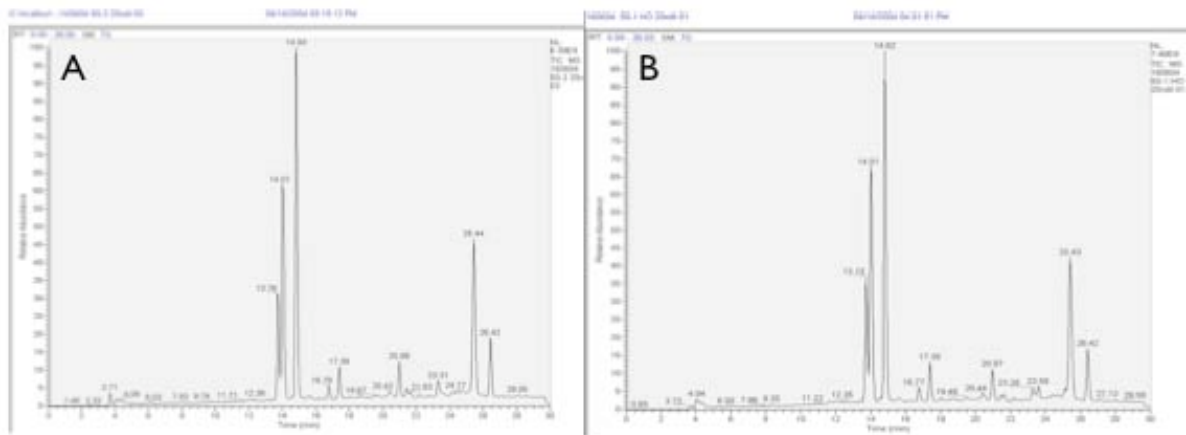
Figur 7. Total antioxidantkapacitet i 13 olika havresorter.

Testad havresort är indikerad under staplarna. Se tabell 2 för utläsning av sorterna. Y-axlen visar antioxidantaktivitet uttryckt som totala ytan från en ABTC topp dividerad med uppvägd mängd frön använt i avenantramidextraktionen.

Vi utnyttjade därefter samma assay för att mäta avenantramidaktivitet i blad. Tanken var att dels på protein-aktivitetsnivå konfirmera RT-PCR resultaten och dels ytterligare optimera induktionsförhållanden för avenantramid biosyntes. I praktiken visade sig emellertid avenantramidinduktionen vara mycket komplex och även om försöket rent tekniskt fungerade bra, kunde vi inte med hjälp av dessa kvantitativa avenantramidmätningar definiera optimala induktionsförhållanden för avenantramid biosyntes (Figure 8).

Dessa försök bekräftade således de initiala RT-PCR försöken, dvs. det var mycket svårt att initiera *AtHHT* gen expression i blad trots att ett flertal olika potentiella inducers testades. Vi vet helt enkelt för lite om hur *AtHHT* genen regleras. För att bättre reda ut mekanismerna för *AtHHT* genuttryck satte vi därför upp teknik för sk. "chromosomal walking" i havre och med hjälp av specifika primers från strukturgensekvensen vandrade vi uppströms och isolerade ca 600 bp av den promotor som styr *AtHHT* genen (Figure 9).

Som framgår innehåller *AtHHT* promotorn, förutom de förväntade TATA och CAAT boxarna, också ett antal potentiella reglerande cis-element varav vi bedömer två Myb boxar och en Dof box som de



**Figure 8. HPLC kromatogram av avenantramid metanolextraktioner från inducerade och oinducerade blad.**

A. Extraktion från unga blad från ca 6 dagar gamla havre plantor. B. Extraktion från unga blad från ca 6 dagar gamla havre plantor efter 4h induktion av FTP elicitor (figure 3B).

mest intressanta. Det finns exempel från andra gener där sådana element är involverade i stressreglering bl a. i köldstress och torkstress. Mer forskning behövs givetvis för att konfirmera detta också för *AtHHT* genen.

```

                                Myb box
1  TAGGGCACGCGTGGTTCGACGGCCCGGGCTGGTATCAACTGCTGCAAAATAAAATCAGAGGCTGGTGTCCACTGCACAGATTACGGGGACCAACCAC
                                Dof box
97 GCATTGTCTTTGCTTTGAAGTGCCTTTTCTACCATAAAGCGTGAAGGTGCTGTCAGCGCTGATGCATCGAGCAGATCAGGCCGATGTGTAGAGGCC
                                Myb box
192 ACCGGCAGSGCGTCCATACCACGGTAGGTTGGACCGCTCCACCCAGGATCGAGCAACAGTTGAGCGTCCAAGCCCCAAACCTCCCTCCCTGTC
286 TCTGCCTTTTCCGCCGGTCAATCCACCAACTCCCCACCGTCGCCCTCCTCCTCCCGAAACCAATGAGCTGCTGCTAAAACTCGAAGCAGA
382 AAAAAAAAAAAGGAACGGCGGCATCCCGCTGGATGCCGGTATATAAAACCGCGCCACCCCCCTTTGCTCACCAGCTCTCCACCAAGAGCTACC
478 TACTAGAACTACTTTAATCATAGCACCGCTGCGCCGTCCTACCACGCGTGTGACCGCGGCTTCTTCTCGTAGAGACGACCCCTTCGCTTTAGTT
574 TCCCCTCCGAGTCCCAGATCTGCAGCGAGAAGGAGAAG ATG AAG ATC ACG GTG CGG AGC TCG ACG GTG GTG

```

**Figur 9. Nukleotidsekvens av *AtHHT* promotern.**

Röda bokstäver indikerar promotersekvens, blåa proteinkodande sekvens (open reading frame). Intressanta cis-element är skrivna i fetstil och indikerade som boxar, eller med grön text ovanför själva cis-elementet.

## Diskussion

Den huvudsakliga målsättningen för detta projekt var att klonera genen för avenantramidbiosyntes från havresorten Sang. Eftersom ingen *HHT* gen fanns klonad vid starten av detta projekt, och eftersom havregenomet är mycket stort, var detta ingen trivial uppgift. Vi löste detta genom att utnyttja sekvenslikheter från närbesläktade enzym med liknande aktiviteter som HHT och kunde på så vis designa lämpliga primerpar. Vi fick då produkter i våra PCR-amplifieringar som motsvarade en helt ny gen som var ca 80% likt *HCBT* genen. Vid sökning med denna i diverse databaser hittade vi en liknande sekvens som var inlagd under opublicerade data. Vid kontakt med de japanska forskare som lagt in sekvensen visade det sig då att den mycket riktigt kodade för HHT-enzymet. Det var naturligtvis lite retfullt att vi inte hann först med att klonera denna gen, men andra sidan sparade vi nu en hel del tid i att karaktärisera den biokemiska aktiviteten av en sekvens vi hade plockat upp. Istället hade vi ett bra verktyg för att direkt gå vidare till andra fasen av detta projekt, dvs. att studera den naturliga regleringen av avenantramidbiosyntes i havre.

Det verkar finnas ett visst samband mellan olika faktorer såsom bakterie- och svampangrepp, torka och effekt av olika odlingsregimer och syntes avenantramider hos fältodlade plantor (Määttä et al, 1999). Inte i något fall har dock ett klart samband mellan någon enskild stressfaktor, eller någon definierad odlingsparameter och AA halter kunnat påvisas. Ett skäl till detta är att samtliga dessa studier har utförts på frön och man har mätt på slutprodukterna. Enligt den Japanska studien induceras deras HHT gen både av patogener såsom *Pseudomonas* och svartröst och av diverse elicitors. Induktionen är dynamisk, dvs efter några timmar nedregleras HHT biosyntesgenen igen. Om man mäter AA halter i frön så mäter man således summan av alla händelser under hela tillväxtsäsongen där otaliga olika stressfaktorer ständigt har stimulerat plantorna. Det är därför mycket svårt att definiera de samband som råder mellan olika miljöparametrar, geninduktion och upplagring av slutprodukterna, avenantramiderna.

För att komma förbi detta dilemma utarbetade vi ett system där vi under mycket kontrollerade former kunde studera HHT induktionen och därmed avenantramidbiosyntesen. Vi odlade havreplantor under standardiserade former i växthus. Efter 10 dagar isolerade vi unga blad från dessa plantor, inkuberade dessa i närvaro av olika inducerande förhållanden som tex elicitorer, kalciumionoforer, höga och låga temperaturer, torkstress etc. under varierande tider från minuter till några timmar. Vi isolerade därefter RNA från dessa blad och med hjälp av RT-PCR och specifika HHT primrar mätte vi specifik induktion av HHT genen. Trots att dessa studier upprepades i 10 olika havresorter, lyckade vi dock inte hitta reproducerbara induktionsbetingelser likt vad Japanerna visade. Systemet är således mycket komplext.

För att fastlägga sambandet mellan induktionen av HHT genen och ackumulering av slutprodukten, och för att utesluta en reglering av avenantramidaktivitet på posttranskriptionell nivå satte vi upp analysmetoder för att direkt mäta avenantramid halter i unga blad. Som positiv kontroll använde vi extrakt från frön. Vi kunde då endast påvisa låga mängder av avenantramid i blad, vilket således bekräftade de molekylära studierna.

Vid jämförande studier av Sang *AtHHT* genen med den Japanska Shokan genen visade det sig att Sang sekvensen var ca 588 bp kortare, samtliga bp från den kodande delen av sekvensen. Samtidigt var läsramen bevarad, dvs. Sang sekvensen kodar för ett protein som är 196 aa kortare än hos Shokan. Detta skulle kunna innebära att syntesen av HHT regleras via differentiell splicing av mRNA.

Sammanfattningsvis så att *AtHHT* genen således mycket intressant både ur grundvetenskaplig och tillämpad synpunkt. Rent vetenskapligt kan vi lära oss mer om hur denna gen regleras och därmed också lära oss nya saker om genstruktur och genreglering i havre. Sådan kunskap kan leda till att vi kan ta fram havre med högre avenantramidhalter. Detta kan ske antingen genom att identifiera en regleringsmutant i *AtHHT* expressionen eller en mutation i ett cis element i *AtHHT* promotorn i vår Tillingpopulation. Kunskap om *AtHHT* gensekvensen gör också att vi kan producera transgen hög-avenantramid havre där *AtHHT* genen uttrycks t.ex från en stark fröspecifik promotor. Vid en eventuell fortsättning på detta projekt är det just dessa saker vi kommer att fokusera på. Under våren 2008 kommer vi också att generera och analysera 400000 nya havre EST sekvenser från blad och ytterligare 400000 från frön. Vi bör då också hitta alla de olika splice varianter av *AtHHT* genen som existerar.

## Material och metoder

### *Culturing conditions*

All oat (*Avena sativa* L.) cultivars were grown on "enhetsjord K" soil in the green-house in a day/night temperature regime of 20/16°C, an 18 h photoperiod and a photon flux density of 297  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

### *Elicitation of primary leaves*

Primary leaves from 8d old plants were picked and treated with elicitor. The same leaves were also used for RNA isolation (see below). Two different elicitors were used, penta-N-acetylchitopentaose, provided by Seikagaku Corporation, and an FPT elicitor, prepared according to the protocol below. First, elicitor treatment was performed as described by Ishihara *et al.* (1998). The young first leaves of two cultivars, Sang and SW00327, were picked and the lower epidermis was peeled off using a scalpel and a pair of forceps. The peeled leaves were then placed in Petri-dishes containing elicitor with the peeled side down. A treatment series of 30 minutes, 1h, 2h, 4h, 10h, 20h, 24h and 32h were performed in order to determine the optimal time of induction. In all experiments untreated leaves were used as controls. After peeling of the lower epidermis, leaves were left floating on the elicitor. In addition leaves without peeling were included, which instead were pecked by a needle, rubbed with the edge of a spoon or cut into small pieces. Some plants were also placed at 4°C for 20 h.

### *Preparation of FPT elicitor*

Colonies of two strains of *Pseudomonas* (*P. chlororaphis* and *P. fluorescens*), cultivated on agar plates were picked and put in LB medium to grow in room temperature over night. The cells were centrifuged at 5000 x g for 10 minutes and the pellet was washed twice with 3 ml of 10 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5) and finally resuspended in 1 ml of 10 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5). The bacterial suspension was thereafter heated in a boiling water bath for 3 min and centrifuged at 15000 x g for 10 minutes. The resulting supernatant was diluted 100-fold and was designated FPT elicitor.

### *Isolation of total RNA*

After elicitor treatment (see above), the leaves were snap-frozen in liquid nitrogen and used as template for RNA extraction. To extract total RNA from the treated leaves, approximately 0.5g of the frozen tissue was grinded in liquid nitrogen using mortar and pestle. Extraction was then carried out according to the TRIZOL protocol provided by Invitrogen. The extracted RNA was dissolved in RNase-free water and at -80°C. The RNA concentration and the purity of the extracted samples were assessed by spectrophotometry according to Sambrook *et al.* (A8.20-21) and the integrity of the RNA was assessed by running the samples on a 2% agarose gel. i

### *RT-PCR*

Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) was performed in an Eppendorf Mastercycler using the SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® *Taq* DNA Polymerase kit by provided by Invitrogen. Reactions were performed in 25µl RT-PCR reaction contained 12.5 µl 2x Reaction mix (a buffer containing 0.4 mM of each dNTP and 3.2 mM MgSO<sub>4</sub>), 0.5 µg total-RNA, 10 µM forward primer (AsHHT1for), 10 µM reverse primer (AsHHT1rev), 2 µl SuperScript™ III RT/ Platinum® *Taq* Mix. Temperatures, time lengths and the number of cycles were optimized to give as clear results as possible.

### *Isolation of 3'- and 5'-end sequences*

To obtain the full-length *AsHHT*-gene, an RNA ligase-mediated rapid amplification of 5'-and 3'-cDNA ends method (RLM-RACE) was performed. The GeneRacer™ Kit from Invitrogen was used for this application according to the protocol provided by the manufacturer. Extracted total-RNA from the oat cultivar Sang treated with elicitor for 10 h was used as template. The primers AsHHT1for and AsHHT1rev were used to amplify oat sequences and actin primers (ascid127C2v1f and ascid127C2v1rt) were used as control.

### *Analysis of obtained sequences*

To verify that the obtained sequences were *AsHHT* fragments, the sequences were run in Blastn searches on NCBI's homepage (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Furthermore, blast searches were performed against the UniGene set of 2866 oat transcripts in our oat database (<http://www.agod.org>) to find out whether the sequences already existed in this UniGene set (Bräutigam *et al.*, 2005).

### *Seed sample preparation for avenantramid analysis*

Seeds were peeled by hand and ground in a mortar. Approximately 0.5 g (Table 1) of the ground seeds was weighed out in duplicates and extracted with 4 ml 100% methanol three times. The samples were shaken for 1 hour and centrifuged for 20 minutes (4500rpm) in all three extraction steps. The supernatants were collected after each centrifugation step and the methanol was evaporated through vacuum drying in speedvac. The dried samples were resolved in 250 µl of 100% methanol.

### *Measuring the Total Antioxidant Capacity (TAC) by Using ABTS*



TAC was measured by using the ABTS method. This technique measures the relative ability of antioxidant substances to scavenge the 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) radical cation (ABTS<sup>•+</sup>). Two different detectors were used; the UV/VIS detector measures absorbance at 720nm and recognizes the color change when ABTS<sup>•+</sup> reacts with antioxidants and the PDA detector measures absorbance at all wavelengths at the same time and detects different compounds separated by the HPLC column. The area of the peaks detected with the UV/VIS detector is a measurement of the antioxidant activity of a certain compound. The antioxidant activity was recalculated into trolox equivalents.

## Referenser

- Bryngelsson, S., Ishihara, A. and Dimberg, L. H. Levels of avenanthramides and activity of hydroxycinnamoyl transferase (HHT) in steeped or germinated oat samples. *Cereal Chem.* 80 (2003) 356-360
- Collins, F.W. 1989. Oat phenolics, avenanthramides, novell substituted N-cinnamoylanthranilate alkaloids from oat groats and hulls. *J. Agricult. Food Chem.* 37, 60-66
- Dimberg, L. H., Sunnerheim, K., Sundberg, B. and Walsh, K. Stability of oat avenanthramides. *Cereal Chem.* 78 (2001) 278-281.
- Duve, K.J. and White, P.J. 1991. Extraction and identification of antioxidants in oats. *Journal of the American Oil Chemists Society* 68, 365-370.
- Ishihara, A., Matsukawa, T., Miyagawa, H., Ueno, T., Mayama, S. and Iwamura, H. 1997. Induction of Hydroxycinnamoyl-CoA: Hydroxyanthranilate N-Hydroxycinnamoyltransferase (HHT) activity in oat leaves by victorin C. *Zeitschrift f. Naturforsch.* 52c, 756-760
- Ishihara, A., Miyagawa, H., Matsukawa, T., Ueno, T., Mayama, S., Iwamura, H. (1998) Induction of hydroxyanthranilate hydroxycinnamoyl transferase activity by oligo-N-acetylchitooligosaccharides in oat. *Phytochemistry*. Vol. 47, No. 6, 969-974 .
- Ishihara, A., Ohtsu, Y., Iwamura, H. (1999) Induction of biosynthetic enzymes for avenanthramides in elicitor-treated oat leaves. *Planta*. 208, 512-518 .
- Kerckhoffs, D.A.J.M., Hornstra, G., Mensink, R.P. (2003) Cholesterol-lowering effect of  $\beta$ -glucan is incorporated into bread and cookies. *Am. J. Clin. Nutr.* 78, 221-227
- Määttä, K., Lampi, A.-M., Pettersson, J., Mannerstedt-Fogelfors, B., Piironen, V., and Kamal-Eldin, A. Phytosterol content in seven oat cultivars grown at three different locations in Sweden. *J. Sci. Food Agric.* 79 (1999) 1021-1027
- Matsukawa, T., Isobe, T., Ishihara, A., Iwamura, H. (2000) Occurrence of avenanthramides and hydroxycinnamoyl-CoA:hydroxyanthranilate N-hydroxycinnamoyltransferase activity in oat seeds. *Z Naturforsch.* 55, 30-36.
- Määttä, K., Lampi, A.-M., Pettersson, J., Mannerstedt-Fogelfors, B., Piironen, V., and Kamal-Eldin, A. Phytosterol content in seven oat cultivars grown at three different locations in Sweden. *J. Sci. Food Agric.* 79 (1999) 1021-1027
- National Center for Health Statistics and the American Heart Association. Facts about cardiovascular disease. *Circulation* 1992, 85 A103 (abstr).
- Peters, F.N. and Musher, S. 1937. Oat flour as an antioxidant. *Ind. Eng. Chem.* 24, 146-151
- Sambrook, J., Russel, D.W. (2001) *Molecular Cloning*, A8.12-15, A8.20-21
- Tian, L.L. and White, P.J. 1994. Antioxidant activity of oat extract in soybean and cottonseed oils. *Journal of the American Oil Chemists Society* 71, 1079-1086.
- Yang, Q., Trinh, H.X., Imal, S., Ishihara, A., Zhang, L., Nakayashiki, H., Tosa, Y. and Mayama, S. 2004. Analysis of the involvement of hydroxycinnamoyltransferase and caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase in phytoalexin biosynthesis in oat. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17, 81-89.

## Egna publikationer och övrig resultatförmedling till näringen (från 2004)

Under projektperioden har vi publicerat 5 uppsatser med havreanknytning i internationellt välrenommerade tidskrifter. Vi har ännu inte publicerat någon uppsats specifikt på avenanthramiderna, eftersom detta arbete inte är färdigt för en riktigt bra tidskrift. Som framgår har vi också visat ett antal posters vid internationella symposier och jag har personligen hållit ett stort antal anföranden för diverse havreaktörer, bl.a vid Uddevallakonferensen, för Svalöf Weibulls, för Svensk Havreförening och vid internationell cerealiekonferens i Köpenhamn och Lettland. Nedan följer en mer detaljerad redovisning.

### *Publikationer i internationella tidskrifter med vetenskapligt granskningsystem*

- Bräutigam, M., Lindlöf, A., Zakhrabekova, S., Olsson, B. and Olsson, O. 2005. Generation and analysis of 9792 EST sequences from cold acclimated oat, *Avena sativa*. BMC Plant. Biol. 5:18
- Bräutigam, M., Chawade, A., Gharti-Chhetri, G., Lindlöf, A., Jonsson, A., Jonsson, O., Olsson, B. and Olsson, O., 2006. Development of Swedish winter oat with gene technology and molecular breeding. Journal of Swedish Seed Association 1-2, 23-35.
- Lindlöf, A., Bräutigam, B., Chawade, A., Olsson, B. and Olsson, O. (2007) Identification of Cold-Induced Genes in Cereal Crops and *Arabidopsis* Through Comparative Analysis of Multiple EST Sets. S. Hochreiter and R. Wagner (Eds.): BIRD, LNBI 4414, pp. 48–65, 2007
- Chawade, A., Bräutigam, B., Lindlöf, A., Olsson, O. and Olsson, B. (2007). Novel cold acclimation pathways in *Arabidopsis thaliana* identified by a combined analysis of mRNA co-expression patterns, promoter motifs and transcription factors. BMC Genomics 8:304
- Lindlöf, A., Bräutigam, B., Chawade, A., Olsson, O. and Olsson, B. (2008) Evaluation of combining several statistical methods with a flexible cut-off for identifying differentially expressed genes in pairwise comparison of EST sets. Bioinformatics and Biology Insights (in press)

### **Posters visade vid internationella konferencer**

- Bräutigam, M., Jonsson, A., Olsson, B. and Olsson, O. Development of an oat database. 7<sup>th</sup> International Oat Conference, i Helsingfors, 17-22 Juli 2004.
- Bräutigam, M., Lindlöf, A., Zakhrabekova, S., Olsson, B. and Olsson, O. Analysis of 9896 Expressed Sequence Tags in Cold acclimated Oat, *Avena sativa*. 7<sup>th</sup> International Oat Conference, i Helsingfors, 17-22 Juli 2004.
- Jonsson, R., Gharti-Chhetri, G., Bräutigam, M., Jonsson, A. and Olsson, O. Development of Scandinavian winter oat by molecular breeding and tissue culture techniques. 7<sup>th</sup> International Oat Conference, i Helsingfors, 17-22 Juli 2004.
- Bräutigam, M., Gustavsson, Å., Zakhrabekova, S., Olsson, B. and Olsson, O. Molecular characterization of *CBF* transcription factor genes in oat 7<sup>th</sup> International Oat Conference, i Helsingfors, 17-22 Juli 2004.
- Gharti-Chhetri, G. and Olsson, O (2004) Establishment of highly efficient callus proliferation, plant regeneration and micro-tillering systems in commercial oat cultivars. 7<sup>th</sup> International Oat Conference, i Helsingfors, 17-22 Juli 2004.
- Bräutigam, M., Gharti-Chhetri, G., Gustavsson, Å., Jonsson, R., Olsson, B. and Olsson, O. Development of a Scandinavian winter oat by molecular breeding and transgenic techniques. GCR meeting Temperature Stress in Plants, Ventura California 2005
- Gokarna Gharti-Chhetri and Olof Olsson (2006) Establishment of highly efficient callus proliferation, plant regeneration and micro-tillering systems in commercial oat (*Avena sativa* L.) cultivars. Poster # P46038, Plant Biology 2006, Boston, USA

### **Presentationer med havreanknytning**

- Olof Olsson, Marcus Bräutigam, Gokarna Gharti-Chhetri, Rickard Jonsson and Björn Olsson. Oat genomics and its application to breeding. Inbjuden talare EU-COST möte i Köpenhamn, maj 2004
- Olof Olsson. Design of superior oat by gene technology. Meeting in Oslo, maj 2005
- Marcus Bräutigam, Gokarna Gharti-Chhetri, Åsa Gustavsson, Rickard Jonsson, Björn Olsson and Olof Olsson. Development of a Scandinavian winter oat by molecular breeding and transgenic techniques. The 5th Workshop in the Nordic Arabidopsis Network, Danmark 2005.
- Olof Olsson. Genteknik och dess möjligheter i havreförädlingen. Möte med AnalyCen, Göteborg, januari 2006
- Olof Olsson. Genernas kraft – gränslösa möjligheter med molekylärbioologi. Växtodlings- och växtskyddskonferensen i Uddevalla, januari 2006
- Olof Olsson. Framtidens havre – med och utan GMO. Föredrag i samband med bildandet av en svensk havreförening. Landskrona, augusti 2006
- Olof Olsson. Molecular efforts toward a Swedish winter oat. Inbjuden föreläsare vid ett möte anordnat av Nordic Council of Ministers program; INTERFACES OF MOLECULAR BIOLOGY AND AGRICULTURE: PERSPECTIVES OF MOLECULAR BREEDING IN THE NEXT DECADE. Riga, Lettland, mars 17-18, 2007
- Olof Olsson. Högantioxidant omega-3 havre i livsmedel. Presentation för Mills AS i Norge, maj, 2007
- Olof Olsson. Molekylär teknikutveckling för havreförädling. Svensk havreförenings årsmöte i Göteborg, juni, 2007
- Olof Olsson. Oat Tilling. Inst för växt och miljövetenskaper, Göteborgs Universitet. September 2007
- Olof Olsson. Aktuell havreforskning vid Göteborgs Universitet för BASF-PSS. December, 2007