Identifizierung und Charakterisierung der Sinapinesterase aus *Brassica napus* sowie ihre Nutzung zur Modifikation des Sinapinstoffwechsels

Dissertation

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

vorgelegt der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Kathleen Clauß

geb. am 21. August 1978 in Eisenhüttenstadt

Gutachter:

Prof. Dr. Dieter Strack

Prof. Dr. Jonathan Gershenzon

Prof. Dr. Jörg Degenhardt

Halle (Saale), den 23.2.2012

- Für meine Eltern -

„Wir werden nicht aufhören zu forschen und zu erkunden
und am Ende aller unserer Erkundungen werden wir dort ankommen,
wo wir anfingen und begreifen - *im besten Fall* - den Ort zum ersten Mal."

T. S. Eliot

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS ..... **I**

ABBILDUNGEN ..... **IV**

TABELLEN ..... **VI**

ABKÜRZUNGEN ..... **VII**

1. EINLEITUNG **1**

1.1. PFLANZLICHER SEKUNDÄRSTOFFWECHSEL 1

1.1.1. Phenylpropanstoffwechsel 2

1.1.2. Sinapinstoffwechsel 2

1.2. DIE ENZYME DES SINAPINSTOFFWECHSELS 6

1.2.1. Glucosyltransferasen 6

1.2.2. Acyltransferasen 7

1.2.3. Esterasen 8

1.3. *BRASSICA NAPUS* ALS WIRTSCHAFTLICH BEDEUTENDE NUTZPFLANZE 9

1.4. ZIELSETZUNG DER ARBEIT 11

2. MATERIAL UND METHODEN **13**

2.1. MATERIAL 13

2.1.1. Chemische und molekularbiologische Reagenzien 13

2.1.2. Pflanzenmaterial 13

2.1.3. Plasmide 14

2.1.4. Mikroorganismen 14

2.1.5. Oligonukleotide 15

2.1.6. Geräte 15

2.2. KULTIVIERUNG, TRANSFORMATION UND SELEKTION DER ORGANISMEN 16

2.3. BIOCHEMISCHE METHODEN 18

2.3.1. Proteinextraktion 18

2.3.2. Aufkonzentrierung von Proteinlösungen 21

2.3.3. Proteinkonzentrationsbestimmung 21

2.3.4. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) 21

2.3.5. SCE-Aktivitätstest 22

2.3.6. Inhibition der Enzymaktivität 23

2.3.7. Bestimmung der kinetischen Konstanten 23

2.3.8. Isolierung von RNA 24

2.3.9. Isolierung von Plasmid-DNA 25

2.3.10. Isolierung von genomischer DNA 25

2.3.11. Auftrennung von Nukleinsäuren 26

2.3.12. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen 26

2.3.13. Reinigung von DNA 26

2.4. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN 27
2.4.1. Restriktionsanalyse 27
2.4.2. Ligation 27
2.4.3. DNA-Dephosphorylierung 28
2.4.4. Polymerasekettenreaktion (PCR) 28
2.4.5. Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) 29
2.4.6. 5´-Rapid Amplification of cDNA Ends (5´-RACE) 29
2.4.7. Genome Walking 29
2.4.8. Heterologe Proteinexpression 30
2.4.9. Samenspezifische Überexpression der *BnSCE3* 31
2.4.10. Genotypisierung der T-DNA-Insertionslinien 31
2.4.11. Sequenzierung von DNA und Sequenzanalysen 32
2.5. ANALYTISCHE METHODEN 33
2.5.1. Extraktion der Sinapatester 33
2.5.2. Dünnschichtchromatographie (DC) 33
2.5.3. Flüssigchromatographie (HPLC, UPLC) 34
2.5.4. Gaschromatographie (GC) 35
2.5.5. Massenspektrometrie (GC/MS, LC/MS) 35
2.5.6. Bestimmung des Cholingehaltes in Samen von *Brassica napus* 42
2.5.7. Nahinfrarotspektroskopie (NIRS) 42
2.6. MIKROSKOPIE 43
2.6.1. Stereomikroskop 43
2.6.2. Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM) 43
2.7. STATISTISCHE METHODEN 44
2.8. *BRASSICA NAPUS* UV-B-EXPOSITIONSEXPERIMENT 44
3. ERGEBNISSE 47
3.1. IDENTIFIZIERUNG DER SINAPINESTERASE AUS *BRASSICA NAPUS* 47
3.1.1. Proteinreinigung und Charakterisierung 47
3.1.2. Klonierung der cDNA und Sequenzanalyse 50
3.1.3. Funktionelle Expression in *Nicotiana benthamiana* 52
3.2. BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DER BNSCE3 53
3.2.1. Substratspezifität 53
3.2.2. Kinetische Untersuchungen 56
3.2.3. Inhibitionsversuche 56
3.3. REGULATION DER *BNSCE3*-EXPRESSION 57
3.3.1. Transkriptabundanz während der Keimlingsentwicklung 57
3.4. IDENTIFIZIERUNG *BNSCE3*-HOMOLOGER GENE IN *ARABIDOPSIS THALIANA* 58
3.4.1. Klonierung und heterologe Expression 58
3.4.2. Analyse der Transkriptabundanzen 59
3.4.3. Untersuchung homozygoter T-DNA-Insertionslinien 60
3.5. EXPRESSION DER *BNSCE3* ZUR ABSENKUNG DES SINAPINGEHALTES 62

3.5.1. Überexpression in Samen von *Arabidopsis thaliana* 63
3.5.2. Überexpression in Samen von *Brassica napus* 63
3.6. EINFLUSS DER *BNSCE3*-ÜBEREXPRESSION AUF DIE SAMENQUALITÄT VON *BRASSICA NAPUS* 66
3.6.1. Veränderungen der physiologischen Sameneigenschaften 66
3.6.2. Auswirkungen auf die Samenqualität 67
3.6.3. Elektronenmikroskopische Veränderungen der Samen 67
3.6.4. Einfluss auf die Sekundärmetabolite 68
3.6.5. Veränderung der Primärmetabolite 75
3.6.6. Auswirkungen auf den Lipidgehalt 79
3.6.7. Einfluss auf die Sekundärmetabolite im Keimungsverlauf 82
3.6.8. Einfluss von UV-B-Strahlung auf die Keimung 86

4. DISKUSSION 91

4.1. DIE IDENTIFIZIERUNG DER SINAPINESTERASE AUS *BRASSICA NAPUS* 91
4.2. DIE *BNSCE3* UND IHRE HOMOLOGEN GENE IN *ARABIDOPSIS THALIANA* 92
4.3. DIE CHARAKTERISIERUNG DER BNSCE3 ALS GDSL-ÄHNLICHE LIPASE 94
4.4. ENGINEERING DES SINAPINSTOFFWECHSELS 98
4.5. WEITERFÜHRENDE ARBEITEN 107

5. ZUSAMMENFASSUNG 109

6. LITERATURVERZEICHNIS 111

7. ANHANG 122

Abbildungen

Abbildung 1: Metabolismus der Sinapatester in *Brassicaceae* ... 4
Abbildung 2: Metabolismus des Sinapatesters Sinapin in *B. napus* ... 8
Abbildung 3: Identifizierung homozygoter T-DNA-Insertionslinien mittels PCR ... 32
Abbildung 4: Aufbau des Sonnensimulators ... 45
Abbildung 5: Elutionsprofil der Sinapinesterase (BnSCE) ... 48
Abbildung 6: SDS-PAGE der BnSCE3-Reinigung ... 48
Abbildung 7: Abgeleitete Proteinsequenz der gereinigten BnSCE3 ... 51
Abbildung 8: Aktivitätsnachweis der rekombinanten Sinapinesterase ... 52
Abbildung 9: Dünnschichtchromatographie (DC) der Enzymfraktionen BnSCE1-3 ... 55
Abbildung 10: Inhibition der Enzymaktivität mit PMSF ... 57
Abbildung 11: *BnSCE3*-Transkriptgehalt in Samen und Keimlingen von *B. napus* ... 57
Abbildung 12: Aktivitätsnachweis der putativen GDSL-Lipasen von *A. thaliana* ... 59
Abbildung 13: Transkriptgehalt der putativen GDSL-Lipasen von *A. thaliana* ... 60
Abbildung 14: Übersicht der untersuchten T-DNA-Insertionsmutanten ... 61
Abbildung 15: Prozentualer Verlust des Sinapins während der frühen Keimung ... 62
Abbildung 16: Sinapingehalt in Wildtyp- und transgenen T2-Samen von *A. thaliana* ... 63
Abbildung 17: Sinapin- und Sinapatestergehalt in Samen von *B. napus* ... 64
Abbildung 18: *BnSCE3*-Transkriptgehalt in Wildtyp- und transgenen Samen von *B. napus* ... 65
Abbildung 19: Sinapin- und Sinapatestergehalt in Samen von *B. napus* ... 65
Abbildung 20: NIRS-Analyse der Samenqualitätsparameter ... 67
Abbildung 21: ESEM-Analyse der Samen von *B. napus* ... 68
Abbildung 22: Logarithmische Darstellung des prozentualen Sinapingehaltes in Wildtyp- und transgenen Samen von *B. napus* ... 70
Abbildung 23: HPLC-Elutionsprofil methanolischer Samenextrakte ... 74
Abbildung 24: Komponentenanalyse (ICA) der polaren Samenprimärmetabolite von *B. napus* ... 77
Abbildung 25: Sinapin- und Cholingehalt in Wildtyp- und transgenen Samen von *B. napus* ... 78
Abbildung 26: Gesamtfettsäuregehalt in Wildtyp- und transgenen Samen von *B. napus* ... 79
Abbildung 27: Gesamtlipidgehalt in Wildtyp- und transgenen Samen von *B. napus* ... 80
Abbildung 28: Lipidspezies in Wildtyp- und transgenen Samen von *B. napus* ... 81
Abbildung 29: Morphologie der Keimlinge von *B. napus* im Verlauf von 20 Tagen ... 82
Abbildung 30: Veränderte Massensignale in den Überexpressionssamen von *B. napus* ... 83
Abbildung 31: Metabolitengehalte in Überexpressions- und Wildtypsamen von *B. napus* ... 84
Abbildung 32: Keimlinge von *B. napus* im Verlauf von 16 Tagen ... 85
Abbildung 33: Sinapin-, Sinapoylglucose- und Sinapoylmalatgehalt in Samen und Keimblättern von *B. napus* WT- und Überexpressionspflanzen ... 85
Abbildung 34: Acht Tage alte Keimpflanzen von *B. napus* unter UV-B-Stress ... 87

Abbildung 35: Elf Tage alte Keimpflanzen von *B. napus* unter UV-B-Stress 88
Abbildung 36: Sinapin-, Sinapoylglucose- und Sinapoylmalatgehalt in Samen und Keimblättern von *B. napus* WT- und Überexpressionspflanzen unter UV-B-Stress..... 89
Abbildung 37: Quercetin- und Kaempferolderivatgehalt in Samen und Keimblättern von *B. napus* WT- und Überexpressionspflanzen unter UV-B-Stress..... 90
Abbildung 38: Phenolische Verbindungen zum Test der Substratspezifität 96
Abbildung 39: Übersicht der Veränderungen im Primär- und Sekundärstoffwechsel im Samen von *B. napus* durch die samenspezifische *BnSCE3*-Überexpression..... 104
Abbildung A1: Strukturen der identifizierten Samenkomponenten 128

Tabellen

Tabelle 1: Verwendete Vektoren 14
Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme 14
Tabelle 3: Verwendete Geräte 15
Tabelle 4: SALK-Linien und verwendete Primerkombinatioen 32
Tabelle 5: Reinigungsschema der Sinapinesterase (BnSCE) von *B. napus* 47
Tabelle 6: Gelfiltration zur Bestimmung des nativen Molekulargewichtes der BnSCE 49
Tabelle 7: Substratspezifitäten der BnSCE-Fraktionen 53
Tabelle 8: Kinetische Konstanten K_m und V_{max} ausgewählter BnSCE3-Reaktionen 56
Tabelle 9: Vergleich der Samengröße, des Samengewichtes, der Samenfeuchte und der Hypokotyllänge der Keimlinge von *B. napus* 66
Tabelle 10: Segregationsanalyse transgener Einzelsamen der *BnSCE3*-Überexpressionslinien von *B. napus* 69
Tabelle 11: Analyse der Sekundärmetabolite in Samen von *B. napus* (I) 71
Tabelle 12: Analyse der Sekundärmetabolite in Samen von *B. napus* (II) 72
Tabelle 13: Analyse der polaren Primärmetabolite in Samen von *B. napus* 76
Tabelle A1: Verwendete Oligonukleotide 122
Tabelle A2: Versuchsbedingungen zur Untersuchung von UV-B-Stress 124
Tabelle A3: MS-Daten der annotierten sekundären Samenkomponenten 125
Tabelle A4: Mischung des internen MS-Standards 132

Abkürzungen

AP	alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure(n)
A. thaliana	*Arabidopsis thaliana*
bp	Basenpaare
B. napus	*Brassica napus*
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	copy (*complementary*) DNA
CoA	Coenzym A
cv.	Kultivar
DC	Dünnschichtchromatographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
ESEM	*Environmental Scanning Electron Microscope*
for/fw	*forward*
FPLC	*Fast Protein Liquid Chromatography*
g	Einheit der Erdbeschleunigung
GC	Gaschromatographie
HPLC	*High Performance Liquid Chromatography*
ICA	Unabhängige Komponentenanalyse (*Independent Component Analysis*)
kat	Katal (Enzymmenge, die 1 Mol Substrat pro Sekunde umsetzt)
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani (Bakteriennährmedium)
MES	2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure
mRNA	*messenger* Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
NaAc	Natriumacetat
NIRS	Nahinfrarotspektroskopie
n.d.	nicht detektiert
OD_{600}	Optische Dichte bei 600 nm
ORF	offenes Leseraster (*Open Reading Frame*)

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RACE	*Rapid Amplification of cDNA Ends*
rev	*reverse*
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale RNA
rpm	Umdrehungen pro Minute (*revolutions per minute*)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion
SCPs	Serin-Carboxypeptidasen
SCT	1-*O*-Sinapoyl-*β*-D-Glucose:Cholin-Sinapoyltransferase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SCE	Sinapinesterase
SGT	UDP-Glucose:Sinapinsäure-Glucosyltransferase
Sinapin	*O*-Sinapoylcholin
Sinapoylglucose	1-*O*-Sinapoyl-*β*-D-Glucose
Sinapoylmalat	2-*O*-Sinapoyl-L-Malat
Sinapinsäure (Sinapat)	*trans*-3,5-Dimethoxy-4-Hydroxyzimtsäure
SMT	1-*O*-Sinapoyl-*β*-D-Glucose:L-Malat-Sinapoyltransferase
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Trisgepufferte Kochsalzlösung
TEMED	*N,N,N´,N´*-Tetramethylethylendiamin
T_A	*Annealing* Temperatur
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UPLC	*Ultra Performance Liquid Chromatography*
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
Vol	Volumeneinheit
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-*β*-D-Galactopyranosid

1. Einleitung

1.1. Pflanzlicher Sekundärstoffwechsel

Die im Sekundärstoffwechsel gebildeten chemischen Verbindungen sind definitionsgemäß nicht an primären Stoffwechselprozessen beteiligt. Sie sind nicht essenziell für Wachstum und Entwicklung, oft begrenzt verteilt über die taxonomischen Gruppen und stellen trotzdem eine notwendige funktionelle Ebene des Pflanzenstoffwechsels dar, denn sie tragen zur Plastizität des Stoffwechsels bei und können als Konsequenz der sessilen Lebensweise aufgefasst werden (Hartmann, 2007). Im Gegensatz zu den ubiquitär vorkommenden primären Pflanzenstoffen findet man innerhalb einer bestimmten Spezies oder Pflanzenfamilie oft unterschiedliche sekundäre Pflanzenstoffe. Als Konsequenz ihrer Immobilität entwickelten pflanzliche Organismen dieses spezialisierte metabolische System, um mit einer Vielzahl von synthetisierten Verbindungen auf ihre Umwelt reagieren zu können. Das sichert ihnen die Anpassungsfähigkeit und das Überleben in den unterschiedlichsten ökologischen Nischen (Noel *et al.*, 2005). Diese sekundären pflanzlichen Verbindungen wurden bereits im 19. Jahrhundert entdeckt und vom Pflanzenphysiologen Julius Sachs als Nebenprodukte des Stoffwechsels beschrieben, da sie keine weitere Verwendung für den Grundstoffwechsel finden (Sachs, 1873). Bis heute wurden mehr als 200.000 dieser, später als Sekundärmetabolite bezeichneten, Verbindungen dokumentiert, was die immense Diversität und Bedeutung des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels verdeutlicht (Hartmann, 2004). Pflanzliche Sekundärmetabolite besitzen vielfältige, wichtige ökologische Funktionen. Sie agieren beispielsweise als Abwehrsubstanzen gegen Pathogene (Dixon, 2001), fungieren als Antioxidantien oder UV-Schutz-Pigmente (Hahlbrock und Scheel, 1989), dienen als Lockstoffe für bestäubende oder samenverbreitende Organismen (Dixon und Steele, 1999) und tragen so erheblich zum Überleben der Pflanze bei.

Auch die ökonomische Bedeutung der sekundären Pflanzenstoffe nahm in den letzten Jahren zu, beispielsweise in der Papier- und Textilindustrie (Baucher *et al.*, 2003), in der Medizin (Kutchan, 1995; Scinto *et al.*, 1994) und in der Kosmetikindustrie (Oswald *et al.*, 2007). In der Nahrungsmittelindustrie gewinnen sie an Bedeutung bei der Herstellung von *Nutraceuticals*, medizinisch wirksamen Lebensmitteln (Niggeweg *et al.*, 2004; Zhao, 2007; Knauf und Facciotti, 1995). Somit stehen die sekundären Pflanzenstoffe durch ihr biotechnologisches Potenzial auch zunehmend im Interesse der angewandten Forschung.

Wichtige Sekundärstoffe lassen sich chemisch betrachtet unterschiedlichen Stoffklassen zuordnen: den Phenylpropanoiden, den Terpenoiden und den Alkaloiden (Buchanan *et al.*, 2000). Sie leiten sich von wenigen Biosynthesewegen des Primärstoffwechsels, beispielsweise dem Shikimatweg, der Glycolyse und des Citratzyklus, ab und erreichen durch Modifikationen, wie Oxidationen und Zyklisierungen, eine umfangreiche Diversität. Nachfolgend können die Metabolite glycosidiert, acyliert, prenyliert oder methyliert werden (Vogt, 2010).

1.1.1. Phenylpropanstoffwechsel

Phenylpropanoide definieren sich durch ein aromatisches Grundgerüst und sind im gesamten Pflanzenreich vertreten. Trotz seiner Komplexität ist der Phenylpropanstoffwechsel eines der am besten untersuchten metabolischen Systeme der Pflanzen. Als eine zentrale Verbindung zwischen dem Primär- und Sekundärstoffwechsel gilt die Biosynthese aromatischer Aminosäuren durch den Shikimatweg. Dabei ist die Bereitstellung von Kohlenhydraten aus dem Primärstoffwechsel grundlegend für die Synthese von aromatischen Aminosäuren und vielen Sekundärmetaboliten. Die einleitende Synthese der meisten pflanzlichen Phenole geht von der Desaminierung der aromatischen Aminosäure L-Phenylalanin zur *trans*-Zimtsäure (*trans*-3-Phenylpropensäure) aus, katalysiert durch das Enzym Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) (Herrmann, 1995; Herrmann und Weaver, 1999). Die PAL stellt das Bindeglied zwischen dem Primär- und dem Sekundärstoffwechsel dar und kann als Ausgangspunkt des generellen Phenylpropanstoffwechsels, der in allen Höheren Pflanzen vorkommt, angesehen werden. Durch die Hydroxylierung der *trans*-Zimtsäure entsteht 4-Cumarsäure, die in ihrer aktivierten Form als 4-Cumaroyl-CoA die Biosynthese einer Vielzahl von Phenylpropanoiden und abgeleiteten Metaboliten, wie z. B. Ligninen, Flavonoiden, Cumarinen und Hydroxyzimtsäurekonjugaten ermöglicht (Hahlbrock und Scheel, 1989; Hahlbrock, 1972; Baucher *et al.*, 1998). Damit stellt 4-Cumaroyl-CoA einen wichtigen Verzweigungspunkt für die unterschiedlichen Phenylpropanoidsynthesewege dar (Vogt, 2010). Die resultierenden Verbindungen sind für die Pflanzen von fundamentaler Bedeutung, denn sie fungieren unter anderem als UV-Schutz-, Signal- und Strukturmoleküle (Winkel, 2004).

1.1.2. Sinapinstoffwechsel

Charakteristisch für die Familie der *Brassicaceae* (Kreuzblütler) ist die Akkumulation von drei Hauptkomponenten des Phenylpropanstoffwechsels. Die Verbindungen Sinapoylcholin (Sinapin), Sinapoyl-L-malat (Sinapoylmalat) und deren gemeinsamer Vorläufer

1-*O*-Sinapoyl-*β*-D-Glucose (Sinapoylglucose) sind Komponenten eines gemeinsamen Stoffwechselweges, in den vier Enzyme involviert sind, eine Glucosyltransferase [UDP-Glucose:Sinapinsäure-Glucosyltransferase (SGT)], zwei Acyltransferasen [1-*O*-Sinapoyl-*β*-D-Glucose:Cholin-Sinapoyltransferase (SCT) und 1-*O*-Sinapoyl-*β*-D-Glucose:L-Malat-Sinapoyltransferase (SMT)] sowie eine Sinapinesterase (SCE) (Abbildung 1). Ausgangsprodukt dieses Stoffwechselweges ist der für viele *Brassicaceae* charakteristische metabolische Fluss zu den Hydroxyzimtsäuren mit Sinapinsäure (*trans*-3,5-Dimethoxy-4-Hydroxyzimtsäure) als am stärksten substituierten Vertreter. Sinapinsäure wird während der Samenentwicklung durch die SGT unter Verbrauch von UDP-Glucose zu Sinapoylglucose verestert (Strack, 1980; Nurmann und Strack, 1981; Milkowski *et al.*, 2000a). Während der weiteren Samenentwicklung wird die Sinapoylglucose durch die SCT zu Sinapin umgeestert, welches im embryonalen Gewebe akkumuliert (Strack *et al.*, 1983; Regenbrecht und Strack, 1985; Shirley *et al.*, 2001; Weier *et al.*, 2008). In den zugrunde liegenden Reaktionen wird das hohe Gruppenübertragungspotential von *β*-Acetalestern der Glucose (Mock und Strack, 1993) für den Acyltransfer genutzt. Sinapin ist mit 1-2% der Samentrockenmasse in den meisten *Brassicaceae* der am häufigsten auftretende Sinapatester (Schultz und Gmelin, 1953; Bell, 1993). Während der Keimung wird das im Samen gespeicherte Sinapin durch die SCE zu Sinapinsäure und Cholin hydrolysiert (Tzagoloff, 1963a, b; Strack, 1980; Nurmann und Strack, 1981). Die ersten biochemischen Untersuchungen über den Metabolismus des Sinapins wurden 1963 von dem russischen Botaniker Tzagoloff publiziert. Dieser zeigte, dass das Sinapin während der Keimung von *Brassica hirta*, möglicherweise durch eine spezifische Sinapinesterase-katalysierte Hydrolyse, dem Abbau unterliegt (Tzagoloff, 1963b). Da der Sinapinabbau auch in Senfkeimlingen mit einer Akkumulation eines neuen Sinapinsäurekonjugates einhergeht, vermuteten auch Bopp und Lüdicke (1975), dass dieser durch Hydrolyse erfolgt und die freiwerdende Sinapinsäure einer weiteren Veresterung, also einer Interkonversionsreaktion, unterliegt. Es konnte gezeigt werden, dass die freigesetzte Sinapinsäure über Sinapoylglucose durch die SMT in den Vakuolen der Mesophyll- und Epidermiszellen der Blätter zu Sinapoylmalat umgesetzt wird (Tkotz und Strack, 1980; Strack, 1982; Strack *et al.*, 1985; Sharma und Strack, 1985; Hause *et al.*, 2002). Das bei der Hydrolyse von Sinapin freiwerdende Cholin geht zu etwa 50% in die Phosphatidylcholinsynthese ein (Strack, 1981). Die an der Bildung der Sinapoylglucose und des Sinapoylmalates beteiligten Enzyme konnten erstmals bei *Raphanus sativus* beschrieben werden, denn für die Untersuchung des Sinapinstoffwechsels haben sich die Keimblätter des Radieschens als geeignetes Modellsystem erwiesen (Strack, 1977; Strack *et al.*, 1978;

Linscheid *et al.*, 1980). Nachfolgende Untersuchungen zur Sinapinsäureesterbiosynthese wurden an den *Brassicaceae Arabidopsis thaliana*, *Brassica rapa* und *Brassica napus* durchgeführt.

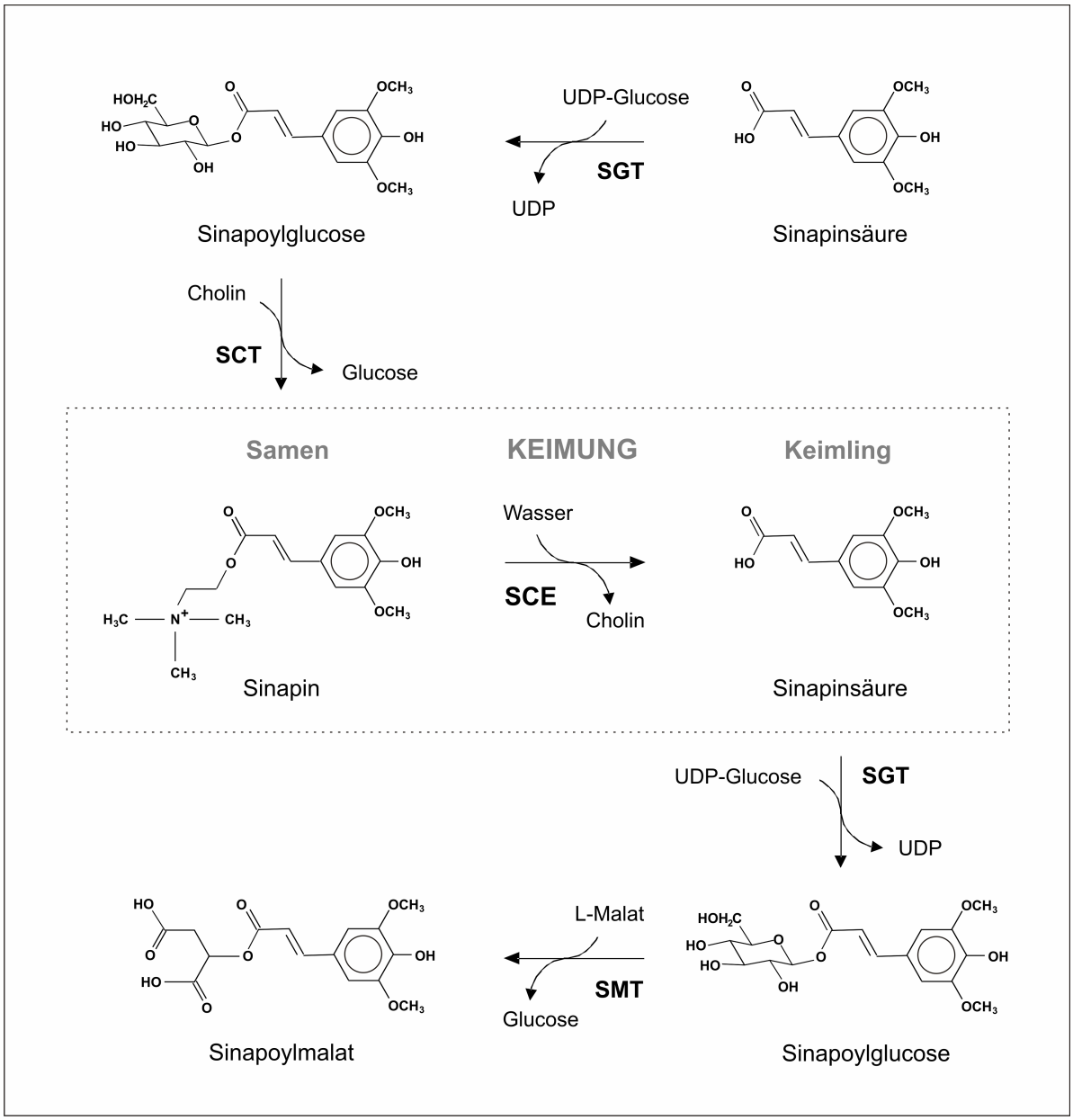


Abbildung 1: Metabolismus der Sinapatester in *Brassicaceae* (Milkowski *et al.*, 2004; modifiziert). SGT: UDP-Glucose:Sinapinsäure-Glucosyltransferase (EC 2.4.1.120), SCT: 1-*O*-Sinapoyl-β-D-Glucose:Cholin-Sinapoyltransferase (EC 2.3.1.91), SCE: Sinapinesterase (EC 3.1.1.49), SMT: 1-*O*-Sinapoyl-β-D-Glucose:L-Malat-Sinapoyltransferase (EC 2.3.1.92).

Dabei kommt der Identifizierung wichtiger Phenylpropanstoffwechselgene aufgrund der Charakterisierung von Mutationen in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* eine besondere Bedeutung bei der Untersuchung des Stoffwechsels zu. Es wurden Mutanten isoliert, die für folgende Umsetzungen defizient sind: Bildung von 5-Hydroxyconiferaldehyd (*ferulic*

acid-5-hydroxylase 1; *fah1*; Chapple *et al.*, 1992), Bildung von Sinapoylglucose (*sinapoylglucose accumulator 1*; *sng1*; Lorenzen *et al.*, 1996, Lehfeldt *et al.*, 2000), Bildung von Sinapin (*sinapoylglucose accumulator 2*; *sng2*; Shirley *et al.*, 2001), Bildung von Sinapinsäure aus Sinapaldehyd (*reduced epidermal fluorescence 1*; *ref1*; Nair *et al.*, 2004), Bildung von 4-Cumarsäure (*reduced epidermal fluorescence 3*; *ref3*; Schilmiller *et al.*, 2009), Einführung der OH-Gruppe in C3-Position des Ringes am Cumaroyl-Shikimat (*reduced epidermal fluorescence 8*; *ref8*; Franke *et al.*, 2002) und Biosynthese von 1-*O*-Sinapoylglucose (*bright trichomes 1*; *brt1*; Sinlapadech *et al.*, 2007) (Milkowski und Strack, 2010).

Während die Funktion des Sinapins für die Samen der *Brassicaceae* noch nicht eindeutig aufgeklärt werden konnte, wird für Sinapoylmalat diskutiert, dass es neben den Flavonoiden dem Schutz vor schädigender UV-B Strahlung dient (Landry *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1993; Sheahan, 1996; Booij-James *et al.*, 2000). Erste Hinweise über die Funktion der einzelnen Sinapinsäureester konnten auch hier mit Hilfe von Mutanten ermittelt werden. Die Aufklärung der UV-Schutzfunktion der Sinapinsäurekonjugate erfolgte mit Hilfe der vergleichenden Analyse der *Arabidopsis*-Mutanten *tt4* (*transparent testa 4*), *tt5* (*transparent testa 5*) und *fah1*. Bei den Mutanten *tt4* und *tt5* liegt ein Defekt im Gen der Chalkon-Synthase (*tt4*) bzw. Chalkon-Isomerase (*tt5*) vor (Landry *et al.*, 1995). Diese Pflanzen sind nicht mehr in der Lage, Flavonoide zu synthetisieren. Im Fall der *tt5*-Mutante führen die reduzierten Gehalte an Sinapoylmalat, zusätzlich zum Verlust an Flavonoiden, zu einer erhöhten Sensitivität der Mutanten gegenüber UV-B Strahlung (Li *et al.*, 1993; Landry *et al.*, 1995). Erstaunlicherweise ist die Chalkon-Synthase Mutante *tt4* resistenter gegenüber UV-B Stress als die *tt5*-Mutante. Der *tt4*-Mutante fehlen auch die Flavonoide, aber sie besitzt im Gegensatz dazu einen um 40% erhöhten Gehalt an Sinapinsäureestern (Dixon und Paiva, 1995). Im Fall der *fah1*-Mutante, welche durch das Fehlen der Ferulasäure-5-Hydroxylase (F5H) keine Sinapatester mehr bilden kann, jedoch über das natürliche Spektrum der Flavonoide verfügt, sind die UV-B Schäden noch gravierender (Chapple *et al.*, 1992; Booij-James *et al.*, 2000). Aus diesen Studien konnte für *Arabidopsis* abgeleitet werden, dass sowohl Sinapinsäurekonjugate in besonderem Maße, als auch Flavonoide für den Schutz der Pflanzen gegenüber schädigender UV-B Strahlung unabdingbar sind. Damit konnte für die Ester des Sinapinstoffwechsels erstmalig eine wichtige biologische Aufgabe identifiziert werden. Für das spezifisch im Samen akkumulierenden Sinapin ist dies noch nicht gelungen. Es wird jedoch vermutet, dass es den Pflanzen als Sinapinsäure- und Cholinspeicher für die nach der Keimung einsetzende Lignin- und Membranlipidbiosynthese dient (Strack, 1981). Auf-

grund der adstringierenden und antinutritiven Eigenschaften der Phenolsäuren und ihrer Ester könnte auch eine fraßhemmende und antifungale Wirkung vermutet werden.

1.2. Die Enzyme des Sinapinstoffwechsels

Wie bereits beschrieben, gehören die in den Sinapinstoffwechselweg involvierten Enzyme SGT, SCT, SMT und SCE unterschiedlichen Enzymklassen an. Es handelt sich dabei um die Klasse der Glucosyltransferasen (SGT), der Acyltransferasen (SCT, SMT) und der Esterasen (SCE) (Abbildung 1).

1.2.1. Glucosyltransferasen

Das an der Bildung der Sinapoylglucose beteiligte Enzym konnte erstmals in *Raphanus sativus* als UDP-Glucose:Sinapinsäure-Glucosyltransferase (SGT) charakterisiert (Strack, 1980; Nurmann und Strack, 1981) und später auch für *Arabidopsis thaliana* (AtSGT) und *Brassica napus* (BnSGT) beschrieben werden (Mock und Strack, 1993; Milkowski *et al.*, 2000a, b; Meißner *et al.*, 2008; Mittasch *et al.*, 2010). Glucosyltransferasen bilden eine Untergruppe der Superfamilie der Glycosyltransferasen, die aktivierte Zuckereinheiten auf Akzeptormoleküle übertragen (Hostel, 1981; Jones und Vogt, 2001). Die am Sinapinstoffwechsel beteiligte Glucosyltransferase SGT überträgt Glucose des Glucosyl-Donors UDP-Glucose auf Sinapinsäure und katalysiert dadurch den ersten Schritt der Sinapinbiosynthese (Milkowski *et al.*, 2000a). Glycosylierungsreaktionen sind im Pflanzen- und Tierreich weit verbreitet (Mackenzie *et al.*, 1997) und tragen wesentlich zu der enormen Diversität des Metabolitenspektrums bei (Lim *et al.*, 2001). Derzeit sind etwa 90[1] Familien der Glycosyltransferasen bekannt. Kennzeichnend für die Familie 1 der Glycosyltransferasen des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels ist ihre Konsensus-Sequenz, die PSPG-Box (*Plant Secondary Product Glycosyltransferase*; Hughes und Hughes, 1994), die an der Erkennung und Bindung des Proteins an den Nukleotiddiphosphat-Zucker beteiligt ist (Mackenzie *et al.*, 1997). Für den Sinapinstoffwechsel sind die Ester-bildenden UDP-Glucosyltransferasen (UGTs) von Bedeutung, da sie 1-*O*-Glucoseester als Acyldonoren für die nachfolgenden Reaktionen zur Verfügung stellen. Das Genom von *Arabidopsis thaliana* kodiert vier Ester-bildende Hydroxyzimtsäure-Glucosyltransferasen (UGT84A1-4, Milkowski *et al.*, 2000b, Lim *et al.*, 2001, Meißner *et al.*, 2008), wobei die UGT84A2 als AtSGT identifiziert wurde. In *Brassica napus* konnte die UGT84A9 als BnSGT1 identifiziert werden (Milkowski *et al.*, 2000a, Mittasch *et al.*, 2010). Die meisten, im Phenylpropanoidstoffwechsel synthetisierten,

[1] http://www.cazy.org/fam/acc_GT.html

Verbindungen können durch Glycosyltransferasen modifiziert werden. Dadurch verändern sich die Löslichkeit, die Reaktivität und die Stabilität der Metabolite (Aksamit-Stachurska *et al.*, 2008).

1.2.2. Acyltransferasen

Die Umwandlung von Sinapoylglucose zu Sinapoylcholin bzw. Sinapoylmalat wird durch die Acyltransferasen 1-*O*-Sinapoyl-*β*-D-Glucose:Cholin-Sinapoyltransferase (SCT) und 1-*O*-Sinapoyl-*β*-D-Glucose:L-Malat-Sinapoyltransferase (SMT) katalysiert. Diese Acyltransferasen nutzen 1-*O*-Glucoseester als Acyldonoren, im Gegensatz zu den weit verbreiteten BAHD-Acyltransferasen, die CoA-Thioester nutzen (D'Auria, 2006). Die Gene, die für die erstgenannten Acyltransferasen kodieren, konnten mit Hilfe von Analysen chemisch mutagenisierter (Ethylmethansulfonat) *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen identifiziert werden. So wiesen beispielsweise einige Mutanten die Akkumulation von Sinapoylglucose anstelle von Sinapoylmalat in den Blättern auf (Lorenzen *et al.*, 1996), was durch eine Mutation im *SNG1*-Gen (*Sinapoylglucose Accumulator 1*) ausgelöst wurde. Es konnte gezeigt werden, dass *SNG1* für die SMT kodiert. Durch die hohe Sequenzidentität zu Serincarboxypeptidasen wurde die identifizierte SMT in die Klasse der SCPL-Proteine (*Serine Carboxypeptidase Like Proteins*) eingeordnet. Die N-terminale Signalsequenz ließ die subzelluläre Lokalisation des Enzyms in der Vakuole vermuten, was durch eine Immunlokalisierung auch bestätigt werden konnte (Hause *et al.*, 2002).

Durch ähnliche Mutanten-Analysen in *Arabidopsis thaliana* konnte, wie im Fall der SMT, auch das kodierende Gen für die SCT identifiziert werden. Diese Mutantenlinien akkumulieren Sinapoylglucose im Samen anstelle von Sinapin. Das entsprechende Gen konnte mit Hilfe von kartengestützter Klonierung (*Map-Based Cloning*) und Kandidaten-Gen-Analyse kloniert werden (Shirley *et al.*, 2001) und erhielt die Bezeichnung *SNG2* (*Sinapoylglucose Accumulator 2*). Auch in *Brassica napus* konnte die SCT-cDNA, ausgehend von einem cDNA-Fragment, welches hohe Sequenzähnlichkeit zu Acyltransferase-Genen aufwies, isoliert werden (Milkowski *et al.*, 2004; Weier *et al.*, 2008). Die SCT trägt wie die SMT ein N-terminales Signalpeptid für vakuoläre Lokalisierung. Phylogenetische Analysen bestätigten die Zugehörigkeit der SCT zur Familie der SCPL-Proteine (Shirley und Chapple, 2003). Die Verwandtschaft der Sinapoyltransferasen mit hydrolytischen Serincarboxypeptidasen hat sie zu bevorzugten Forschungsobjekten zu Fragen der Enzymevolution gemacht (Stehle *et al.*, 2009).

1.2.3. Esterasen

Allgemein repräsentieren Esterasen (EC 3.1.1.x) eine diverse Gruppe innerhalb der Familie der α/β-Hydrolasen (Ollis *et al.*, 1992), welche die Spaltung und Bildung von Carboxylesterverbindungen katalysieren (Vítecek *et al.*, 2007). Sie sind im Organismenreich ubiquitär verbreitet. Bei Pflanzen sind sie beispielsweise in den Abbau einiger Xenobiotika (Sandermann, 1992; Cummins *et al.*, 2001) involviert. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Pflanzenentwicklung und -morphogenese (Willats *et al.*, 2001; Stuhlfelder *et al.*, 2002). Die Mitglieder dieser Enzymfamilie weisen sehr diverse Substratspezifitäten auf. Erste Arbeiten zur Sinapinesterase stammen aus den 60iger Jahren (Tzagoloff, 1963a, b) und beschreiben die Esterase-katalysierte Hydrolyse des Sinapins zu Sinapinsäure und Cholin in *Brassica hirta*-Keimlingen. Nachfolgende Arbeiten charakterisierten die Sinapinesterase aus *Raphanus sativus* in Protein-Rohextrakten erstmals (Strack, 1980; Nurmann und Strack, 1981). Das Enzym zeigte eine hohe Spezifität gegenüber Cholinestern von Hydroxyzimtsäuren. Dabei war die Affinität bezüglich des Cholinesters Sinapin am höchsten. Die aus *Raphanus sativus*-Kotyledonen extrahierte Sinapinesterase-Aktivität war im Samen nicht nachweisbar, stieg jedoch während der Keimung parallel zum Abbau des Sinapins innerhalb von zwei Tagen schnell an (Strack, 1980). Nach vier Tagen (nach Keimungsbeginn) reduzierte sich die Enzymaktivität auf 20% der Maximalaktivität. Ein ähnliches Profil konnte für junge *Brassica napus*-Keimpflanzen gezeigt werden (Milkowski *et al.*, 2004). Bis zum zweiten Tag der Keimlingsentwicklung stieg die BnSCE-Aktivität drastisch an und fiel bis zum achten Tag der Entwicklung ebenfalls auf 20% der Maximalaktivität zurück. Die Abbildung 2 zeigt diesen Aktivitätsverlauf und verdeutlicht gleichzeitig die zentrale Rolle der Sinapinesterase beim Übergang des Sinapinstoffwechsels der *Brassica napus*-Samen zu dem der jungen Keimpflanzen (Abbildung 1).

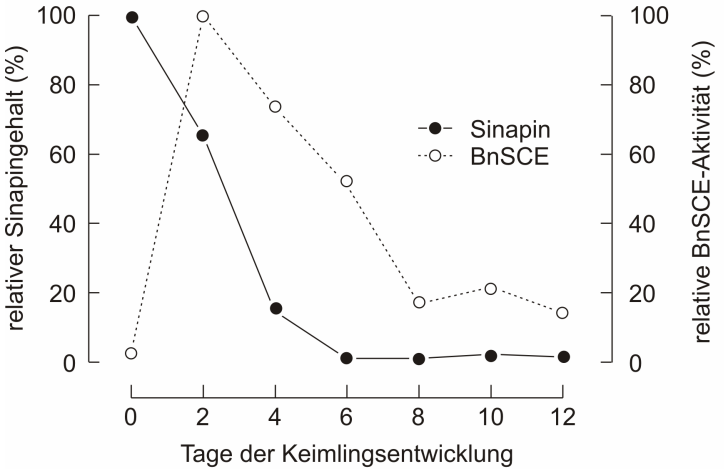


Abbildung 2: Metabolismus des Sinapatesters Sinapin in Samen und Keimlingen von *Brassica napus,* katalysiert durch die Sinapinesterase BnSCE (Milkowski *et al.*, 2004; modifiziert). Gezeigt sind die Enzymaktivität der BnSCE (100% = 511 pkat mg^{-1} Protein) und die Menge an Sinapin (100% = ca. 135 nmol $Individuum^{-1}$). BnSCE: *Brassica napus* Sinapinesterase (EC 3.1.1.49).

Durch die Forschung am Sinapinstoffwechsel und der involvierten Enzyme rückte auch die Sinapinesterase wieder ins Blickfeld der Untersuchungen. Im Jahre 2005 gab es eine erste Vermutung über die genetische Identität der Sinapinesterase in *Arabidopsis thaliana*. Da mit den Acyltransferasen SMT und SCT bereits zwei Enzyme des Sinapinstoffwechsels als SCPL-Proteine identifiziert werden konnten, lag die Vermutung nahe, dass die hydrolytische SCE ebenfalls zu dieser Proteinklasse zählt. Im Rahmen einer systematischen Expressionsanalyse der 51 Gene, die in *Arabidopsis* für SCPL-Proteine kodieren, zeigte nur ein Gen (SCPL 44, *At1g43780*) eine ausschließlich keimlingsspezifische Expression und wurde als viel versprechender Kandidat für die SCE vorgeschlagen (Fraser *et al.*, 2005).

1.3. *Brassica napus* als wirtschaftlich bedeutende Nutzpflanze

Raps (*Brassica napus*) ist eine seit etwa 2.000 Jahren durch den Menschen genutzte Kulturpflanze. Die ursprünglich aus Asien und dem Mittelmeerraum stammende Pflanze, mit einem Ölgehalt im Samen von 40%, war bereits bei den Römern bekannt. Sie gehört zur Familie der Kreuzblütengewächse (*Brassicaceae*). In den letzten 20 Jahren haben sich die Nutzung von Ölpflanzen und die damit einhergehende Produktion von pflanzlichen Ölen weltweit stark erhöht. Der Anteil an Rapsöl nahm dabei stärker als bei anderen Ölsorten zu. Heute stellt Raps, neben Soja, im europäischen Raum die wichtigste und weltweit die zweitwichtigste Ölsaat dar (FAO[2], 2006; Oil World[3], 2006). Lange Zeit diente Rapsöl hauptsächlich als Brennstoff für Öllampen. Nur die arme Bevölkerung nutzte das Öl auch für Speisezwecke. Der bittere Geschmack (Blair und Reichert, 1984) und die hohen Gehalte an gesundheitsschädlicher Erucasäure (James, 1994) waren entscheidend qualitätsmindernd. Durch die Züchtung erucasäurefreier und glucosinolatarmer Sorten (00-Linien) wurde die Rapspflanze in den letzten Jahren aufgrund ihres Öls und der ölbasierten Produkte weltbekannt. Das gewonnene Rapsöl ist durch den hohen Gehalt an ungesättigten Fettsäuren eines der gesündesten Pflanzenöle und wird auch zunehmend in anderen Industriezweigen eingesetzt. Dadurch ist die Verwendung von Rapsölen als nachwachsender Rohstoff zum Ersatz der begrenzten Ressourcen an fossiler Energie von wachsendem Interesse (Yuan *et al.*, 2008). Die Nachfrage nach Kraftstoffen aus nachwachsenden Rohstoffen hat vor allem in Deutschland zu einem kräftigen Produktionsschub geführt. Während in den USA Sojaöl als Rohstoff zur Biodieselherstellung dient, wird in Europa hauptsächlich Rapsöl verwendet. Deutschland ist dadurch der größte Rapsproduzent in der Europäi-

[2] http://faostat.fao.org/
[3] http://www.oilworld.com

schen Union und verfügt über die größten Verarbeitungs- bzw. Biodieselproduktionsstätten (VDB - Verband der Deutschen Biokraftstoffindustrie e.V.[4]).

Der Embryo der Rapssamen, als Reproduktionseinheit der Pflanze, ist angefüllt mit hochwertigen Reservestoffen. Als hauptsächliche Speicherstoffe dienen Öle (Triacylglyceride) und Proteine (Shewry *et al.*, 1995; Muentz, 1989; Bewley und Black, 1994). Die ernährungsphysiologischen Eigenschaften der Samenproteine, wie der hohe Gehalt an essenziellen Aminosäuren, das geringe Molekulargewicht und die damit einhergehende geringe Antigenität machen den Rapssamen ökologisch und ökonomisch interessant (Maenz *et al.*, 2003; Drew, 2004). Leider ist die Verwendung des nach der Ölgewinnung verbleibenden Rapsschrots bzw. Rapsmehls als wertvolles, proteinreiches Futtermittel eingeschränkt. Es kann nur in begrenztem Maße in der Tierernährung eingesetzt werden. Der Einsatz der Rapsproteine ist durch den hohen Anteil an antinutritiven phenolischen Komponenten (Sinapinsäureester) und Pflanzenfasern stark limitiert (Bell, 1993; Griffiths *et al.*, 1998; Bhinu *et al.*, 2009; Bouchereau *et al.*, 1991). Die phenolische Hauptkomponente des Samens ist das Sinapin, das während der Samenentwicklung in großen Mengen akkumuliert und dessen Gehalt im Rapsmehl bei 1 bis 2% liegt (Schultz und Gmelin, 1953; Bell, 1993). Auch Abbauprodukte des Sinapins stellten in der Vergangenheit ein Problem dar. So akkumulierten bestimmte Legehennen-Rassen, die braunschalige Eier produzieren, nach der Fütterung mit Rapsmehl aufgrund eines Gendefektes das Abbauprodukt Trimethylamin im Dotter. Diese Verbindung verursachte einen fischigen Geruch des Eiinhalts (Pearson *et al.*, 1980; Fenwick, 1982; Bell, 1993).

Da die biologische Wertigkeit der Rapsproteine der von anderen qualitativ hochwertigen Proteinquellen wie Rinderfleisch und Milch gleicht und besser ist im Vergleich zu Soja und anderen Pflanzenproteinen (Slominski *et al.*, 1999), wäre es von großem Interesse, die Rapsproteine in der Tier- und menschlichen Ernährung uneingeschränkt nutzen zu können. Dazu ist die Reduktion der phenolischen Hauptkomponente des Samens - Sinapin - eine wichtige Voraussetzung. Die umfassende Erforschung des Sinapinstoffwechsels und der beteiligten Enzyme, wie der Sinapinesterase im Zuge dieser Arbeit, kann den Einsatz biotechnologischer Methoden zur Reduktion des Sinapingehaltes ermöglichen.

[4] http://www.biokraftstoffverband.de/de/biodiesel/marktdaten.html

1.4. Zielsetzung der Arbeit

In den Samen verschiedener Vertreter der *Brassicaceae* akkumulieren Hydroxyzimtsäureverbindungen. Die im Sinapat-Metabolismus synthetisierte Verbindung Sinapin (Sinapoylcholin) stellt die phenolische Hauptkomponente im Samen dar. Ausgenommen von der Sinapinesterase lagen zu allen an diesem Stoffwechselweg beteiligten Enzymen umfangreiche biochemische und molekulare Daten vor. Die Esterase vermittelt als Schlüsselenzym den Übergang des Sinapat-Metabolismus vom Samen zur Keimpflanze, während sie das Sinapin zu Sinapinsäure und Cholin hydrolysiert. Das primäre Ziel dieser Arbeit war deshalb die erstmalige Identifizierung und Charakterisierung der Sinapinesterase aus *Brassica napus* (BnSCE).

Zu Beginn standen die Aufreinigung der Sinapinesterase aus keimenden *Brassica napus*-Samen mittels klassischer säulenchromatographischer Verfahren und die anschließende Mikrosequenzierung des Proteins im Mittelpunkt der Arbeiten. Basierend auf den identifizierten Peptidsequenzen sollte durch einen reversen Klonierungsansatz die kodierende Sequenz der Sinapinesterase identifiziert werden, was die molekulare und biochemische Charakterisierung des Enzyms ermöglicht. Für ein besseres Verständnis der katalytischen Spezifität wurden substratkinetische Untersuchungen mit dem gereinigten Enzym durchgeführt.

Um die wirtschaftliche Verwertbarkeit von Rapsschrotprodukten zu verbessern, ist die Aufklärung des Sinapinstoffwechsels und die dadurch ermöglichte Reduktion des Sinapingehaltes ein wichtiger Aspekt für die wissenschaftliche Arbeit. In diesem Zusammenhang sollte überprüft werden, inwieweit die identifizierte Sinapinesterase dafür einen geeigneten Ansatzpunkt darstellen könnte. Durch die gezielte samenspezifische Überexpression der Sinapinesterase wurde der natürliche keimungsinduzierte Abbau von Sinapin in das Stadium der Samenreifung vorverlegt, was in einer Absenkung des Sinapingehaltes im reifen Samen resultierte. Damit wurde eine neue Strategie zur Absenkung antinutritiver Substanzen entwickelt. Auswirkungen der gentechnischen Veränderung auf andere Metabolite des Primär- bzw. Sekundärstoffwechsels sollten in einem umfangreichen *Metabolite Profiling* geklärt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemische und molekularbiologische Reagenzien

Sofern nicht anders beschrieben, wurden alle in dieser Arbeit verwendeten chemischen und molekularbiologischen Reagenzien von den Firmen Fermentas GmbH (St. Leon-Rot), Merck Eurolab GmbH (Darmstadt), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), Biozym Diagnostik GmbH (Oldendorf), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München), Applied Biosystems PE Deutschland GmbH (Weiterstadt), Promega GmbH (Mannheim), Invitrogen (Karlsruhe) und QIAGEN GmbH (Hilden) bezogen. Lösungen und Medien wurden nach Standardprotokollen von Sambrook *et al.*, 1989) mit doppelt entsalztem Wasser, welches durch die Milli-Q-Anlage (Millipore, Schwalbach) gefiltert wurde, angesetzt und anschließend bei Bedarf autoklaviert.

2.1.2. Pflanzenmaterial

Arabidopsis thaliana

Als pflanzlicher Modellorganismus diente *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., Ökotyp Columbia. Die Promotor-GUS-Analysen, die Überexpression der *BnSCE* sowie die T-DNA-Insertionen der homologen putativen Arabidopsis-Lipasen erfolgten in diesem pflanzlichen Hintergrund. Die *Arabidopsis thaliana* T-DNA-Insertionsmutanten wurden vom European Arabidopsis Stock Centre (NASC, Nottingham, England) bezogen.

Brassica napus

Das native BnSCE-Protein wurde aus zwei Tage alten Keimlingen der Winterrapssorte *Brassica napus* L. cv. Express isoliert. Das Saatgut wurde freundlicherweise von der Norddeutschen Pflanzenzucht Hans-George Lembke KG (NPZ Lembke, Hohenlieth) zur Verfügung gestellt. Die samenspezifische Überexpression des Proteins erfolgte in der Sommerrapssorte *Brassica napus* L. var. napus cv. Lisora in Kooperation mit der Saaten-Union BIOTEC GmbH (Leopoldshöhe).

Nicotiana benthamiana

Die transiente Expression der *BnSCE3* und der vier homologen putativen Lipasen aus *Arabidopsis thaliana* erfolgte in *Nicotiana benthamiana*. Das Saatgut wurde vom Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie (Halle Saale) zur Verfügung gestellt.

2.1.3. Plasmide

Tabelle 1: Verwendete Vektoren.

T/A-Klonierungsarbeiten von PCR-Produkten	
pGEM®-T Easy	Plasmid trägt Ampicillin-Resistenz, genutzt zur T/A-Klonierung von PCR-Produkten, erlaubt α-Komplementation **(Promega, Mannheim)**
Subklonierung von Expressionskonstrukten	
pImpact1.1 und 1.1-tag	Plasmide tragen Ampicillin-Resistenz, verwendet für die Subklonierung von Expressionskonstrukten für die heterologe Proteinexpression in Pflanzengeweben mit oder ohne 6xHIS-tag, enthalten lichtregulierten RbcS1-Promotor **(Plant Research International, Wageningen, NL)**
pBNN	Plasmid trägt Ampicillin-Resistenz, verwendet für die Subklonierung von Expressionskonstrukten für die samenspezifische Proteinüberexpression in Pflanzen **(AG Prof. E. Heinz, Uni Hamburg)**
Binäre Vektoren für die heterologe rekombinante Proteinexpression in Pflanzengeweben	
pBINPLUS	Plasmid trägt Kanamycin-Resistenz Integration der Expressionskassette aus pImpact1.1 bzw. 1.1-tag verwendet als binärer Vektor für die Pflanzentransformation **(Plant Research International, Wageningen, NL)**
pLH7000	Plasmid trägt Spectinomycin-Resistenz für die bakterielle Selektion und das *bar*-Gen für die Selektion transgener Pflanzen mit Herbizid Basta® Integration der Expressionskassette aus pBNN verwendet als binärer Vektor für die Pflanzentransformation **(Hausmann und Töpfer, 1999)**

2.1.4. Mikroorganismen

Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme.

***Escherichia coli* - Allgemeine Klonierungsarbeiten**	
XL1 Blue	*rec*A1 *end*A1 *gyr*A96 *thi*-1 *hsd*R17 *sup*E44 *rel*A1 *lac*[F'*proABlacIq*^{Z}ΔM15 Tn*10* (Tetr^{r})] **(Stratagene)**
TOP10	*rec*A1 *end*A1 F^{-}*mcr*A Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) ϕ80*lac*ZΔM15Δ*lac*X74 *ara*D139 Δ(*ara-leu*)7697 *gal*U *gal*K *rps*L (Str^{r})*nup*G **(Invitrogen)**

***Agrobacterium tumefaciens* - Pflanzentransformation**	
EHA105	pEHA105 (pTiBo542ΔT-DNA) in C58C1; Rif^r **(Hood *et al.*, 1993)**
C58C1/pMP90	pMP90 (pTiBo542ΔT-DNA) in C58C1; Rif^r, Gent^r **(Koncz und Schell, 1986)**
GV2260	pGV2260 (pTiB6S3ΔT-DNA) in C58C1; Rif^r, Carb^r **(McBride und Summerfelt, 1990)**
GV3101/pMP90, pSOUP	pMP90 (pTiBo542ΔT-DNA) und pSOUP in C58C1; Rif^r, Gent^r, Tet^r **(Koncz und Schell, 1986; Hellens *et al.*, 2000)**

2.1.5. Oligonukleotide

Alle benötigten Oligonukleotide wurden von MWG Biotech (Ebersberg) bezogen. Die Tabelle A1 fasst die Nukleotidsequenzen der verwendeten Oligonukleotide zusammen.

2.1.6. Geräte

Tabelle 3: Verwendete Geräte.

verwendete Geräte	
Zentrifugen	5417R-Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg) Sorvall Super T21 (DuPont, Bad Homburg) 810R-Tischzentrifuge (Eppendorf)
Thermocycler	Eppendorf MasterCycler Gradient (Eppendorf)
Thermomixer	Eppendorf comfort (Eppendorf)
Geldokumentation	BioDocAnalyze (Whatmann Biometra, Göttingen)
Elektrophoresen	Mini-PROTEAN II (BioRAD, München) XCell SureLock® Mini-Cell (Invitrogen, Karlsruhe)
Spektrophotometer	Beckman DU 640
Bead Beater	Biospec. Products, Bartelsville, OK, USA
LC-Geräte	HPLC (Waters™ Millipore System, Waters, Eschborn) UPLC (Waters™ Millipore System, Waters, Eschborn)
FPLC-Gerät	ÄKTA explorer (GE Healthcare Life Sciences, München)
pH-Meter	inoLab pH Level 1 (WTW)
Stromversorgungsgerät	Power Supply EPS 301 (GE Healthcare Life Sciences, München)
Ultraschallgerät	UW 2070 (Bandelin, Berlin)
Ultraturrax	Janke & Kunkel GmbH & Co. KG-IKA-Labortechnik
Elektroporator	MicropulserTM (BioRad, München)

Klimaschrank	Percival (CLF, Emmersacker)
Vakuumzentrifuge	Concentrator 5301 (Eppendorf)

2.2. Kultivierung, Transformation und Selektion der Organismen

Escherichia coli

Die Anzucht von *Escherichia coli* erfolgte in LB-Füssig-Medien unter Schütteln (180-200 rpm) oder auf LB-Agar-Platten bei 37°C. Die Selektion auf resistenzvermittelnde Plasmide erfolgte durch Zugabe des Antibiotikums entsprechend des jeweiligen Genotyps (Tabelle 2) mit folgenden Endkonzentrationen: Carbenicillin (100 µg ml^{-1}), Spectinomycin (100 µg ml^{-1}), Kanamycin (50 µg ml^{-1}), Chloramphenicol (50 µg ml^{-1}) und Tetracyclin (12,5 µg ml^{-1}). Die Transformation mit Plasmiden erfolgte mittels der Hitzeschock-Methode (Sambrook *et al.*, 1989). Die Herstellung der kompetenten Zellen und die Transformation wurden ebenfalls nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Für die Selektion wurden 50 und 100 µl der Bakteriensuspension auf LB-Selektionsplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Agrobacterium tumefaciens

Die Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens* erfolgte bei 28°C in LB-Medium. Die Herstellung elektrokompetenter Zellen und die Transformation wurden nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Für die Selektion wurden 20 bzw. 50 µl auf LB-Platten mit dem Antibiotikum entsprechend des jeweiligen Genotyps (Tabelle 2) ausgestrichen und für 2 bis 3 Tage bei 28°C inkubiert.

Arabidopsis thaliana

Die Anzucht von *Arabidopsis thaliana* erfolgte im Klimaschrank bei 24°C, 70% relativer Luftfeuchte und einer Lichtstärke von ca. 130 µmol m^{-2} s^{-1} unter Langtagbedingungen (16h Licht und 8h Dunkelheit). Die Samen wurden auf Erde (GS 90, (Patzer)/Vermiculit (2-3 mm Körnung) Gemisch) aufgelegt. Nach ca. 2 Wochen konnten die Pflanzen in einzelne Töpfe pikiert werden. Die Transformation der Pflanzen erfolgte durch den mit dem entsprechenden Plasmid transformierten *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm EHA105 (Hood *et al.*, 1993) nach der Blütentauchmethode (*Floral Dip*; Clough und Bent, 1998). Dafür wurden zunächst 400 ml LB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) mit den entsprechenden Antibiotika versetzt und mit einer Übernachtkultur auf eine OD_{600} von 0,1 angeimpft. Die Zellen wurden bei 28°C bis zu einer OD_{600} von ungefähr 0,8 kultiviert. Anschließend wurden die Agrobakte-

rien abzentrifugiert (4000 x *g*, 10 min, RT) und das Bakterienpellet in 200 ml 5% (w/v) Saccharose-Lösung mit 0,05% (w/v) Silwet L-77 aufgenommen. In dieser Suspension wurden die Blütenstände mit gut entwickelten Knospen für 2 min inkubiert. Die behandelten Pflanzen wurden anschließend unter Langtagbedingungen im Klimaschrank bis zur Samenreife kultiviert. Für die Selektion transgener Pflanzen mit dem ***bar*-Gen** als Resistenzmarker wurden die Samen auf Erde ausgesät und die Keimlinge ca. 1 Woche nach Aussaat mit der Basta-Lösung besprüht. Diese Behandlung wurde im Abstand von ca. drei Tagen wiederholt, bis eine ausreichende Selektion der transgenen Pflanzen erkennbar war. Die Selektion transgener Pflanzen mit dem ***nptII*-Gen**, welches Kanamycin-Resistenz vermittelt, erfolgte durch Aussaat auf modifiziertem MS-Medium mit 50 µg ml^{-1} Carbenicillin und 25 µg ml^{-1} Kanamycin. Zur Sterilisation wurden die Samen für 2 min in 70% (v/v) Ethanol und 10 min in Bleichlösung inkubiert und anschließend mehrmals mit sterilem Wasser gewaschen. Die Samen wurden zum Quellen über Nacht in Wasser bei 4°C inkubiert und dann auf dem oben beschriebenen Medium ausgelegt. Nach ca. zwei Wochen konnten die transgenen Pflanzen auf Erde überführt werden.

modifiziertes MS-Medium (1 l)
0,5 g MES (pH 5,7), 4,4 g MS (Duchefa, Harlem, NL), 10 g Saccharose, 8 g Agar

Basta-Lösung
1:5000 Verdünnung der Stammlösung (200 mg ml^{-1} Phosphinothricin; Hoechst Schering AgrEvo GmbH)

Bleichlösung
12% Natriumhypochloridlösung, 0,15% (v/v) Tween®20

Brassica napus

Für die Reinigung der Sinapinesterase (SCE) wurde die Winterrapssorte *Brassica napus* L. cv. Express auf feuchtem Filterpapier ausgelegt und für zwei Tage im Gewächshaus bei 12-18°C, 70% relativer Luftfeuchte und 16 h Licht angezogen. Die verwendeten transgenen Rapssamen (Sommerrapssorte *Brassica napus* L. var. napus cv. Lisora) gingen aus einer Agrobacterium-vermittelten Transformation hervor, welche durch die Saaten-Union BIOTEC GmbH in Leopoldshöhe nach einem modifizierten Protokoll von De Block *et al.* (1989) durchgeführt wurde. Die Pflanzen wuchsen im Gewächshaus bei 12-18°C, 70% relativer Luftfeuchte und 16 h Licht auf einem Erde (GS 90, Patzer)/Vermiculit (2-3 mm Körnung)-Gemisch. Nach ca. zwei Wochen konnten die Pflanzen in einzelne Töpfe pikiert werden. Für die Selektion der transgenen Pflanzen mit dem *bar*-Gen als Resistenzmarker wurden die Samen auf Erde ausgesät und die Keimlinge ca. eine Woche nach Aussaat mit der Bas-

ta-Lösung besprüht. Diese Behandlung wurde im Abstand von ca. drei Tagen wiederholt, bis eine ausreichende Selektion der transgenen Pflanzen erkennbar war.

Basta-Lösung
1:5000 Verdünnung der Stammlösung (200 mg ml^{-1} Phosphinothricin; Hoechst Schering AgrEvo GmbH)

Nicotiana benthamiana

Nicotiana benthamiana wurde im Gewächshaus bei 23-25°C, 70% relativer Luftfeuchte und 16 h Licht angezogen. Die Samen wurden auf einem Erde (GS 90, Patzer)/Vermiculit (2-3 mm Körnung)-Gemisch ausgelegt. Nach ca. zwei Wochen konnten die Pflanzen in einzelne Töpfe pikiert werden. Nach ca. zehn Wochen erfolgte die Agrobacterium-vermittelte transiente Transformation der adulten Blätter mit plasmidhaltigen Zellen des Stammes GV2260 (McBride und Summerfelt, 1990) nach einem modifizierten Protokoll von Kapila *et al.* (1997). Dafür wurden 5 ml YEB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika versetzt (Tabelle 1, 2), mit einer Agrobacterium-Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 28°C unter Schütteln (180 rpm) inkubiert. Nachfolgend wurden 20 µM Acetosyringon, 10 mM Glucose und 10 mM MES (pH 5,6) zugegeben und die Kultur für weitere 24 h inkubiert. Für die Infiltration wurde die Kultur (OD_{600}~3) mit 2-fach Infiltrationsmedium und Wasser auf eine OD_{600} von 1 verdünnt. Nach der Zugabe von 200 µl Acetosyringon erfolgte die Infiltration auf der Blattunterseite durch die Spaltöffnungen mit Hilfe einer 1 ml Plastikspritze. Die infiltrierten Pflanzen wurden für einige Stunden dunkel gestellt, die infizierten Blattbereiche markiert und anschließend für drei weitere Tage unter Gewächshausbedingen inkubiert. Die transient transformierten Blattbereiche wurden nach der Inkubationszeit für weitere Analysen ausgeschnitten.

YEB-Medium
20% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) Fleischextrakt, 0,5% (w/v) Pepton, 0,5% (w/v) Saccharose, 2 mM $MgSO_4$, pH 7,0

2-fach Infiltrationsmedium
10% (w/v) Saccharose, 20 mM Glucose, 8,6 g l^{-1} MS (pH 5,6)

2.3. Biochemische Methoden

2.3.1. Proteinextraktion

Brassica napus

Das native BnSCE-Protein wurde aus zwei Tage alten Keimlingen der Winterrapssorte *Brassica napus* L. cv. Express in acht Schritten bis zur Homogenität aufgereinigt unter Verwendung einer ÄKTAexplorer FPLC-Anlage bei 4°C (Amersham Biosciences, Freiburg)

und chromatographischer Säulen von GE Healthcare Life Sciences. Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte wie in 2.3.3. beschrieben.

- Reinigungsschritt 1: Aufschluss von 3 kg Keimlingen in flüssigem Stickstoff
- Homogenisieren des gemörserten Materials in Puffer A mit dem Ultraturrax
- Zentrifugation des Proteinrohextraktes (28.000 x *g*, 10 min, 4°C)
- Zugabe von Protaminsulfat (1%ige Lösung (w/v), Endkonzentration von 0,05% (w/v) Protaminsulfat) zur Entfernung von Nukleinsäuren, 15 min rühren (Eisbad) und anschließende Zentrifugation (28.000 x *g*, 10 min, 4°C).
- Fällen des Proteins mit 80% Ammoniumsulfat (Sättigungskonzentration), 30 min rühren (Eisbad) und pelletieren (28.000 x *g*, 15 min, 4°C)
- Proteinpellet in Puffer C resuspendieren
- Reinigungsschritt 2: Elution des gebundenen Proteins mit einer Phenylsepharose FF 50/20 Säule (equilibriert mit Puffer C) mittels 300 ml-Gradient von 0 bis 70% Puffer B in C und 400 ml 70% Puffer B in C (Flußrate: 5 ml min^{-1})
- Test der Enzymaktivität der gesammelten Fraktionen (10 ml) mit Sinapin
- Fällung der vereinigten enzymatisch aktiven Fraktionen mit 80% Ammoniumsulfat, resuspendieren des durch Zentrifugation (28.000 x *g*, 15 min, 4°C) gewonnenen Proteinpellets in Puffer B
- Entsalzung der Proteinlösung unter Verwendung einer Sephadex G-25 Säule
- Reinigungsschritt 3: Elution des gebundenen Proteins mit Q-Sepharose FF 50/20 Säule (equilibriert mit Puffer B) mittels 200 ml-Gradienten von 0 bis 15% Puffer D in B, gefolgt von 1600 ml bis 35% Puffer D in B und 200 ml 100% Puffer D (Flußrate: 8 ml min^{1})
- Detektion der SCE-Aktivität in drei Fraktionen (BnSCE1 zwischen 500 und 700 ml, BnSCE2 zwischen 800 und 950 ml, BnSCE3 zwischen 1200 und 1320 ml), separate Vereinigung und Fällung mit 80% Ammoniumsulfat
- Reinigungsschritt 4 (BnSCE3): Elution des gebundenen Proteins mit Sephadex G-75 50/60 Säule (equilibriert mit Puffer B) mittels Puffer B (Flußrate: 5 ml min^{-1})
- Detektion der Esteraseaktivität zwischen 350 und 450 ml

- Vereinigung der enzymatisch aktiven Fraktionen und Aufkonzentrierung durch Ultrazentrifugation mittels Centriprep YM-10-Säulen (Millipore)
- Reinigungsschritt 5 (BnSCE3): Elution des gebundenen Proteins mit HiLoad 16/10 Q-Sepharose HP Anionenaustauschsäule (equilibriert mit Puffer B) mittels 100 ml-Gradienten von 0 bis 20% Puffer D in B, gefolgt von einem 250ml-Gradienten von 20 bis 40% Puffer D in B (Flußrate: 3 ml min^{-1})
- Vereinigung der enzymatisch aktiven Fraktionen (zwischen 175 und 230 ml) und Aufkonzentrierung durch Ultrazentrifugation mittels Centriprep YM-10-Säulen (Millipore)
- Reinigungsschritt 6 (BnSCE3): Elution des gebundenen Proteins mit Phenylsepharose HR 5/5 Säule (equilibriert mit Puffer C) mittels linearen 60 ml-Gradienten von Puffer C bis 100% Puffer B (Flußrate: 0,5 ml min^{-1})
- Vereinigung der enzymatisch aktiven Fraktionen und Aufkonzentrierung durch Ultrazentrifugation mittels Centriprep YM-10-Säulen (Millipore)
- Reinigungsschritt 7 (BnSCE3): HiLoad 16/60 Superdex G-75 Säule (equilibriert mit Puffer B)
- Vereinigung der enzymatisch aktiven Fraktionen und Aufkonzentrierung durch Ultrazentrifugation mittels Centriprep YM-10-Säulen (Millipore)
- Reinigungsschritt 8 (BnSCE3): Elution des gebundenen Proteins mit Mono-Q HR 5/5 Säule (equilibriert mit Puffer B) mittels 60 ml-Gradienten von 0 bis 30% Puffer D in B (Flußrate: 1 ml min^{-1})
- Vereinigung und Aufkonzentrierung der enzymatisch aktiven Fraktionen
- Austausch des Puffers durch 0,01 M Ammoniumsulfat
- Lyophilisation des gereinigten Proteins (100 µg Aliquots)

Puffer A
0,1 M Tris-HCL, pH 7,5, 10% Glycerol, 0,5 mM EDTA, 2 mM 2-Mercaptoethanol

Puffer B
0,02 M Tris-HCL, pH 7,5, 10% Glycerol, 0,5 mM EDTA, 2 mM 2-Mercaptoethanol

Puffer C
0,02 M Tris-HCL, pH 7,5, 1 M $(NH_4)_2SO_4$, 10% Glycerol, 0,5 mM EDTA, 2 mM 2-Mercaptoethanol

Puffer D
0,02 M Tris-HCL, pH 7,5, 1 M NaCl, 10% Glycerol, 0,5 mM EDTA, 2 mM 2-Mercaptoethanol

Nicotiana benthamiana

Die transiente Expression der *BnSCE3* und der vier homologen putativen Lipasen aus *Arabidopsis thaliana* erfolgten in *Nicotiana benthamiana*. Die Proteinextraktion erfolgte durch Aufschluss des Gewebes in 100 mM Tricinpuffer (pH 8,5) mit Hilfe eines Glashomogenisators (VWR International, Wien). Der Überstand der zentrifugierten (3000 x *g*, 5 min, 4°C) Proteinextrakte wurde direkt für nachfolgende Analysen eingesetzt oder über eine PD-10 Säule (GE Healthcare Life Sciences) nach Herstellerangaben entsalzt.

2.3.2. Aufkonzentrierung von Proteinlösungen

Die Aufkonzentrierung von Proteinlösungen erfolgte durch Ultrazentrifugation mittels Centriprep YM-10-Säulen (Millipore) nach den Angaben des Herstellers.

2.3.3. Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentration der Proteinlösung wurde nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt. Hierfür wurde die zu bestimmende Lösung mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Die Extinktion wurde bei 595 nm im Spektralphotometer gemessen. Die Proteinkonzentration konnte mit Hilfe einer Eichkurve für Rinderserumalbumin (BSA) ermittelt werden.

Bradford-Reagenz

0,065% (w/v) Coomassie G-250 in 5% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Phosphorsäure

2.3.4. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE (Laemmli, 1970) wurden entsprechend des Molekulargewichtes der zu analysierenden Proteine Trenngele mit 11- oder 14% Acrylamid verwendet. Die Proteinproben wurden vor dem Beladen mit Proteinprobenpuffer im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 25 mA für ca. 60 min durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele in Coomassie-Lösung durch Kochen für 1 min in der Mikrowelle gefärbt. Nach Entfärbung des Hintergrundes durch mehrmaliges Aufkochen in Entfärbelösung wurden die Gele im Geldokumentationssystem BioDocAnalyze (Whatmann Biometra) unter Weißlicht fotographiert oder mit einem Scanner (HP ScanJet 3970) eingelesen.

Sammelgel (Angaben für 2 Gele)

1,25 ml 0,5 M Tris-HCL, pH 6,8, 0,7 ml Acrylamidlsg., 3 ml Wasser, 25 µl 10% Ammoniumpersulfatlsg., 5 µl TEMED

Trenngel

2,5 ml 1,5 M Tris-HCL, pH 8,8, 11% (3,7 ml) bzw. 14% (4,7 ml) Acrylamidlsg., 3,8 ml bzw. 2,8 ml Wasser, 50 µl 10% Ammoniumpersulfatlsg., 5 µl TEMED

Proteinprobenpuffer
0,125 M Tris-HCL, pH 6,8, 5 mM EDTA, 15% (v/v) Glycerin, 2% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) Bromphenolblau, 0,1% (v/v) 2-Mercaptoethanol

Coomassie-Lösung
0,2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 10% (v/v) Essigsäure, 40% (v/v) Methanol

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

2.3.5. SCE-Aktivitätstest

Standardassay

Zur Bestimmung der pflanzlichen bzw. rekombinanten SCE-Enzymaktivität, wurde das Protein mit 250 µM Sinapin (Sinapoylcholin) in 100 mM Tricinpuffer (pH 8,5) in einem Standardassay mit einem Endvolumen von 200 µl für 10 min bei 30°C unter leichtem Schütteln (300 rpm) inkubiert. Als Stammlösung diente 2 mM Sinapin (MW: 368,45 g/mol). Das aus reifen *Brassica napus*-Samen isolierte Sinapin wurde freundlicherweise von Dr. A. Baumert (IPB, Halle) zur Verfügung gestellt. Nach der Inkubation wurde die Enzymreaktion durch die Zugabe von 10 µl Trifluoressigsäure abgestoppt. Die ausgefällten Proteine wurden durch Zentrifugation (14.000 x *g*, 10 min, RT) pelletiert und der Überstand mittels HPLC bzw. UPLC auf die enzymatische Bildung von Sinapinsäure analysiert (2.5.3.).

Assay zur Ermittlung der Substratspezifität

Um die Substratspezifität der pflanzlichen SCE zu bestimmen, wurde die Aktivität der gereinigten Enzymfraktionen (BnSCE1, BnSCE2 und BnSCE3) mit verschiedenen Substraten getestet. Die Aktivität wurde jeweils anhand von 16 phenolischen Verbindungen, welche freundlicherweise von Dr. Alfred Baumert[5] synthetisiert und zur Verfügung gestellt wurden, untersucht (Clauss *et al.*, 2008). Die folgenden phenolischen Verbindungen wurden im Enzymassay getestet: Sinapin (Sinapoylcholin), Cinnamoylcholin, Feruloylcholin, Caffeoylcholin, 4-Cumaroylcholin, Benzoylcholin, 4-Hydroxybenzoylcholin, Vanilloylcholin, Syringoylcholin, 3-Phenylpropionylcholin, 3-(3′,4′-Dimethoxyphenyl)-propionylcholin, Sinapoylethanolamin, Feruloylethanolamin, 4-Cumaroylethanolamin, Sinapoylglucose und Sinapoylmalat (Strukturformeln siehe Tabelle 7, Abbildung 38, Abbildung 40). Der Enzymassay wurde wie der Standardassay angesetzt, wobei die Substratkonzentration 400 µM betrug. Um die Linearität der Reaktion zu gewährleisten, wurden die Enzymkonzentration und die Inkubationszeit an die unterschiedlichen Substrate angepasst. Die gewählten Be-

[5] Leibniz Institut für Pflanzenbiochmie, Abt. Sekundärstoffwechsel, Halle/Saale, Deutschland

dingungen wurden in Vorversuchen ermittelt. Nach dem Abstoppen der Reaktion mit Trifluoressigsäure und anschließender Zentrifugation wurden die Reaktionsgemische chromatographisch analysiert (2.5.3.).

2.3.6. Inhibition der Enzymaktivität

Um zu untersuchen, inwieweit der serinproteasespezifische Inhibitor Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF; Fahrney und Gold, 1963) die BnSCE3-Aktivität hemmen kann, wurde der Inhibitor in Konzentrationen von 1, 10 und 50 mM (in 100 mM Tricinpuffer; pH 8,5) mit gereinigtem BnSCE3-Protein (0,5 µg) aus *Brassica napus*-Keimlingen für 30 sec präinkubiert und dann für weitere 5 min bei 30°C zusammen mit dem Substrat Sinapin inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Reaktion durch die Zugabe von 10 µl Trifluoressigsäure abgestoppt. Die ausgefällten Proteine wurden durch Zentrifugation (14.000 x *g*, 10 min, RT) pelletiert und der Überstand mittels UPLC auf die enzymatische Bildung von Sinapinsäure analysiert (2.5.3.).

2.3.7. Bestimmung der kinetischen Konstanten

Die Bestimmung der kinetischen Parameter (Michaelis-Konstante (K_m), Maximalgeschwindigkeit (V_{max})) erfolgte für die Substrate Sinapin, Cinnamoylcholin und 3-Phenylpropionylcholin, basierend auf den Standardassaybedingungen (2.3.5.). Um die Linearität der Reaktion zu gewährleisten, wurden die Substrat-, die Enzymkonzentration und die Inkubationszeit an die unterschiedlichen Substrate angepasst. Für jedes Substrat wurden fünf Konzentration und jeweils drei Reaktionszeitintervalle gewählt. Geeignete Substratkonzentrationen und Inkubationszeiten wurden durch Vortests ermittelt (Daten nicht gezeigt). Die Reaktion wurde jeweils durch die Zugabe von BnSCE3-Protein gestartet. An den gewählten Zeitpunkten wurde dem Reaktionsgemisch eine Probe von 50 µl entnommen und die Reaktion durch die Zugabe von 5 µl Trifluoressigsäure abgestoppt. Die ausgefällten Proteine wurden durch Zentrifugation (14.000 x *g*, 10 min, RT) pelletiert und der Überstand mittels UPLC auf Produktbildung analysiert (2.5.3.). Die Ermittlung der kinetischen Parameter erfolgte mit Hilfe der Auftragungen nach Michaelis und Menten sowie nach Lineweaver und Burk (Segel, 1975).

2.3.8. Isolierung von RNA

Gesamt-RNA aus *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenteilen erfolgte mit dem RNeasy Plant Mini-Kit (Qiagen) unter Durchführung eines DNA-Verdaus mit RNase-freier DNase (Qiagen) nach Herstellerangaben. Die isolierte RNA wurde bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

mRNA aus *Brassica napus*-Keimlingen

Für die mRNA-Isolierung aus zwei Tage alten *Brassica napus*-Keimlingen wurde isolierte Gesamt-RNA aus diesem Keimlingsstadium verwendet. Die Isolierung erfolgte mit dem Oligotex mRNA Mini Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers. Zum Fällen der mRNA erfolgte die Zugabe von 2,5 Volumen 100% (v/v) EtOH und 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat. Die Proben wurden über Nacht bei -80°C inkubiert und anschließend zentrifugiert (14.000 x *g*, 30 min, 4°C). Das Pellet wurde mit eiskaltem 75% (v/v) EtOH gewaschen (500 µl), anschließend zentrifugiert (14.000 x *g*, 10 min, 4°C) und für 30 min bei RT getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 6 µl RNase-freiem Wasser auf Eis gelöst. Die mRNA wurde anschließend für das 5´-RACE-Experiment (2.4.6.) eingesetzt.

Gesamt-RNA aus *Arabidopsis thaliana*-Samen und -Keimlingen

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Samen bzw. Keimlingen erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Vicient und Delseny, 1999). 100 mg des gemörserten Materials wurden mit 550 µl RNA-Extraktionspuffer versetzt und für 5 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 550 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) wurden die Proben für 15 sec gemischt und anschließend zentrifugiert (14.000 x *g*, 3 min, RT). Die abgenommene obere, wässrige Phase (ca. 550 µl) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Volumen Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) versetzt, für 15 sec gemischt und zentrifugiert (14.000 x *g*, 2 min, RT). Erneut wurde die obere, wässrige Phase (ca. 400 µl) in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1/4 Volumen LiCl (10 M) versetzt, gemischt (invertieren) und anschließend für 60 min auf Eis inkubiert. Zur Pelletierung der gefällten Nukleinsäuren wurden die Proben zentrifugiert (13.000 x *g*, 20 min, 4°C). Das Pellet wurde in 100 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert. Zum Fällen der RNA erfolgte die Zugabe von 2,5 Volumen 100% (v/v) EtOH und 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat. Die Proben wurden für 90 min bei -20°C inkubiert und anschließend zentrifugiert (14.000 x *g*, 30 min, 4°C). Das Pellet wurde mit eiskaltem 75% (v/v) EtOH gewaschen (500 µl), anschließend zentrifugiert (14.000 x *g*, 10 min, 4°C) und für 30 min bei RT getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in

50 µl RNase-freiem Wasser auf Eis gelöst. Die RNA wurde anschließend mit dem RNA Cleanup Protokoll aus dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt, wobei ein DNA-Verdau mit RNase-freier DNase (Qiagen) durchgeführt wurde. Die isolierte RNA wurde bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

RNA-Extraktionspuffer
200 mM Tris-HCL, pH 8,0, 400 mM LiCl, 25 mM EDTA, 1% (w/v) SDS

2.3.9. Isolierung von Plasmid-DNA

Escherichia coli, Agrobacterium tumefaciens

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus 2 ml- (*E. coli*) oder 4 ml-Übernachtkultur (*A. tumefaciens*) erfolgte mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Die isolierte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4°C bzw. -20°C (längere Aufbewahrung) gelagert.

2.3.10. Isolierung von genomischer DNA

Brassica napus

Für die Isolierung genomischer DNA wurde der DNeasy Plant Mini- bzw. Maxi-Kit (Qiagen) verwendet. Dazu wurden 100 mg bzw. 1 g Pflanzenmaterial mit flüssigem Stickstoff eingefroren, gemörsert bzw. mit Zirconium-Kugeln im Bead Beater (Biospec Products, Bartlesville, USA) für eine Minute mit Hilfe des AP1 Puffers aufgeschlossen und nach den Angaben des Herstellers weiterverarbeitet. Die isolierte genomische DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

Arabidopsis thaliana

Für die Isolierung genomischer DNA zur Genotypisierung der T-DNA-Insertionslinien mittels PCR wurde ein kleines Blattstückchen (ca. 9 mm^2) in 40 µl 0,25 N NaOH mit Hilfe einer Pipettenspitze zerkleinert. Nach dem Vortexen der Probe wurde sie für 30 sec. auf 95°C im Thermocycler erhitzt. Anschließend wurden der Präparation 20 µl gDNA-Extraktionspuffer und 40 µl 0,25 N HCl zugegeben. Die Extrakte wurden gut gemischt und für weitere 2 min bei 95°C inkubiert. Für die Genotypisierungs-PCR der T-DNA-Linien wurden 2 µl der Extraktion als *template* eingesetzt (2.4.10.).

gDNA-Extraktionspuffer
0,5 M Tris-HCL, (pH 8,0), 0,25% (v/v) Igepal/Ca630

2.3.11. Auftrennung von Nukleinsäuren

Die Auftrennung von DNA und RNA erfolgte elektrophoretisch, sofern nicht anders angegeben, in 1 % (w/v) Agarosegelen in 1x TBE-Puffer. Zur Visualisierung der DNA wurden vor dem Gießen des Gels 0,1 μg ml^{-1} Ethidiumbromid zugesetzt. Die Proben wurden vor dem Beladen des Gels mit 10x DNA-Ladepuffer versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei 80-120 Volt. Zusätzlich wurden Agarose-Fertiggele (E-Gel *single comb*; Invitrogen) verwendet, wobei die Auftrennung mittels E-Gel PowerBase v.4 (Invitrogen) innerhalb von 15 bzw. 30 min erfolgte. Die Auswertung der Gele erfolgte mittels Größenstandard (SmartLadder; Eurogentec, Seraing, Belgien) und Geldokumentationssystem BiodocAnalyze (Whatmann Biometra).

1x TBE-Puffer
0,45 M Tris-HCL, (pH 8,0), 0,45 M Borsäure, 10 mM EDTA

10x DNA-Ladepuffer
20% (v/v) Glycerin, 0,1 M EDTA, 1% (w/v) SDS, 0,2% (w/v) Bromphenolblau, 0,2% (w/v) XylencyanolFF

2.3.12. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente wurden auf dem UV-Leuchttisch des Geldokumentationssystems BiodocAnalyze (Whatmann Biometra) bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm detektiert und mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten. Die Elution der DNA aus der Gelmatrix erfolgte mit Hilfe des MinElute Gel Extraction Kit (Fragmente bis 4 kb) bzw. des QIAquick GelExtraction Kit (Fragmente über 4 kb) der Firma Qiagen nach Herstellerangeben.

2.3.13. Reinigung von DNA

Die Reinigung von DNA nach Restriktionsspaltungen, Polymerasekettenreaktionen oder Dephosphorylierung erfolgte sowohl mit dem Quick-Clean-Kit (Bioline, Luckenwalde) nach Herstellerangaben, als auch durch die Ethanol-Natriumacetat-Fällung. Dabei wurde die zu fällende DNA mit $^1/_{10}$ Volumen 3 M Na-Acetat und 2,5 Volumen 100% (v/v) EtOH versetzt und 1 h bei -20°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation (14.000 x *g*, 30 min, 4°C) wurde das Pellet mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und nach Trocknung in Wasser resuspendiert.

2.4. Molekularbiologische Methoden

Der Großteil der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten molekular- und mikrobiologischen Standardtechniken sind, sofern nicht anders beschrieben, bei Sambrook *et al.* (1989) nachzulesen.

2.4.1. Restriktionsanalyse

Für Restriktionsanalysen zur Kontrolle von Insertgrößen nach einer Klonierung wurde 1 µl (ca. 0,2 bis 0,5 µg) Plasmid-DNA mit 5 U des jeweiligen Restriktionsenzyms in einem Endvolumen von 10 µl für 60 min bei optimaler Arbeitstemperatur des entsprechenden Enzyms inkubiert. Bei präparativen Restriktionsansätzen wurden entsprechend größere Mengen DNA (2-5 µg) eingesetzt. Restriktionen genomischer DNA wurden über Nacht mit 10 µg DNA und 50 U des jeweiligen Enzyms bei optimaler Arbeitstemperatur des Enzyms durchgeführt.

2.4.2. Ligation

Die mit einem 3′-A-Überhang amplifizierten PCR-Fragmente (2.4.4.) wurden in den T-Überhang-Vektor pGEM® T-Easy (Promega) nach den Angaben des Herstellers subkloniert. DNA-Fragmente mit korrekter Sequenz wurden durch Restriktion aus dem pGEM® T-Easy-Vektor isoliert (2.1.3., 2.4.1.) und mit der T4-DNA-Ligase (Promega) in den entsprechend geschnittenen Zielvektor ligiert (2.4.2.). Ein typischer Ligationsansatz mit einem Endvolumen von 10 µl mit 3 U T4-DNA-Ligase wurde über Nacht bei 4°C inkubiert und enthielt die dreifache molare Menge des zu klonierenden DNA-Fragmentes gegenüber dem eingesetzten Vektor. Bei Klonierungen mit einer Vektorgröße über 6 kb und bei der Subklonierung der BAC-Fragmente kam eine modifizierte Ligationsmethode zum Einsatz:

Restriktion des Vektors	Restriktion zur Gewinnung des Inserts
3 µl Plasmid	20 µl rekombinantes Plasmid
1 µl 10 x Restriktasepuffer	5 µl 10 x Restriktasepuffer
0,5 µl Restriktase 1 (10 U/ µl)	3 µl Restriktase 1 (10 U/ µl)
0,5 µl Restriktase 2 (10 U/ µl	3 µl Restriktase 1 (10 U/ µl)
5 µl dd H_2O	19 µl dd H_2O

Die Restriktionsansätze wurde 2 h bei der optimalen Arbeitstemperatur der Enzyme inkubiert. Anschließend folgte die Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme durch eine 15 minütige Inkubation bei 65°C. Nach der Dephosphorylierung des Vektors in einem 30 µl Ansatz wurden beide Ansätze vereinigt. Nach der Reinigung der DNA (2.3.13.), wurde das DNA-Pellet in einem 20 µl Ligationsansatz aufgenommen und über Nacht bei 4°C inku-

biert. 1 µl der Ligationsansätze wurde in chemokompetente *E. coli* XL1 Blue Zellen bzw. 2 µl in elektrokompetente *A. tumefaciens* Zellen transformiert. Die Selektion der gewünschten Vektor-Fragment-Kombination erfolgte mit Hilfe der durch den rekombinanten Vektor vermittelten Antibiotikaresistenz. Die Plasmidkonstrukte wurden anschließend aus der Bakterienkultur isoliert und durch Restriktionsanalyse überprüft (2.3.9., 2.4.1.).

2.4.3. DNA-Dephosphorylierung

Um die Selbstligation von Vektoren zu verringern wurde eine Dephosphorylierung mit der SAP (Shrimp alkaline phosphatase, Roche) durchgeführt. Zum 20 µl Restriktionsansatz wurden dabei 3 µl 10 x SAP-Puffer, 3 µl SAP (1 U/µl) und 4 µl dd H_2O gegeben. Die Dephosphorylierung erfolgte für 15 min bei 37°C. Anschließend wurde das Enzym durch eine 15 minütige Inkubation bei 65°C inaktiviert.

2.4.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion diente der Amplifikation von DNA-Abschnitten (Mullis *et al.*, 1986). Für analytische Zwecke wurde die GoTaq DNA Polymerase mit 5x Green GoTaq Reaction Buffer (Promega) und für präparative PCR-Reaktionen der Platinum PCR Super-Mix High Fidelity (Invitrogen) nach Herstellerangaben verwendet. Nachfolgend ist die Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes dargestellt.

PCR-Ansatz (GoTaq)	eingesetztes Volumen
PCR-Reaktionspuffer (10x)	5 µl
dNTPs (10 mM, Peqlab, Köln)	1 µl
Primer 1 (25 pmol/µl)	1 µl
Primer 2 (25 pmol/µl)	1 µl
GoTaq-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
dd H_2O	ad 50 µl
DNA (1µg)	entsprechend der vorliegenden Konzentration

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen im Eppendorf MasterCycler Gradient (Eppendorf) durchgeführt.

PCR-Programmschritt	Zeit	Temperatur (°C)
initiale Denaturierung	2 min	94
Denaturierung	45 sec	94
Annealing	30 sec	55 (High Fidelity) bzw. T_A des Primers (GoTaq)
Elongation	1 min/kb	68 (High Fidelity) bzw. 72 (GoTaq)
finale Elongation	10 min	68 (High Fidelity) bzw. 72 (GoTaq)

Die PCR-Programmschritte 2.-4. wurden 25- bis 35-mal wiederholt.

2.4.5. Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Für die cDNA-Synthese wurden 1-2 µg Gesamt-RNA mit Oligo-dT-Primern und dem Omniscript® RT Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Zur Amplifizierung wurden 2 µl des Reaktionsansatzes in eine PCR eingesetzt. Die Amplifikate wurden anschließend mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese analysiert (2.3.11.).

2.4.6. 5´-Rapid Amplification of cDNA Ends (5´-RACE)

Das durch die PCR mit degenerierten Primern amplifizierte 471 bp große cDNA-Fragment der BnSCE3 umfasste den 3´-Bereich eines offenen Leserahmens. Dieses cDNA-Fragment wurde mit Hilfe der RACE-PCR am 5´-Ende vervollständigt. Die Durchführung erfolgte mit Hilfe des *Smart™ Race cDNA Amplifikation Kits* (BD Biosciences Clontech) nach den Angaben des Herstellers. 1 µg mRNA (2.3.8.) von zwei Tage alten *Brassica napus*-Keimlingen wurden für die cDNA Synthese eingesetzt. Nach der Umschreibung der mRNA in cDNA wurde eine PCR mit jeweils einem genspezifischen Primer (GSP1-R1, -R2, -R3, -R4; siehe Tabelle A1) und dem Universal Primer A Mix (UPM; siehe Tabelle A1) durchgeführt. Um die Spezifität der entstandenen PCR-Produkte zu erhöhen, wurde anschließend eine *nested* PCR mit den Primern (GSP1-R1 und NUP - Nested Universal Primer A; siehe Tabelle A1), die innerhalb des ersten PCR-Produkts binden, durchgeführt. Die erhaltenen Fragmente wurden aus dem Gel eluiert (2.3.12.), in den Vektor pGEM®-T Easy kloniert (2.1.3.) und über Sequenzanalyse (2.4.11.) verifiziert.

2.4.7. Genome Walking

Um die Promotorsequenz der BnSCE3 zu identifizieren, wurde ein *Genome Walking* an genomischer DNA von *Brassica napus* mit dem GenomeWalker™ Universal Kit (BD Biosciences Clontech) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurden vier genomische DNA-Bibliotheken (*GenomeWalker*-Bank) hergestellt. 25 µg genomische DNA wurden über Nacht bei 37°C mit Restriktasen, die glatte Fragmentenden generieren, inkubiert. Die resultierenden DNA-Bibliotheken wurden als DL-1 (Restriktase *Eco*RV), DL-2 (*Dra*I), DL-3 (*Pvu*-II) und DL-4 (*Ssp*I) bezeichnet. Nach der Reinigung der DNA und der Ligation des *GenomWalker* Adapters an das 5'-Ende der genomischen DNA-Fragmente, kann eine PCR mit einem genspezifischen Primer (gwGSP1 bzw. gwGSP2; Tabelle A1) und einem Primer gegen den *GenomeWalker* Adapter (AP1; siehe Tabelle A1) durchgeführt werden. Um die Spezifität zu erhöhen, wurde eine *nested* PCR mit den Primern (Tabelle A1) gwGSP3 und AP2 durchgeführt. Die größten der erhaltenen Fragmente wurden aus dem Gel eluiert

(2.3.12.), in den Vektor pGEM-T® Easy kloniert (2.1.3.) und über Sequenzanalyse (2.4.11.) verifiziert.

2.4.8. Heterologe Proteinexpression

Expression der *BnSCE3* in *Nicotiana benthamiana*

Die heterologe Expression der *BnSCE3* in *Nicotiana benthamiana* erfolgte unter der Kontrolle des lichtregulierten Promotors der kleinen RuBisCo Untereinheit (RbcS1) aus *Asteraceous chrysanthemum* (Outchkourov *et al.*, 2003). Das Expressionskonstrukt wurde basierend auf dem Leserahmen der BnSCE3, unter Anfügung der Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Not*I über PCR (2.4.4.) mit den Primern BnSCErub_F und BnSCErub_R (Tabelle A1) amplifiziert. Im Anschluss an die Subklonierung in den Vektor pGEM®-T Easy (2.1.3.) wurde das Konstrukt durch Sequenzierung (2.4.11.) auf seine Richtigkeit überprüft. Die korrekte Sequenz wurde in pImpact1.1 (2.1.3.) subkloniert. Anschließend wurde die gesamte Expressionskassette als *Asc*I-*Pac*I-Fragment in den binären Vektor pBINPLUS (2.1.3.) integriert und anschließend in den *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm GV2260 transformiert (2.1.4.). Die Infiltration der *Nicotiana benthamiana* Blätter mit der Bakterienlösung erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Kapila *et al.*, 1997 (2.2). Nachdem die Pflanzen für fünf Tage im Gewächshaus kultiviert wurden, konnten die transformierten Blattbereiche entfernt und für weitere Untersuchungen verwendet werden.

Expression der putativen Arabidosis GSDL-Lipasen in *Nicotiana benthamiana*

Die heterologe Expression der vier putativen *Arabidopsis thaliana* GDSL-Lipasen (*At1g28640*, *At1g28650*, *At1g28660*, *At1g28670*) in *Nicotiana benthamiana* erfolgte unter der Kontrolle des lichtregulierten Promotors der kleinen RuBisCo Untereinheit (RbcS1) aus *Asteraceous chrysanthemum* (Outchkourov *et al.*, 2003). Die Expressionskonstrukte wurden basierend auf dem jeweiligen Leserahmen der putativen Arabidopsis-Lipasen, unter Anfügung der Restriktionsschnittstellen für *Xba*I und *Not*I über PCR (2.4.4.) mit den Primern 631rub_F und 631rub_R für At1g28640, 632rub_F und 632rub_R für At1g28650, 633rub_F und 633rub_R für At1g28660 und 634rub_F und 634rub_R für At1g28670 (Tabelle A1) amplifiziert. Im Anschluss an die Subklonierung in den Vektor pGEM®-T Easy (2.1.3.) wurde das Konstrukt durch Sequenzierung (2.4.11.) auf seine Richtigkeit überprüft. Die korrekte Sequenz wurde in pImpact1.1 (2.1.3.) subkloniert. Anschließend wurde die gesamte Expressionskassette als *Asc*I-*Pac*I-Fragment in den binären Vektor pBINPLUS (2.1.3.) integriert und anschließend in den *Agrobakterium tumefaciens* Stamm GV2260 transformiert (2.1.4.). Die Infiltration der *Nicotiana benthamiana* Blätter mit der Bakterienlösung erfolgte

nach einem modifizierten Protokoll von Kapila *et al.*, 1997; 2.2) . Nachdem die Pflanzen für fünf Tage im Gewächshaus kultiviert wurden, konnten die transformierten Blattbereiche entfernt und für weitere Untersuchungen verwendet werden.

2.4.9. Samenspezifische Überexpression der *BnSCE3*

Expression der *BnSCE3* in *Arabidopsis thaliana* und *Brassica napus*

Die Expression der *BnSCE3* erfolgte samenspezifisch in *Arabidopsis thaliana* und *Brassica napus* unter der Kontrolle des samenspezifischen napin590-Promotors des Napingens aus *Brassica napus*, eines im Samen vorkommenden Speicherproteins. Für die Herstellung des Überexpressionskonstruktes wurde die codierende Sequenz der *BnSCE3* (1170 bp) ausgehend von der cDNA durch PCR (2.4.4.) amplifiziert. Durch die Auswahl der Primer BnSCEnap_F und BnSCEnap_R (Tabelle A1) wurde die Sequenz mit den Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Sma*I und *Bam*HI versehen. Anhand der eingefügten Schnittstellen erfolgte die Subklonierung des *BnSCE3*-Fragmentes in den Vektor pBNN zwischen dem napin590-Promotor aus *Brassica napus* und dem nos-Terminator aus *Agrobacterium tumefaciens*. Die gesamte Expressionskassette wurde über eine *Hind*III-*Spe*I-Restriktion in den binären Vektor pLH7000 transferiert und durch Agrobacterium-vermittelten Gentransfer in *Arabidopsis thaliana* (*A. tumefaciens*, Stamm EHA105, 2.1.4.) und *Brassica napus* L. var. napus cv. Lisora (*A. tumefaciens*, Stamm GV3101, 2.1.4.) transformiert (2.2).

2.4.10. Genotypisierung der T-DNA-Insertionslinien

In der vorliegenden Arbeit konnten sieben T-DNA-Insertionslinien beim *Salk Institute for Biological Studies*[6] bestellt und nachfolgend untersucht werden. Mit Hilfe der PCR sollten die Pflanzen auf die korrekte Insertion der T-DNA untersucht werden, und ob sie im Bezug auf das ausgeschaltete Gen homozygot sind (Alonso *et al.*, 2003). Dazu diente genomische DNA (2.3.10.) aus Blattmaterial als Matrize für die PCR mit gen- und T-DNA-spezifischen Primern. Eine Übersicht der analysierten SALK-Linien mit den verwendeten Primerkombinationen ist nachfolgend dargestellt. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind in Tabelle A1 aufgeführt.

[6] Salk Institute for Biological Studies, San Diego, Kalifornien, USA; http://signal.salk.edu/

Tabelle 4: Übersicht der SALK-Linien und entsprechend verwendeten Primerkombinationen.

Gen	T-DNA-Insertionslinien	Primer
At1g28640	SALK_111635.43.50.x SALK_126472.31.85.x	640_LP-5UTR; 640_RP-5UTR; LBa1 640_LP3; LBa1
At1g28650	SALK_118915.41.60.x SALK_010911	650_LP2; 650_RP2; LBa1 650_LP2; 650_RP2; LBa1
At1g28660	SALK_080571.32.10.x SALK_041461.39.60.x	660_LP1; 660_RP2; LBa1 660_LP2; 660_RP3; LBa1
At1g28670	SALK_137816.33.60.x	670_LP2-Pro; 670_RP2-Pro; LBa1

Die Abbildung 3 gibt einen Überblick über die Strategie zur Genotypisierung der SALK-Linien mittels PCR. Für die Insertionslinien wurden die T-DNA-Insertion und Homozygotie mit drei Primern getestet. Das Primerpaar LP und RP resultiert in der Amplifikation der Wildtypgenbande. Ist die Pflanze heterozygot, ergibt die Kombination LBa1/LP bzw. RP (T-DNA-spezifischer Primer/genspezifische Primer) ein zusätzliches Fragment.

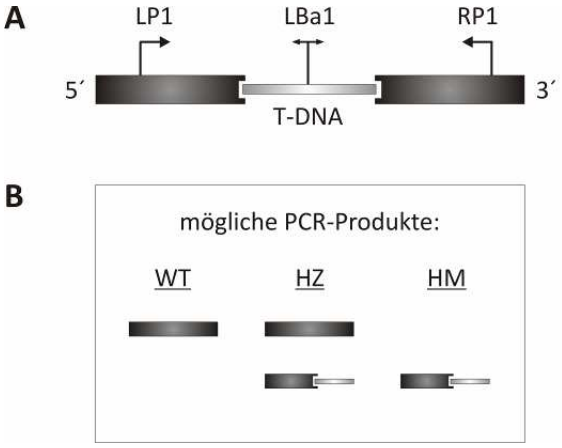


Abbildung 3: Schematische Darstellung zur Identifizierung homozygoter T-DNA-Linien mittels PCR. Teilabbildung A zeigt die vereinfachte, nicht maßstabsgerechte Illustration einer genomischen Gensequenz (schwarze Bereiche) mit einer T-DNA-Insertion (grauer Bereich) und den verwendeten Primern: LP1 - genspezifischer Primer 1, RP1 - genspezifischer Primer 1 und LBa1 - T-DNA-spezifischer Primer. Teilabbildung B visulalisiert die möglichen PCR-Fragmente, die die Situation in der WT (Wildtyppflanze), der HZ (heterozygoten Pflanze) und der HM (homozygoten Pflanze) widerspiegeln.

Die resultierenden PCR-Fragmente wurden in den Vektor pGEM-T® Easy kloniert. Die anschließende Sequenzierung der amplifizierten Fragmente (2.4.11.) ermöglichte die genaue Bestimmung der T-DNA-Insertionsstelle.

2.4.11. Sequenzierung von DNA und Sequenzanalysen

Die Sequenzierung der DNA-Fragmente erfolgte extern durch die Firma MWG Biotech (Ebersberg). Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm Clone Manager Suite (Sci Ed Software, Durham, NC, USA) analysiert. Datenbankabfragen erfolgten über die

Internetseite der GenBank[7] mit den Standardeinstellungen des BLAST Programms. Die Vorhersage möglicher Transitpeptide und putativer N-Glycosylierungsstellen erfolgte mit den Programmen SignalP 3.0 und NetN Glyc 1.0 des CBS Prediction Severs[8]. Die Datenbank PLACE[9] erlaubt die Suche nach bekannten *cis*-Elementen innerhalb eines Promotors. Zur Gewinnung von Sequenzinformationen und zur Identifizierung von T-DNA-Insertionsmutanten wurde zusätzlich die Datenbank TAIR[10] genutzt.

2.5. Analytische Methoden

2.5.1. Extraktion der Sinapatester

Methanolische Extraktion

Zur Bestimmung des Gehaltes verschiedener Sinapatester wurde das Pflanzenmaterial mit Hilfe einer CryoMill Schwingmühle (MM 400, Retsch, Haan) und zugegebenen Kugeln (Durchmesser: 3 mm, Retsch) zerkleinert und zweifach mit 750 µl 80% (v/v) wässrigem Methanol durch eine jeweils 5-minütige Inkubation im Ultraschallbad extrahiert. Nach dem Mischen der Extrakte (vortexen) erfolgte die Zentrifugation des Pflanzenextraktes (11.000 x *g*, 10 min, RT). Ein Aliquot des Überstandes wurde nachfolgend mittels UPLC oder HPLC (2.5.3.) hinsichtlich der Sinapatester analysiert und quantifiziert.

Bestimmung des Gesamtsinapatestergehaltes durch Verseifung

Um den Gesamtgehalt an Sinapatestern zu bestimmen wurde ein Aliquot der extrahierten Sinapatester (50 µl) mit 40 µl H_2O und 10 µl 10 N KOH für 3 h bei 50°C im Heizblock alkalisch hydrolysiert. Danach wurden dem Reaktionsgemisch 12,5 µl konzentrierte Essigsäure und 37,5 µl H_2O zugegeben. Nach dem Mischen des Ansatzes (vortexen) erfolgte die Zentrifugation des Pflanzenextraktes (11.000 x *g*, 2 min, RT). Ein Aliquot des Überstandes wurde nachfolgend mittels UPLC oder HPLC (2.5.3.) hinsichtlich der Sinapatester analysiert und quantifiziert.

2.5.2. Dünnschichtchromatographie (DC)

Die Untersuchung der lipolytischen Aktivität der drei BnSCE-Fraktionen (BnSCE1, BnSCE2, BnSCE3) erfolgte mit den Substraten Phosphatidylcholin (1,2-Dioleoyl-Glycero-3-Phosphocholin, PC, 20 µl) und dem Triacylglycerol Triolein (TAG, 20 µl). Die Durchfüh-

[7] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
[8] http://www.cbs.dtu.dk/services/
[9] http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/
[10] Tair, http://www.arabidopsis.org/

rung des Experimentes sowie die Bereitstellung der Lipidsubstrate erfolgte mit freundlicher Unterstützung durch P. Dörmann[11]. Zu Beginn wurde die organische Phase der Lipidlösungen verdampft und der Rest in 2 ml Diethylether gelöst. Aliquots (10 µl) jeder Enzymfraktion (BnSCE1 84 µg; BnSCE2 95 µg; BnSCE3 1 µg) wurden der Lösung zugesetzt und mit 490 µl Lipasepuffer aufgefüllt. Die unterschiedlichen Proteinmengen resultieren aus den verschiedenen Reinheitsgraden der jeweiligen Enzymfraktion. Als Kontrolle wurde dem enzymatischen Assay H_2Odd zugesetzt. Als Positivkontrolle diente die Lipase aus *Chromobacterium viscosum* (L-0763; Sigma-Aldrich, Hamburg). Die Reaktionsansätze wurden für 20 min bei RT gemischt. Durch das Abdampfen der organischen Phase wurden die Ansätze auf 500 µl reduziert. Die Extraktion der Lipide erfolgte mittels Zugabe von 3 ml Chloroform/Methanol (2:1, v/v). Nach der Zentrifugation (1793 x *g*, 4 min, RT), dem Abdampfen der organischen Phase wurden die Proben in 40 µl Chloroform/Methanol (2:1; v/v) resuspendiert und mittels DC separiert. Phosphatidylcholin wurde mit Hexan/Diethylether/Essigsäure 85:15:1 (v/v/v) und Triacylglycerol mit Chloroform/Methanol/Ammoniumhydroxid 65:35:5 (v/v/v) auf Si250-PA Silicagel-Platten (Baker, Phillipsburg, NJ, USA) aufgetrennt. Die Visualisierung der Substanzen erfolgte mit Hilfe von Joddampf.

Lipasepuffer
40 mM Tris-HCL (pH 7,2), 2,5 mM $CaCl_2$, 50 mM H_3BO_3

2.5.3. Flüssigchromatographie (HPLC, UPLC)

Für die Flüssigkeitschromatographie mittels HPLC und UPLC wurden die Systeme der Firma Waters verwendet.

HPLC

Die Analyse der methanolischen Extrakte mittels HPLC erfolgte unter Verwendung einer 5 µm Nucleosil C18-Säule (250 mm x 4 mm) der Firma Macherey-Nagel (Düren) bei einer Flussrate von 1 ml min^{-1}. Die Separation der Komponenten erfolgte durch einen 40-minütigen linearen Gradienten von 10 bis 50% Acetonitril in 1,5% (v/v) Phosphorsäure in Wasser. Dabei erfolgte die photometrische Detektion der Substanzen im Photodioden-Array-Detektor 2996 (PDA) bei einer Wellenlänge von 330 nm.

[11] Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Potsdam, Deutschland

UPLC

Für die chromatographische Analyse mittels UPLC wurde eine BEH C18-Säule (50 mm x 2 mm, 1,7 µm) der Firma Waters mit einer Flussrate von 500 µl min^{-1} verwendet. Die Separation der Komponenten erfolgte durch einen 5-minütigen Gradienten von 5% Laufmittel A (0,1% Trifluoressigsäure in Wasser) für 30 sec und 27% Laufmittel A (0,1% Trifluoressigsäure in Wasser) für 80 sec, gefolgt von einem linearen Gradienten bis 95% Laufmittel A (0,1% Trifluoressigsäure in Wasser) für 12 sec. Dabei erfolgte die photometrische Detektion der Substanzen im Photodioden-Array-Detektor (PDA) bei einer Wellenlänge von 330 nm. Die Identifizierung und Quantifizierung der Metaboliten erfolgte unter Verwendung authentischer Standards. Sinapoylmalat wurde mit Hilfe von Sinapoylglucose als Standard quantifiziert. Die Prozessierung der Daten erfolgte mit dem Empower™ Software System (Waters).

2.5.4. Gaschromatographie (GC)

Um den Gehalt der Fettsäuren in den Wildtyp- und *BnSCE3*-Überexpressionssamen zu ermitteln, wurden die Proben mit Unterstützung von Mary R. Roth[12] gaschromatographisch in der Arbeitsgruppe von Prof. R. Welti untersucht. Die Fettsäuren wurden durch Inkubation der Extrakte in 3 M methanolischer Salzsäure bei 78°C für 30 min in Fettsäuremethylester umgewandelt. Als interner Standard wurde den Proben Pentadecansäure (15:0) zugesetzt. Die Proben wurden mit Pentan extrahiert und mittels GC unter Verwendung einer Supelco SP-2380 GC Kapillarsäule 30 m x 0,25 mm I.D., 0,20 µm (#24110-U; Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen) analysiert. Die Injektionstemperatur betrug 120°C. Die Ofentemperatur war für 2 min konstant bei 120°C und wurde nachfolgend um 4°C pro min erhöht bis zur Endtemperatur von 230°C, welche für 2 min gehalten wurde. Die Detektion erfolgte mittels eines Flammenionisationsdetektor bei 260°C. Die Fettsäuren wurden durch den Vergleich der Retentionszeiten mit verwendeten Standards identifiziert und über den zugesetzten internen Standard quantifiziert.

2.5.5. Massenspektrometrie (GC/MS, LC/MS)

Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC/MS)

Die Untersuchung der Primärmetabolite mittels GC/MS wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. J. Kopka, mit der Unterstützung von Alexander Erban[13], durchgeführt. Das in flüssi-

[12] Kansas Lipidomics Research Center, Kansas State University, Manhattan, KS, USA
[13] Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Potsdam-Golm, Deutschland

gem Stickstoff zerkleinerte Samenmaterial des Wildtyps (20 WT-Samen ~ 74,87 mg) und der *BnSCE3*-Überexpressionssamen (20 OE1-Samen ~ 112,01 mg; 20 OE2-Samen ~ 113,84 mg) wurde mit Extraktionslösung (-20°C) versetzt (WT = 360 µl; OE = 576 µl). Um das Frischgewicht-Extraktionsvolumen-Verhältnis konstant zu halten, wurde das Extraktionsvolumen den unterschiedlichen Frischgewichten angepasst. Die Proben wurden bei 70°C für 15 min schüttelnd inkubiert. Nach der Zugabe von Chloroform (WT = 200 µl; OE = 320 µl) wurden die Proben für weitere 5 min bei 37°C schüttelnd inkubiert. Durch die Zugabe von H_2Odd (WT = 400 µl; OE = 640 µl) und anschließender Zentrifugation (16.000 x *g*, 5 min, RT) erfolgte die Phasentrennung. Zweimal 80 µl der oberen polaren Phase wurden abgenommen und durch Vakuumzentrifugation (Concentrator 5301, Eppendorf, Hamburg) eingeengt. Die Pellets wurden gelöst und für 90 min bei 30°C in jeweils 40 µl *O*-Methylhydroxyaminhydrochlorid (20 mg ml^{-1} in Pyridin) derivatisiert, gefolgt von einer 30 minütigen Inkubation mit jeweils 70 µl *N*-Methyl-*N*-trimethylsilyl-trifluoracetamid sowie 10 µl Alkanmix der RI-Standards [Decan (RI 1000), Dodecan (RI 1200), Pentadecan (RI 1500), Octadecan (RI 1800), Nonadecan (RI 1900), Docosan (RI 2200), Octacosan (RI 2800), Dotriacontan (RI 3200), Hexatriacontan (RI 3600), jedes mit einer Konzentration von 0,22 mg ml^{-1} in Pyridin] bei 37°C (schüttelnd). Die GC-TOF-MS (Gaschromatografie-*Time of Flight*-Massenspektrometrie)-Untersuchungen erfolgten wie in Erban *et al.* (2007) beschrieben, jedoch unter Verwendung der chromatographischen Säule Varian VF-5ms (Varian GmbH, Darmstadt). Die Peakintensitäten der Massenfragmente (*m*/*z*) wurden mittels Probenfrischgewicht und internem RI Standard Sorbitol-C13 normalisiert. Die Annotation der Peakidentitäten erfolgte mittels TagFinder (Luedemann *et al.*, 2008) und der Retentionszeitenindex (RI)-Kollektion (Schauer *et al.*, 2005) der Golm Metabolom Datenbank (GMD; Kopka *et al.*, 2005). Die Metaboliten wurden mittels CAS-Registrierungsnummer (*Chemical Abstract System*) und durch die Kennung der *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG; Kanehisa *et al.*, 2004) charakterisiert. Signifikante Unterschiede in den relativen Intensitäten der maximumstandardisierten Daten wurden mit der Varianzanalyse (ANOVA) und einem anschließenden Tukey-HSD-Test ermittelt. Die *Independent Component Analysis* (ICA) wurde wie in Scholz *et al.*, 2004 beschrieben, durchgeführt. Die Metabolitendaten wurden in die Darstellung eines biologischen Stoffwechselnetzes eingebunden, welches mit dem Programm VANTED (Junker *et al.*, 2006) erstellt wurde.

Extraktionslösung (-20°C)

100% (v/v) MeOH (-20°C), 10% Nonadecansäuremethylester (2 mg ml^{-1} in Chloroform), 10% Sorbitol C 13 (0,2 mg ml^{-1} in MeOH)

Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC/MS)

- Analyse von Sekundärmetaboliten

Die Analyse der Sekundärmetabolitprofile erfolgte mittels UPLC/ESI-QTOF-MS in Einzelsamen und Keimpflanzen von *Brassica napus* in Zusammenarbeit mit Dr. Edda von Roepenack-Lahaye und Dr. Christoph Böttcher der Arbeitsgruppe Stress-und Entwicklungsbiologie[14], geleitet von Prof. Dierk Scheel. Im Fall der Einzelsamenanalyse wurden 30 Wildtyp- und 60 *BnSCE3*-Überexpressionssamen der transgenen Linien OE1, OE2 und OE3 analysiert. Das Gewicht der Samen variierte von 1,6 bis 8,1 mg. Die Zerkleinerung des Pflanzenmaterials erfolgte nach Kühlung in flüssigen Stickstoff und Zugabe von Stahlkugeln (Durchmesser: 2 mm, Retsch) mit Hilfe einer Schwingmühle (MM301, Retsch, Haan) für 2 min bei 30 Hz. Nach der Zugabe von 50 µl 50% (v/v) wässrigem Methanol, welches auf –20°C vorgekühlt wurde und 2 µM o-Anissäure als internen Standard enthielt, wurden die Proben unverzüglich für 15 sec gemischt, für 10 min im Ultraschallbad inkubiert und im Anschluss zentrifugiert (19.000 x *g*, 10 min, RT). Die Überstände wurden in ein neues Gefäß überführt und das Pellet erneut mit 50 µl 80% (v/v) wässrigem Methanol extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden mit der 3-fachen Menge an Wasser verdünnt (300 µl). Zur Quantifizierung der phenolischen Cholinester wurde ein 50 µl-Aliquot nochmals mit Wasser verdünnt und nachfolgend mittels eines 0,2-mm Polytetrafluorethylen-Membranfilters (Whatman) filtriert. Diese Fraktion wurde als Totalextraktfraktion bezeichnet. Der verbliebene Teil der vereinigten und verdünnten Extrakte wurde einer Festphasenextraktion zugeführt, um die abundanten Cholinkonjugate abzureichern (nach einem Protokoll von Böttcher *et al.*, 2011). Dazu wurden 30 mg Strata-X-CW33-Säulen (Phenomenex) mit 1 ml Methanol solvatisiert und mit der gleichen Menge an Wasser equilibiert. Nach dem Beladen der Säule mit dem Probenmaterial wurden sie mit 300 µl 25 mM wässrigen Ammoniumacetat und 300 µl Methanol gewaschen. Die Durchfluß- und Waschfraktionen wurden vereinigt und mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge eingeengt, nachfolgend in 50 µl 10% (v/v) wässrigem Methanol aufgenommen, für 10 min im Ultraschallbad inkubiert und zentrifugiert (19.000 x *g*, 10 min, RT). Diese Fraktion wurde als cholinesterabgereicherte Fraktion bezeichnet. Bei der Analyse der Keimpflanzen wurden die Frisch (FG)- und Trockengewichte (TG) für jede Probenklasse bestimmt. Die vereinigten Samen und Keimlinge (vier, acht, 12, 16, 20 Tage nach Keimung) wurden gefriergetrocknet und die jeweiligen FG/TG-Verhältnisse bestimmt. Zu 25 mg gefriergetrocknetem Probenmaterial wurden 250 µl 50%

[14] Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle (Saale), Deutschland

(v/v) wässriges Methanol, welches auf –20°C vorgekühlt wurde und 2 µM o-Anissäure als internen Standard enthielt (Tabelle A4), zugegeben, die Proben unverzüglich für 15 sec gemischt, für 10 min im Ultraschallbad inkubiert und abschließend zentrifugiert (19.000 x *g*, 10 min, RT). Die Überstände wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet einer zweiten Extraktion mit 250 µl 80% (v/v) wässrigem Methanol zugeführt. Im Anschluss wurden die vereinigten Extrakte mit der 3-fachen Menge an Wasser verdünnt. Ein 250 µl-Aliquot wurde entnommen, erneut verdünnt und filtriert. Der restliche Teil der vereinigten und verdünnten Extrakte wurde ebenfalls der Festphasenextraktion zugeführt. Jeweils drei technische Replikate jedes Entwicklungszeitpunktes und jeder Linie wurden analysiert. Die chromatographische Trennung der Extrakte erfolgte mit einem Acquity UPLC System (Waters), ausgestattet mit einer modifizierten C_{18}-Säule (HSS, 1,0 x 100 mm, Partikelgröße 1,8 µm, Waters), mit folgendem Gradientenprogramm bei einer Flußrate von 150 µl min^{-1}: 0 - 1 min, linear von 95% Laufmittel A bis 85% A; 1 - 7 min, linear von 85% A bis 55% A; 7 - 7,5 min, linear von 55% A bis 45% A; 7,5 - 8 min, linear von 45% A bis 5% A; 8 - 11 min, isokratisch 95% Laufmittel B; 11,5 - 14 min, isokratisch 95% A. Das Injektionsvolumen betrug 3,1 µl. Die eluierten Komponenten wurden in einem m/z-Bereich *m/z* 100-1000 mit einem MicrOTOF-Q Quadrupol-Flugzeit-Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen) im positiven Ionenmodus mit den folgenden Instrumenteneinstellungen detektiert: Nebulizergas, Stickstoff, 1,6 bar; Trockengas, Stickstoff, 6 l min^{-1}, 190°C; Kapillarspannung, -5500 V *end plate offset*, 500 V; *funnel* 1 RF, 200 Vpp; *funnel* 2 RF, 200 Vpp; *in-source CID energy*, 0 V; *hexapole* RF, 100 Vpp; *quadrupole ion energy*, 5 eV; Kollisionsgas, Argon; Kollisionsenergie, 10 eV; *collision* RF 200/400 Vpp (*timing* 50/50); *transfer time*, 70 µs; *prepulse storage*, 5 µs; *pulser frequency*, 10 kHz; Akquisitionsrate, 3 Spektren s^{-1}).

Laufmittel A
Wasser, 0,1% (v/v) Ameisensäure

Laufmittel B
Acetonitril, 0,1% (v/v) Ameisensäure

Bioinformatorische Auswertung der Metabolitenprofile

- Einzelsamen

Zur relativen Quantifizierung des Biomarkers Sinapin wurden Ionenchromatogramme für das Ion *m/z* 251,09 (Fragmention von Sinapin, $C_{13}H_{15}O_5^+$) generiert und integriert. Dreißig Rohdatensets jeder Probenklasse wurden mittels CompassXPort[15] in das mzData-Format

[15] http://www.bdal.de

konvertiert und mittels XCMS[16] prozessiert. Dabei wurden die konvertierten Rohdaten in drei separaten Probenklassen angeordnet (WT; OE-1; OE-2). Zur Peakdetektion wurde der *centWave*-Algorithmus (Tautenhahn *et al.*, 2008) mit folgenden Parametereinstellungen verwendet: *sntresh* = 3, *prefilter* = c(3,100), *ppm* = 25 and *peak width* = c(5,12). Für das iterative Alignment des Datensatzes wurden die XCMS-Funktionen *group* und *retcor* mit folgenden Parametereinstellungen verwendet: *group* (*minfrac* = 0,7, bw = 2,5, *mzwud* = 0,05); *retcor* (*plottype* ="*mdevden*", *span* = 1, *missing* = 0, *extra* = 0) und *group* (*minfrac* = 0,9, *bw* = 2, *mzwud* = 0,05). Nach dem Auffüllen von fehlenden Signalen mittels der XCMS Routine *fillPeaks* wurde eine Datenmatrix der Form [Signal (m/z, t_R *feature*) x Probe] generiert und in MSExcel importiert. Nach Normalisierung der Signalintensitäten auf das Samengewicht wurde für jede Probenklasse und jedes Signal der Intensitätsmedian bestimmt. Für die paarweisen Vergleiche WT vs. OE1 und WT vs. OE2 wurden *fold changes* und *p*-Werte (Student's *t*-test) zwischen zwei Probenklassen berechnet. Ein Signal wurde als differentiell annotiert, wenn es einen *p*-Wert kleiner als 0,05 und einen *fold change* von mehr als zwei oder weniger als 0,5 für beide paarweisen Vergleiche aufwies.

- Keimpflanzen

Die Rohdatenfiles wurden mittels CompassXPort[17] in das mzData-Format konvertiert und mittels XCMS[18] prozessiert. Dabei wurden die konvertierten Rohdaten den beiden Probenklassen zugeordnet (WT; OE), wobei die Analyse der beiden Überexpressionslinien unabhängig voneinander durchgeführt wurde. Zur Peakdetektion wurde der centWave-Algorithmus (Tautenhahn *et al.*, 2008) mit folgenden Parametereinstellungen verwendet: sntresh = 3, prefilter = c(3,500), ppm = 25 and peak width = c(5,12). Für fehlende Peakintensitäten wurden zufällig Werte zwischen 1 bis 10 in die Datenmatrix eingesetzt, um eine p-Wertberechnung zu ermöglichen. Die Signalintensitäten wurden mittels o-Anissäure normalisiert und mit dem FG/TG-Faktor pro Individuum (Samen bzw. Keimlingsstadium) kalkuliert. Für die paarweisen Vergleiche WT vs. OE wurden *Fold Changes* und *P*-Werte (Student's t-test) zwischen zwei Probenklassen berechnet. Ein Signal wurde als differentiell annotiert, wenn es einen *P*-Wert kleiner als 0,05 und einen *Fold Change* von mehr als zwei oder weniger als 0,5 für den jeweiligen Vergleich (WT/OE1 und WT/OE2) aufwies. Basierend auf dieser Auswertung wurde der Prozentsatz der veränderten Massensignale im

[16] http://metlin.scripps.edu/; http://www.bioconductor.org
[17] http://www.bdal.de
[18] http://metlin.scripps.edu/; http://www.bioconductor.org

Verhältnis zur Anzahl aller detektierten Massensignale pro Entwicklungsstadium und Überexpressionslinie ermittelt.

Elektrosprayionisation-Tandemmassenspektrometrie (ESI-MS/MS)

- Analyse von Di- und Triacylglycerol

Die Analyse der Neutralfette Triacylglycerol (TAG) und Diacylglycerol (DAG) in den *Brassica napus*-Wildtyp- und *BnSCE3*-Überexpressionssamen mittels ESI-MS/MS erfolgte mit Unterstützung von Mary R. Roth[19] in der Arbeitsgruppe von Prof. R. Welti. Ein Aliquot (10 µl) der in 1 ml Chloroform aufgenommenen Proben wurde für die Untersuchung verwendet. Als interne Standards wurden 3,1 nmol tri17:1 TAG und 4,6 nmol di15:0 DAG (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA) zugesetzt. Anschließend wurden dem Gemisch 1,4 ml Chloroform/Methanol/300 mM Ammoniumacetat (300:665:35) zugegeben. Die unfraktionierten Lipidextrakte wurden mittels Autosampler (LC Mini PAL, CTC Analytics AG, Zwingen, Schweiz) injiziert (30 µl min^{-1}) und mit einem ESI-*triple quadrupole* MS (API4000, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) analysiert. Die TAG- und DAG-Species wurden durch eine Neutralverlustanalyse als $[M+ NH_4]^+$ -Ionen detektiert (NL 285.2 (17:1, interner TAG-Standard); NL 273.2 (16:0); NL 301.2 (18:0); NL 299.2 (18:1); NL 297.2 (18:2); NL 295.2 (18:3), NL 355.3 (22:1)) mit einer Scangeschwindigkeit von 100 u sec^{-1}. Die Kollisionsenergie betrug +20V, das *declustering*-Potential +100 V, das *entrance*-Potential +14 V und das *exit*-Potential +14 V. Der Kollisionsgasdruck wurde niedrig und die Auflösung der Massenanalyse auf 0,7 u eingestellt. Die ESI-Quelle hatte folgende Einstellungen: 100°C Quellentemperatur, 5500 V Kapillarspannung, 20 a.u. (*arbitrary units*) Stickstoff-Trocknungsgas und 45 a.u. Ionenquellgase. Von jedem Spektrum wurden der Hintergrund substrahiert, die Daten geglättet, die Peakflächen integriert und mit der Analyst-Software (Applied Biosystems) ausgewertet. Aufgrund der Variation in der Ionisierungseffizienz innerhalb der Acylglycerolspezies mit verschiedenen Fettsäuren (Han und Gross, 2001) ist das Verhältnis des MS-Signals der TAG- und DAG-Spezies zu dem der internen Standards nicht direkt proportional. Die TAG- und DAG-Gehalte werden deshalb als relative Massensignale pro mg Trockengewicht dargestellt. Ein Signal von 1.0 entspricht dabei dem Signal von 1 nmol tri17:1 TAG (interner Standard).

[19] Kansas Lipidomics Research Center, Kansas State University, Manhattan, KS, USA

- Analyse des Lipidprofils

Die Analyse eines umfassenden Lipidprofils in den *Brassica napus*-Wildtyp- und *BnSCE3*-Überexpressionssamen mittels ESI-MS/MS erfolgte mit Unterstützung von Mary R. Roth[20] in der Arbeitsgruppe von Prof. R. Welti. Die Datenerfassung und -analyse sowie die Identifizierung der Acylgruppen erfolgte modifiziert nach Devaiah *et al.*, 2006. Ein Aliquot (6 µl) der in 1 ml Chloroform aufgenommenen Proben wurde für die Untersuchung verwendet. Als interne Standards (Welti *et al.*, 2002) wurden 0,6 nmol di12:0-PC (Phosphatidylcholin), 0,6 nmol di24:1-PC, 0,6 nmol 13:0-lysoPC, 0,6 nmol 19:0-lysoPC, 0,3 nmol di12:0-PE (Phosphatidylethanolamin), 0,3 nmol di23:0-PE, 0,3 nmol 14:0-lysoPE, 0,3 nmol 18:0-lysoPE, 0,3 nmol di14:0-PG (Phosphatidylglycerol), 0,3 nmol di20:0 (phytanoyl)-PG, 0,3 nmol 14:0-lysoPG, 0,3 nmol 18:0-lysoPG, 0,3 nmol di14:0-PA (Phosphatidsäure), 0,3 nmol di20:0 (phytanoyl)-PA, 0,2 nmol di14:0-PS (Phosphatidylserin), 0,2 nmol di20:0 (phytanoyl)-PS, 0,23 nmol 16:0-18:0-PI (Phosphatidylinositol), 0,16 nmol di18:0-PI, 2,01 nmol 16:0-18:0-MGDG (Monogalactosyldiacylglycerol), 0,39 nmol di18:0-MGDG, 0,49 nmol 16:0-18:0-DGDG (Digalactosyldiacylglycerol), and 0,71 nmol di18:0-DGDG zugesetzt. Anschließend wurden dem Gemisch 1,4 ml Chloroform/Methanol/300 mM Ammoniumacetat (300:665:35) zugegeben. Die unfraktionierten Lipidextrakte wurden mittels Autosampler (LC Mini PAL, CTC Analytics AG, Zwingen, Schweiz) injiziert (30 µl min^{-1}) und mit einem ESI-*triple quadrupole* MS (API4000, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) analysiert. Die Vorläufer-Ionen- und Neutralverlustanalyse der Extrakte resultierte in einer Serie von Spektren, wobei jedes Spektrum eine Lipidspezies mit einem gemeinsamen Kopfgruppenfragment darstellt. Die Lipidspezies wurden mit einer Scangeschwindigkeit von 50 oder 100 u sec^{-1} folgendermaßen detektiert: PC und lysoPC als $[M+ H]^+$ Ionen im positiven Ionenmodus (Vorläuferion (VI): 184,1); PE und lysoPE als $[M+ H]^+$ Ionen im positiven Ionenmodus (Neutralverlust (NL): 141,0); PG als $[M+ H]^+$ Ionen im positiven Ionenmodus (NL: 189,0); lysoPG als $[M- H]^-$ Ionen im negativen Ionenmodus (VI: 152,9); PI als $[M+ NH_4]^+$ Ionen im positiven Ionenmodus (NL: 277,0); PS als $[M+ NH_4]^+$ Ionen im positiven Ionenmodus (NL: 185,0); PA als $[M+ NH_4]^+$ Ionen im positiven Ionenmodus (NL: 115,0); MGDG als $[M+ NH_4]^+$ Ionen im positiven Ionenmodus (NL: 179,1) und DGDG als $[M+ NH_4]^+$ Ionen im positiven Ionenmodus (NL: 341,1). Die Kollisionsenergie betrug +28V für PE, +40 V für PC, +25 V für PI, PS und PA, +20 V für PG, +21 V für MGDG und +24 V für DGDG. Das *entrance*-Potential betrug +15 V für PE, +14 V für PC, PI, PA, PG und PS, und +10 V für MGDG und DGDG

[20] Kansas Lipidomics Research Center, Kansas State University, Manhattan, KS, USA

und das *exit*-Potential +11 V für PE, +14 V für PC, PI, PA, PG, PS und +23 V für MGDG und DGDG. Der Kollisionsgasdruck wurde auf 2 a.u. und die Auflösung der Massenanalyse auf 0,7 u eingestellt. Die ESI-Quelle hatte folgende Einstellungen: 100°C Quellentemperatur, +5500 V oder -4500 V Kapillarspannung, 20 a.u. Stickstoff-Trocknungsgas und 45 a.u. Ionenquellgase. Von jedem Spektrum wurden der Hintergrund substrahiert, die Daten geglättet, die Peakflächen integriert und mit der Analyst-Software (Applied Biosystems) ausgewertet. Die Lipide jeder Klasse wurden mit Hilfe der jeweiligen internen Standards quantifiziert. Die Normalisierung erfolgte mit Hilfe des Trockengewichtes und resultierte in Daten von nmol mg^{-1}.

2.5.6. Bestimmung des Cholingehaltes in Samen von *Brassica napus*

Die Quantifizierung des Cholingehaltes erfolgte mit Hilfe des Choline/Acetylcholine Quantification Kit von BioCat (Heidelberg) nach den Angaben des Herstellers. Für die fluorometrische Messung wurden jeweils 20 Samen einer Linie abgewogen und in flüssigem Stickstoff gemörsert. Von dem Material wurden jeweils 3 mg mit 100 µl des Cholinpuffers versetzt, gemischt und für 10 min im Ultraschallbad homogenisiert. Anschließend wurden die Proben für 2 min bei 11.000 x g zentrifugiert. Für die Reaktion wurden dann 10 µl des aufgeschlossenen Wildtyp-Samenmaterials und 1 µl des Extraktes der *BnSCE3*-Überexpressionssamen eingesetzt. Das in dem zu testenden Material enthaltene Cholin oxidiert über das Zwischenprodukt Betainaldehyd zu Betain. Diese Oxidationsprodukte reagieren mit der dem Testsystem beigefügten Cholinsonde und diese Reaktion kann nach 30 min Inkubationszeit mittels Fluoreszenz (Ex/Em 535/590 nm) in einem CytoFluor™ II Microwell Fluorescence Reader (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA) verfolgt werden. Die Quantifizierung des Cholingehaltes erfolgte mit Hilfe der zu Beginn des Experimentes erstellten Eichkurve.

2.5.7. Nahinfrarotspektroskopie (NIRS)

Intakte *Brassica napus*-Wildtyp- und homozygote *BnSCE3*-Überexpressionssamen wurden auf ihre Zusammensetzung in einem NIR Systems Model 6500 Spektrophotometer (FOSS-NIRSystems, Inc., Rellingen) untersucht. Spetroskopische Verfahren analysieren die Wechselwirkung zwischen elektromagnetischer Strahlung und der Materie und lassen dabei Rückschlüsse auf die Art der Materie zu. Die zu messende Probe wird in eine Quarzglasküvette (Durchmesser 3 cm, Volumen 10 ml) überführt und bei der NIRS einer polychromatischen Strahlung definierter Wellenlängen ausgesetzt, wodurch die Moleküle der Probe angeregt werden. Die Probe wird mit einem Spektrum unterschiedlicher Wellen-

längen (400-2500 nm) in 2 nm-Abständen bestrahlt. Jedes der vier biologischen Replikate wurde viermal vermessen. Die Spektren werden aus einem Mittelwert von 32 Messungen ermittelt. Mit Hilfe von Referenzspektren der zu analysierenden Moleküle erfolgt die quantitative Auswertung der Reflexionsspektren (bestehend aus 1050 Messpunkten). Das erzeugte Reflexionsspektrum ist abhängig von der Zusammensetzung der Probe. Ein großer Vorteil dieser Methode besteht darin, dass natives Material direkt auf den Gehalt mehrerer Inhaltstoffe analysiert werden kann, ohne dass im Vorfeld eine Extraktion nötig ist. Die Untersuchung qualitativer Samenparameter der Rapssamen (Wildtyp und *BnSCE3*-Überexpressionslinien) durch die NIRS-Analyse konnte mit der Unterstützung von Dipl.-Ing. Benjamin Wittkop[21] in der Arbeitsgruppe von Prof. Wolfgang Friedt durchgeführt werden. Die folgenden Qualitätsparameter der Rapssamen wurden dabei analysiert: Samenfarbe, Fasergehalt (Hemicellulose, Cellulose, Lignin), Ölgehalt, Ölsäuregehalt, Linolensäuregehalt, Rohproteingehalt und Glucosinolatgehalt. Die Ermittlung der Referenzspektren und die Datenauswertung erfolgten durch Dipl.-Ing. Benjamin Wittkop wie in Font *et al.*, 2005) beschrieben.

2.6. Mikroskopie

2.6.1. Stereomikroskop

Mikroskopische Analysen der Rapssamen und -keimlinge erfolgten mit Hilfe des Stereomikroskops Stemi 2000-C (Zeiss, Jena). Die Präparate wurden mit einer integrierten FUJIX Digitalkamera HC-300Z fotografiert.

2.6.2. Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM)

Für die Untersuchung struktureller Veränderungen der transgenen Rapssamen wurden ganze Samen und Samenquerschnitte elektronenmikroskopisch mittels eines *Environmental Scanning Electron Microscope* (ESEM) des Typs Philips ESEM XL 30 FEG (Philips Electron Optics, Eindhoven, NL) analysiert. Auf die elektronenmikroskopische Präparation des Probenmatrials (Fixierung, Trocknung und Bedampfung) konnte bei dieser Variante der Rasterelektronenmikroskopie verzichtet werden. Sowohl die ganzen als auch die, mittels einer Rasierklinge entlang der Quernaht, halbierten Samen wurden auf den Mikroskopträgern befestigt. Die Abbildung der Proben erfolgte im sogenannten WET-Modus bei einem Probenkammerdruck von 1,2 mbar und einer Beschleunigungsspannung von 12 kV durch

[21] Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Justus-Liebig-Universität, Gießen, Deutschland

die Nutzung des Sekundärelektronensignals. Es wurden vier Wildtypsamen und jeweils sechs Samen der zwei zu untersuchenden *BnSCE3*-Überexpressionslinien (OE1, OE2) mit dem ESEM untersucht. Die Aufnahmen entstanden mit freundlicher Unterstützung von Dipl.-Phys. Frank Syrowatka[22].

2.7. Statistische Methoden

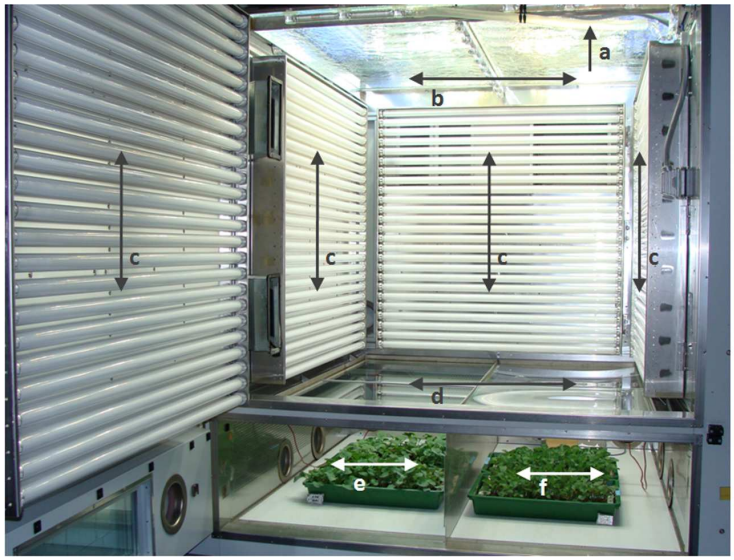
Die statistische Signifikanz zweier Messreihen wurde anhand des „Zweistichproben-*t*-Tests: Gleicher Varianzen" mit Hilfe des Programms Microsoft Excel überprüft. Die Irrtumswahrscheinlichkeit betrug 5 % (Signifikanzniveau α=0,05). Ist der errechnete *P*-Wert der Analyse kleiner als das festgelegte Signifikanzniveau von 0,05 liegt statistische Signifikanz vor. Alle Mittelwerte und Standardabweichungen der ermittelten Daten wurden ebenfalls mit Hilfe von Microsoft Excel berechnet.

2.8. *Brassica napus* UV-B-Expositionsexperiment

Die Auswirkung von erhöhter UV-B-Strahlung auf die transgenen *Brassica napus*-Keimpflanzen, deren Sekundärstoffwechsel durch die Überexpression der Sinapinesterase (*BnSCE3*) verändert wurde, sollte mit Hilfe von Dr. Andreas Albert[23] in einem Sonnensimulator untersucht werden. In dieser Sonnensimulationskammer (Abbildung 4) können die Samen unter definierten Bedingungen (Licht, Temperatur und Luftfeuchte) und erhöhter UV-B-Strahlung auskeimen. Durch die Kombination verschiedener Lampen (Metallhalogenidlampen, Halogenlampen, blaue Leuchtstoffröhren und zusätzliche UV-B-Leuchtstofflampen) wird ein, der natürlichen Sonnenstrahlung nachempfundenes, Spektrum erzeugt. Dieses reicht vom ultravioletten (UV) bis zum infraroten (IR) Spektralbereich. Die überschüssige Infrarot- und Wärmestrahlung wird mit einem ca. 3 cm starken Wasserfilter entfernt. Entsprechend der stratosphärischen Ozonschicht kann die UV-B-Strahlung durch Verwendung von Glas- bzw. Kunststofffiltern angepasst oder auch vollständig ausgeschlossen werden. Die Kombination verschiedener Filter ermöglicht die Regulation der UV-B-Strahlung und die Simulation verschiedener Ozonschichtdichten (Döhring *et al.*, 1996, Thiel *et al.*, 1996). Die Anzucht der Pflanzen erfolgte bei einer Temperatur von 24°C, einer relativen Luftfeuchte von 70% und einer Lichtintensität von 670 µmol m^{-2} s^{-1} PAR für 14 Stunden (33,8 mol m^{-2} d^{-1} PAR). PAR (*photosynthetically active radiation*) definiert die photosynthetisch aktive Strahlung zwischen 400 und 700 nm, UV-A-Strahlung

[22] Interdisziplinäres Zentrum für Materialwissenschaften (IZM), Halle/Saale, Deutschland
[23] Abteilung Experimentelle Umweltsimulation am Institut für biochemische Pflanzenpathologie, Helmholtz Zentrum München, München, Deutschland

zwischen 315 und 400 nm und UV-B-Strahlung zwischen 280 und 315 nm. Unter Stressbedingungen betrug die UV-B-Strahlung 1,3 W m^{-2} für 12 Stunden (55,1 kJ m^{-2} d^{-1} UV-B). Die Kontrollpflanzen (-UV-B) wurden ebenfalls in der Sonnensimulationskammer unter gleichen Bedingungen, jedoch ohne UV-B-Strahlung, kultiviert. Ein Fensterglasfilter (Dicke: 8 mm) absorbierte die UV-B-Strahlung weitgehend. Die Samen wurden im jeweiligen Kammerbereich ausgekeimt. Das Pflanzenmaterial wurde vier, acht, elf und 16 Tage nach der Keimung geerntet, in die entsprechenden Pflanzenteile separiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.



Aufbau des Sonnensimulators:

a ... Beleuchtung oberhalb des Wasserfilters - Gemisch aus Metallhalogenid- , Halogen- und blauen Leuchtstofflampen

b ... Wasserfilter

c ... UV-fluoreszierende Lampen

d ... UV-Filter (z.B. Borsilikat- und Kalziumoxidglassfilter)

e ... Pflanzenanzucht unter Normalbedingungen

f ... Pflanzenanzucht unter UV-B-Stressbedingungen

Abbildung 4: Aufbau des verwendeten Sonnensimulators (Quelle: Kathleen Clauß).

Für die Analyse der metabolischen Veränderungen wurden die Samen und Keimblattpaare auf ihren Sinapin-, Sinapoylmalat- und Sinapoylglucosegehalt untersucht. Zu Beginn wurden zum Pflanzenmaterial (5 Samen bzw. 1 Keimblattpaar pro Probe) zur mechanischen Zerkleinerung Kugeln (Durchmesser 3 mm, Retsch, Haan) zugegeben. Anschließend wurden die gefrorenen Proben in der CryoMill MM 400 (Retsch) zu feinem Pulver zermahlen. Die Extraktion erfolgte durch die zweimalige Zugabe von 80% (v/v) MeOH. Aufgrund des unterschiedlichen Gewichts der Proben wurden die MeOH-Mengen an die Frischgewichte angepasst. Nach der MeOH-Zugabe wurden die Proben für 5 min im Ultraschallbad inkubiert. Im Anschluss an die Zentrifugation (11.000 x *g*, 5 min, RT) wurden die Überstände vereint und die Samen- sowie Keimblattextrakte chromatographisch mittels UPLC analysiert (2.5.3.). Für die Untersuchung und Quantifizierung der verschiedenen Flavonoide wurden alle detektierten Flavonoide chromatographisch mittels HPLC (2.5.3.) analysiert, die entweder als Quercetin- oder Kaempferolderivate identifiziert werden konnten und für

die Auswertung in diesen beiden Klassen zusammengefasst. Die Differenzierung von Quercetin- und Kaempferolderivaten erfolgte aufgrund ihrer UV-Spektren. In methanolischen Lösungen hat das UV-Spektrum von Quercetinderivaten ein erstes Absorptionsmaximum bei etwa 255 nm, mit einer charakteristischen Schulter bei etwa 269 nm. Diese Schulter tritt bei Kaempferolderivaten mit einem Absorptionsmaximum bei ca. 266 nm nicht auf (Markham, 1989). Die relativen Signalintensitäten wurden ermittelt und pro Samen bzw. Keimblattpaar normalisiert.

3. Ergebnisse

3.1. Identifizierung der Sinapinesterase aus *Brassica napus*

3.1.1. Proteinreinigung und Charakterisierung

Da zu Beginn dieser Arbeit bereits bekannt war, dass die höchste Enzymaktivität in zwei Tage alten Rapskeimlingen detektiert werden kann (Milkowski *et al.*, 2004), sollte die, in dieser Arbeit zu untersuchende, Sinapinesterase (SCE) aus Embryonen dieses Keimlingsstadiums isoliert werden. Dazu wurden die Samen der Winterrapssorte *Brassica napus* L. cv. Express auf feuchtem Filterpapier in einem Plastikgewächshaus ausgelegt und für zwei Tage kultiviert. Zur Reinigung der SCE wurde das Keimlingsmaterial gemörsert und einer Kombination verschiedener chromatographischer Reinigungsschritte zugeführt (2.3.1.), welche die Tabelle 5 zusammenfasst. Diese Arbeiten wurden mit Hilfe von Dr. Alfred Baumert[24] durchgeführt.

Tabelle 5: Reinigungsschema der Sinapinesterase aus *Brassica napus* (BnSCE)

Reinigungsschritt	Gesamtprotein (mg)	SCE-Aktivität (nkat)	Spez. SCE-Aktivität (nkat mg^{-1})	Anreicherung (Faktor)	Ausbeute (%)
BnSCE1/BnSCE2/BnSCE3					
Ammoniumsulfat	18.000	1.080	0,06	1,0	100
Phenylsepharose	8.400	773	0,09	1,5	72
Q-Sepharose					
BnSCE1	2.610	117	0,05	0,8	11
BnSCE2	823	123	0,15	2,5	11
BnSCE3	656	366	0,56	9,3	34
BnSCE3					
Sephadex G-75	91	295	3,2	54	27
Q-Sepharose	30	182	6,1	102	17
Phenylsepharose	3,0	103	34	566	10
Superdex G-75	1,8	86	48	800	8
Mono-Q	0,4	55	138	2.300	5

Die Reinigungsschritte erfolgten nach unterschiedlichen Techniken, zum Beispiel mit Hilfe des Ionenaustausches (Q-Sepharose, Mono Q) und des Größenausschlusses (Sephadex G-75, Superdex G-75), um das gesuchte Protein aufgrund seiner Eigenschaften von anderen Proteinen zu separieren. Die einzelnen Reinigungsfraktionen wurden nachfolgend auf ihre SCE-Aktivität getestet (2.3.5.). Die Fraktionen der höchsten Aktivität wurden vereinigt und weiteren Reinigungsschritten zugeführt. Bei der Trennung des Proteinextraktes mittels Phenylsepharose wurde der Extrakt durch die hydrophobe Interaktionschromatographie

[24] Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Abt. Sekundärstoffwechsel, Halle (Saale), Deutschland

(HIC) getrennt. Dabei wurden die Proteine aufgrund ihrer Hydrophobizität separiert, was zu einer 1,5-fachen Aufkonzentrierung der gewünschten Proteinfraktion führte. Im Anschluss wurde eine Q-Sepharose-Säule für die weitere Trennung verwendet. Bei dieser Anionenaustauschchromatographie (IAC) binden die negativ geladenen Proteine an die positiv geladene Säulenmatrix und werden durch einen ansteigenden NaCl-Gradienten eluiert. Das Elutionsprofil der Q-Sepharose-Säule ist in Abbildung 5 dargestellt.

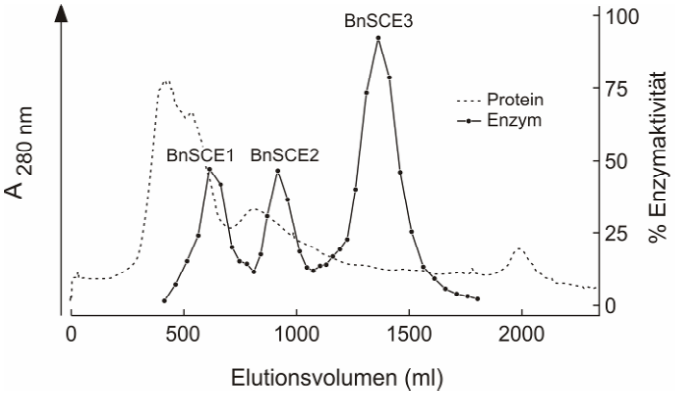


Abbildung 5: Das Elutionsprofil der Sinapinesterase (BnSCE) resultierte nach der Anionenaustausch-Chromatographie (IAC) mittels Q-Sepharose-Säule in der Trennung von drei Sinapinesterase-Aktivitäten, hier bezeichnet als BnSCE1, BnSCE2 und BnSCE3.

Da es sich bei der BnSCE-Fraktion 3 (BnSCE3) um jene mit der höchsten Aktivität bezüglich des eingesetzten Substrates Sinapin und gleichzeitig mit der geringsten Kontamination durch andere Proteine handelt, wurde diese Fraktion als erste bis zur Homogenität aufgereinigt. Die nachfolgenden Reinigungsschritte umfassten eine Größenausschlusschromatographie (SEC) mit Hilfe einer Sephadex G-75 Säule, eine weitere Anionenaustauschchromatographie (IAC) mittels Q-Sepharose, eine hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) mittels Phenylsepharose, eine Größenausschlusschromatographie (SEC) mit Hilfe einer Superdex G-75 Säule und eine abschließende Anionenaustauschchromatographie (IAC) durch eine Mono Q Säule. Diese Reinigungsprozedur resultierte in einer 2.300-fachen Anreicherung der BnSCE3, was zu einer Ausbeute von 400 µg BnSCE3-Protein führte (Tabelle 5).

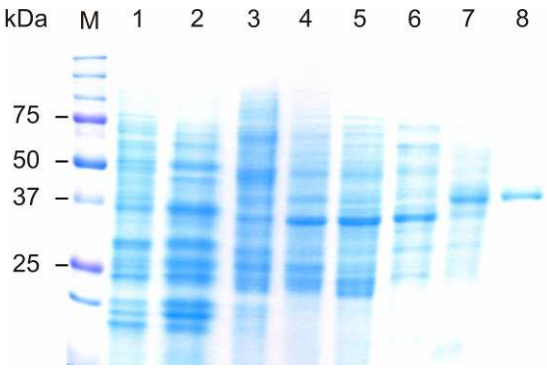


Abbildung 6: SDS-PAGE-Analyse der BnSCE3 Reinigungsfraktionen aus zwei Tage alten Rapskeimlingen. M. Precision Plus Protein™ Marker Dual Color, BIO-RAD; 1. Proteinrohextrakt; 2. Proteinfraktion nach Phenylsepharose FF 50/20; 3. Q-Sepharose 50/20; 4. Sephadex G-75 50/60; 5. Q-Sepharose 50/20; 6. Phenylsepharose 5/5; 7. Superdex G-75 16/60; 8. Mono Q; BnSCE3 ca. 44 bis 46 kDa

Die Abbildung 6 verdeutlicht den Fortschritt der Reinigung in Form eines SDS-Polyacrylamid-Gels (2.3.4.). Durch die denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE, 2.3.4.) wurde ebenso sichtbar, dass in der letzten Reinigungsfraktion zwei Proteinbanden angereichert wurden (eine deutlich sichtbare und eine sehr schwache). Die Größe dieser Proteinbanden liegt zwischen 44 und 46 kDa.

Die native Größenausschlusschromatographie (SEC) mittels einer Superose-Säule sollte Aufschluss über die Größe der Sinapinesterase geben und ebenso, ob diese als Monomer oder in einer anderen Form vorliegt. Dies setzt jedoch die Kalibrierung mit Proteinen bekannter Größe voraus. Für die Bestimmung des Molekulargewichtes wurde der LMW Gel Filtration Calibration Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) verwendet. Zur Standardisierung dienten die folgenden Proteine: Dextranblau 2.000 (2.000 kDa), Rinderserum Albumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Chymotrypsinogen A (25 kDa) und Ribonuclease A (13,7 kDa). Jedes Protein hat aufgrund seiner Größe ein spezifisches Elutionsvolumen (v_e). Mit diesem Elutionsvolumen, dem Ausschlussvolumen (v_0 - ermittelt durch das Elutionsvolumen von Dextranblau 2.000) und dem totalen Volumen der verwendeten Säule (v_t) lässt sich der für jedes Protein spezifische Verteilungskoeffizient (K_{av}) und somit das Molekulargewicht ermitteln.

Der K_{av}-Koeffizient lässt sich durch $\mathbf{K_{av} = (v_e - v_0) / (v_t - v_0)}$ berechnen. Die Kalibrierkurve ergibt sich durch die Auftragung der logarithmierten molekularen Massen der Kalibrierproteine gegen ihre jeweiligen K_{av}-Werte (Tabelle 6). Bei der gereinigten BnSCE3 handelt es sich demzufolge um ein monomeres Protein mit einer molekularen Masse von 47,2 kDa.

Tabelle 6: Gelfiltration der BnSCE3-Proteinfraktion zur Bestimmung des nativen Molekulargewichtes

Probe	Molekulargewicht (kDa)	Elutionsvolumen (ml)	K_{av}	Log Molekulargewicht
Rinderserum Albumin	67,0	13,3	0,29	1,83
Chymotrypsinogen A	25,0	16,1	0,49	1,40
Ovalbumin	43,0	14,1	0,35	1,63
Ribonuklease A	13,7	16,7	0,53	1,14
BnSCE3	47,2	14,1	0,35	1,67
Dextranblau 2000	2000	9,0	-	-
totales Volumen	-	23,6	-	-

Zur Aufklärung der Sequenzinformation der Sinapinesterase wurde die gereinigte Hauptbande der dritten Enzymfraktion (BnSCE3 - Spur 8; Abbildung 6) aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und lyophilisiert. Das Protein wurde dann in der Arbeitsgruppe von Dr. Manfred Nimtz in Braunschweig dem Trypsinverdau zugeführt und die Fragmente mit Hilfe der

Massenspektrometrie analysiert (Clauss *et al.*, 2008). Auf diese Weise war es möglich, fünf Peptidsequenzen der gereinigten BnSCE3 zu identifizieren (QILPTLCASSSR, GGNDY-NYPFFEDK, AISDAIVDLIDLGGK, NYADYYNSLYR, LYQEPTKYGFK). Die unterstrichenen Sequenzabschnitte der Peptide bildeten die Voraussetzung für die Ableitung degenerierter Primer und damit für die folgenden Klonierungsarbeiten.

3.1.2. Klonierung der cDNA und Sequenzanalyse

Ausgehend von der Peptidsequenz NYADYYN wurden die Primer SCE1-1F bis -8F, vom Peptidbereich GNDYNYP die Primer SCE2-1F bis -4F und vom Peptid YQEPTKYG die degenerierten Primer SCE4-1F bis -8F abgeleitet (Tabelle A1). Als Ausgangsmaterial der nachfolgend durchgeführten RT-PCRs (*reverse transcription-polymerase chain reaction*, 2.4.4.) diente extrahierte RNA aus zwei Tage alten *Brassica napus*-Keimlingen (2.3.8.). Die PCR-Reaktionen mit jeweils einem der 20 degenerierten Primern und einem abgewandelten Oligo(dT)-Primer (RT-Homerace) führten letztlich zur Amplifikation eines 471 bp großen cDNA-Fragmentes der *BnSCE3*, welches den 3´-Bereich eines offenen Leserahmens umfasste. Dieses Amplikon wurde mit den Primern SCE4-3F und RT-Homerace aufgehend vom Peptid YQEPTKYG generiert. Der fehlende 5´-Bereich dieser Sequenz wurde durch eine 5´-RACE-PCR (5´ *rapid amplification of c-DNA ends-poly chain reaction*, 2.4.6.) mit poly(A^+) RNA (2.3.8.), welche ebenfalls aus zwei Tage alten Rapskeimlingen extrahiert wurde, ermittelt. Dadurch konnte die vollständige cDNA-Sequenz der *BnSCE3*, mit einem 1.170 bp umfassenden offenen Leserahmen, identifiziert und mit den Primern BnSCEall_F und BnSCEall_R (Tabelle A1) amplifiziert werden. Der kodierende Bereich resultiert in einem Protein mit 389 Aminosäuren. Die Proteinsequenz wurde mit den zu Beginn der Arbeit identifizierten Peptidsequenzen verglichen. Alle fünf Peptide fanden sich in der abgeleiteten Proteinsequenz wieder (Abbildung 7).

Die molekulare Masse der BnSCE3 konnte ebenfalls *in silico* kalkuliert werden (Clone Manager Suite, Sci Ed Software, Durham, USA). Sie beträgt 43,3 kDA und stimmt näherungsweise mit der Größe der gereinigten Proteinbande überein. Der Sequenzvergleich mit Hilfe des Programms tblastn[25] der Internetplattform NCBI identifizierte die BnSCE3 als bereits beschriebene GDSL-ähnliche Lipase 2 (BnLIP2; Accession Nr. AY871275), basierend auf einer Sequenzidentität von 97% auf Aminosäureebene.

[25] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/

Abbildung 7: Abgeleitete Proteinsequenz der gereinigten *Brassica napus*-Sinapinesterase (BnSCE3) mit den identifizierten Peptidfragmenten (bei 100% Sequenzübereinstimmung wurden diese Bereiche in blau und unterstrichen dargestellt), der Signalsequenz (doppelt blau unterstrichen), dem für diese Proteinfamilie typischen GDSL-Motiv (gerahmt), fünf putativen *N*-Glykosidierungsstellen (schwarz unterstrichen) und der putativen katalytischen Triade (markiert mit roten Dreiecken).

Die cDNA der GDSL-ähnlichen Lipase wurde von Ling und Mitarbeitern aus keimenden *Brassica napus*-Samen isoliert und als BnLIP2 bezeichnet und versehentlich unter der Bezeichnung BnLIP1 publiziert (Ling *et al.*, 2006). Die Bezeichnung GDSL-ähnliche Lipase beruhte lediglich auf Sequenzidentitäten zu beschriebenen GDSL-Lipasen ohne experimentelle Beweise. *In silico*-Analysen der abgeleiteten Aminosäuresequenz der BnSCE3 gaben Aufschluss über die Proteindomänenarchitektur und die Proteinfamilie des Enzyms (Pfam[26]). Die Proteinsequenz enthält eine konservierte Domäne (Aminosäure 39 bis 361), die typisch für die Familie der GDSL-Lipasen ist. Das namensgebende GDSL/I-Motiv befindet sich im Bereich der Sequenzpositionen 39 bis 42. Die Analyse der *N*-terminalen Sequenz mit Hilfe des Programms TargetP 1.1[27] (Emanuelsson *et al.*, 2000) zeigte, dass der *N*-terminale Bereich eine Signalsequenz von 25 Aminosäureresten beinhaltet, die das Protein mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,983 (>0,800 ≡ hohe Wahrscheinlichkeit) dem sekretorischen Weg zuführt (Abbildung 7).

Das aktive Zentrum der GDSL-Lipasen wird von der katalytischen Triade, bestehend aus dem Serinrest des GDSL-Motives, einem Asparaginsäurerest und einem Histidinrest, gebildet (Molgaard *et al.*, 2000). Für die BnSCE3 würde sich, abgeleitet aus Sequenzvergleichen stark konservierter Bereiche, eine mögliche katalytische Triade demzufolge aus den Aminosäuren Ser41, Asp345 und His348 zusammensetzen.

[26] http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/
[27] http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/

3.1.3. Funktionelle Expression in *Nicotiana benthamiana*

Um zu bestätigen, dass mit der identifizierten BnSCE3 die gesuchte Sinapinesterase isoliert wurde, sollte das Protein exprimiert und einem Aktivitätstest mit dem Substrat Sinapin unterzogen werden. Da mittels heterologer Expression in *Escherichia coli* kein aktives Protein isoliert werden konnte, sollte die Expression der als *Brassica napus*-Sinapinesterase identifizierten BnSCE3 in einem pflanzlichen System erfolgen. Hierfür wurde das Expressionssystem *Nicotiana benthamiana* ausgewählt. Bei einer Expression im pflanzlichen System ist die Wahrscheinlichkeit wesentlich höher, dass das Protein in korrekter Weise posttranslational modifiziert wird. Die transiente Expression durch den *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer in *Nicotiana benthamiana*-Blätter (2.4.8.) ermöglichte eine schnelle Überprüfung der Funktionalität des exprimierten Proteins. Nach einer Kultivierung der Pflanzen über fünf Tage im Gewächshaus konnten die transformierten Blattbereiche entfernt und die Proteine isoliert werden (2.3.1.). Der Enzymaktivitätstest erfolgte durch die Inkubation der jeweiligen Proteinrohextrakte der BnSCE3- und der Vektorkontroll-Proben mit dem Substrat Sinapin (2.3.5.). Wie die Abbildung 8 deutlich zeigt, war es möglich, die Sinapinesterase aus *Brassica napus* (BnSCE3) in den Blättern von *Nicotiana benthamiana* funktionell zu exprimieren.

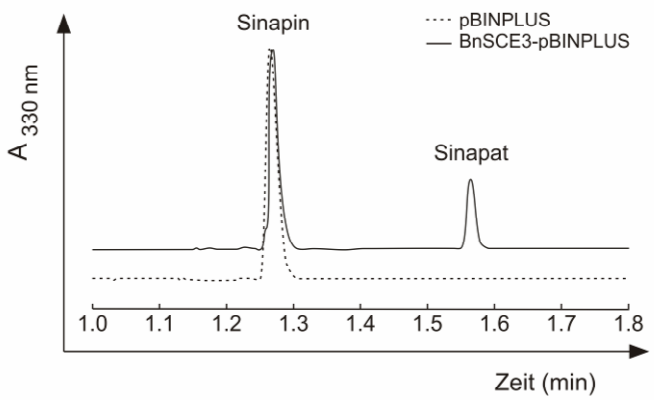


Abbildung 8: Aktivitätsnachweis der rekombinanten Sinapinesterase. HPLC-Chromatogramm des Sinapinesterase-Assays, der mit Proteinrohextrakten der transformierten *Nicotiana benthamiana*-Blätter (Konstrukte: BnSCE3-pBINPLUS und pBINPLUS als Kontrolle) und dem Substrat Sinapin durchgeführt wurde.

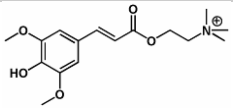
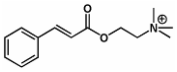
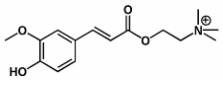
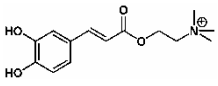
Für den getesteten BnSCE3-Rohextrakt ist ein deutlicher Umsatz des Substrates Sinapin zu Sinapat (Sinapinsäure) zu erkennen (BnSCE3-pBINPLUS). Im Fall des Kontrollrohextraktes (pBINPLUS, 2.1.3.) erfolgte keine Sinapinhydrolyse (pBINPLUS). Die spezifische katalytische Aktivität des BnSCE3-Proteinrohextraktes betrug 4,9 nkat mg^{-1} Protein.

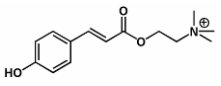
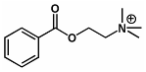
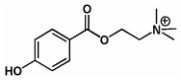
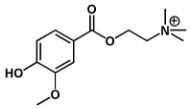
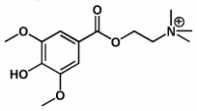
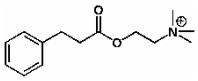
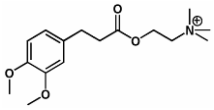
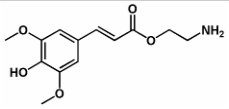
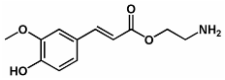
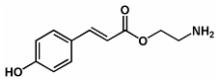
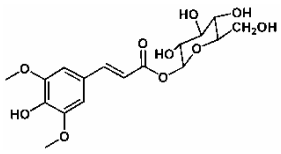
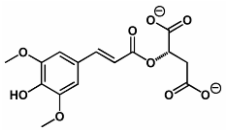
3.2. Biochemische Charakterisierung der BnSCE3

3.2.1. Substratspezifität

Mitglieder der Enzymfamilie der GDSL-Lipasen verfügen im Allgemeinen über ein sehr breites Substratspektrum (Akoh *et al.*, 2004). Ob das im Fall der als GDSL-Lipasen identifizierten Sinapinesterasefraktionen BnSCE1, BnSCE2 und BnSCE3 ebenfalls zutrifft, sollte der Test der katalytischen Aktivität gegenüber 16 phenolischen Verbindungen zeigen. Begründet durch die hohe Sequenzähnlichkeit der Sinapinesterase zu Enzymen der Klasse der GDSL-Lipasen schloss sich ein Aktivitätstest der Hauptfraktion BnSCE3 und der gereinigten Nebenfraktionen BnSCE1 und BnSCE2 mit verschiedenen Lipiden an. Diese Untersuchungen erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Georg Hölzl und Dr. Peter Dörmann am Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie in Potsdam-Golm. Zu Beginn wurden die in Tabelle 7 aufgeführten phenolischen Verbindungen in einem Enzymassay (2.3.5.) getestet. Durch die Untersuchung der Substratspezifität gegenüber Verbindungen, die in wichtigen Charakteristika, wie der Kettenlänge, dem Vorhandensein von Doppelbindungen in der Seitenkette, den Substituenten am aromatischen Ring und der Wahl des Restes am Ende der Seitenkette, Unterschiede zeigten (Abbildung 38), sollten erste Aussagen über den Reaktionsmechanismus der BnSCE abgeleitet werden. Die Tabelle 7 stellt die Ergebnisse der Untersuchung der drei Sinapinesterasefraktionen bezogen auf die eingesetzten Substrate dar.

Tabelle 7: Substratspezifität der BnSCE3 gegenüber verschiedenen phenolischen Cholinestern und weiteren Verbindungen. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Aktivitäten (%) von drei Assays mit den jeweiligen Standardabweichungen. 100% entsprechen 0,3 nkat mg^{-1} Protein für BnSCE1, 0,8 nkat mg^{-1} Protein für BnSCE2 und 139 nkat mg^{-1} Protein für BnSCE3. ND bedeutet, dass kein Reaktionsprodukt detektiert werden konnte.

Substrat	Struktur	relative Aktivität (%)		
		BnSCE1	BnSCE2	BnSCE3
(Hydoxy)cinnamoylcholine				
Sinapin (Sinapoylcholin)		100 ± 28,4	100 ± 13,3	100 ± 2,3
Cinnamoylcholin		15 ± 0,6	12 ± 0,3	51 ± 2,0
Feruloylcholin		59 ± 15	40 ± 5,4	37 ± 0,9
Caffeoylcholin		33 ± 3,0	22 ± 1,8	25 ± 0,7

4-Cumaroylcholin		34 ± 3,0	22 ± 1,1	20 ± 2,1
(Hydoxy)benzoylcholine				
Benzoylcholin		2,8 ± 0,04	2,0 ± 0,2	18 ± 0,5
4-Hydroxybenzoylcholin		0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,01	4,0 ± 0,4
Vanilloylcholin		ND	ND	1,0 ± 0,2
Syringoylcholin		ND	ND	ND
Phenylpropionylcholine				
3-Phenylpropionylcholin		300 ± 6,0	337 ± 46	2.398 ± 515
3-(3´,4´-Dimethoxy-phenyl)-propionylcholin		78 ± 12	189 ± 2,0	1.422 ± 255
Hydroxycinnamoylethanolamine				
Sinapoylethanolamin		7 ± 0,01	14 ± 0,3	15 ± 0,4
Feruloylethanolamin		13 ± 0,4	10 ± 0,1	12 ± 0,6
4-Cumaroylethanolamin		3 ± 0,2	2,6 ± 0,3	7 ± 0,8
andere Sinapoylkonjugate				
Sinapoylglucose		ND	ND	ND
Sinapoylmalat		ND	ND	ND

Das Vorhandensein des Cholinrestes und die Länge der Seitenkette scheinen grundlegende strukturelle Eigenschaften des Substrates zu sein, die für die Spezifität der BnSCE wichtig sind. Die Anzahl und Beschaffenheit der Substituenten am aromatischen Ring und die vorhandene Doppelbindung (C=C) der Seitenkette scheinen im Gegensatz dazu keine eindeutige Rolle zu spielen.

Die Untersuchung der unterschiedlich konzentrierten Enzymfraktionen bezüglich lipolytischer Aktivität erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie (DC, 2.5.2., Abbildung 9). Getestet wurden Phosphatidylcholin (PC) und Triacylglycerin (TAG). Die vollständig aufgereinigte Hauptfraktion BnSCE3 zeigte die stärkste Aktivität gegenüber dem Substrat PC, das entstandene Produkt Ölsäure ist in diesem Fall deutlich zu erkennen. Bei den beiden parziell aufgereinigten Fraktionen BnSCE1 und BnSCE2 konnte ein schwaches Ölsäure-Signal detektiert werden, ebenso bei der als Positivkontrolle eingesetzten Lipase aus *Chromobacterium viscosum* (Sigma-Aldrich, Hamburg, L-0763).

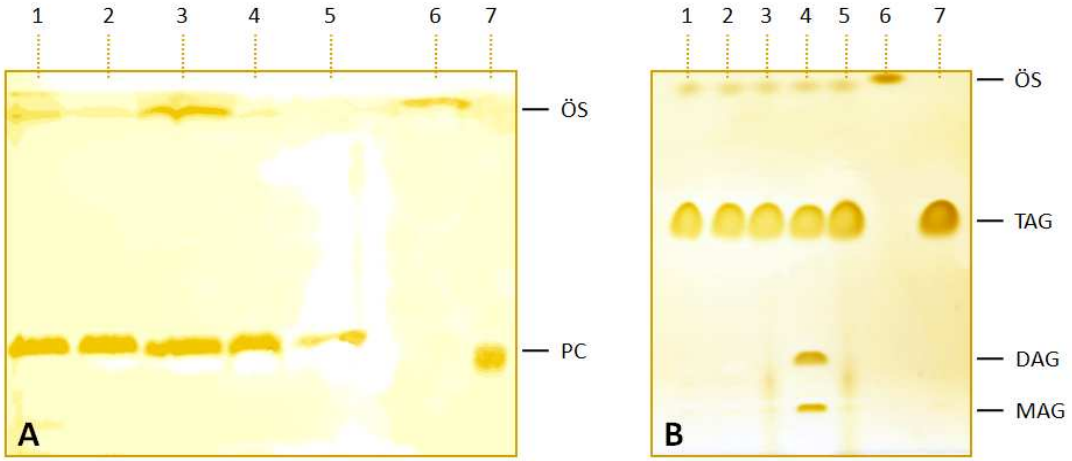


Abbildung 9: Dünnschichtchromatographie (DC) in Hexan/Diethylether/Essigsäure der Phosphatidylcholinassays **(A)** und in Chloroform/Methanol/Ammoniumhydroxid (32%) der Triacylglycerinassays **(B)** mit Proteinextrakten der Enzymfraktionen BnSCE1 (184 µg; 0,3 nkat mg^{-1} Protein), BnSCE2 (95 µg; 0,8 nkat mg^{-1} Protein) und der vollständig gereinigten Fraktion BnSCE3 (1 µg; 139 nkat mg^{-1} Protein). Nummerierung der Abbildungen A und B: 1 - BnSCE1, 2 - BnSCE2, 3 - BnSCE3, 4 - Lipasekontrolle, 5 - Wasserkontrolle, 6 und 7 jeweilige Standards. Die aufgetragenen Standards sind Ölsäure (ÖS) und Phosphaditylcholin (PC) für Abbildung A und Ölsäure (ÖS), Triacylglycerin (TAG) für Abbildung B. Die Abkürzungen DAG und MAG stehen für Diacylglycerin und Monoacylglycerin.

Bei der Wasserkontrolle zeigte sich wie erwartet kein Produktsignal (Abbildung 9A). Desweiteren sollte die BnSCE-Aktivität bezüglich eines Neutralfettes getestet werden. Dazu wurde den Enzymfraktionen das Substrat TAG angeboten. Ein eindeutiger Umsatz des Substrates in Monoacylglycerin (MAG), Diacylglycerin (DAG) und Ölsäure (ÖS) ist lediglich im Fall der kommerziell erworbenen Lipase zu beobachten. Für die anderen Reaktionen einschließlich der Wasserkontrolle ist zwar eine schwache Ölsäureband zu erkennen, jedoch keine der ebenfalls zu erwartenden Produktbanden (MAG, DAG, Abbildung 9B). Somit kann geschlussfolgert werden, dass die BnSCE3 sowie die Fraktionen BnSCE1 und BnSCE2 Phospholipaseaktivität besitzen, jedoch nicht in der Lage sind, Triacylglycerin als Vertreter der Neutralfette zu hydrolysieren.

3.2.2. Kinetische Untersuchungen

Die Substratspezifität der getesteten Verbindungen (3.2.1., Tabelle 7) ergab relative Aktivitätswerte. Im Fall der Verbindung 3-Phenylpropionylcholin lagen diese überraschend hoch (2.398%, Tabelle 7). Das ebenfalls untersuchte Substrat Cinnamoylcholin gleicht 3-Phenylpropionylcholin bis auf die Doppelbindung in der Seitenkette. Hier lag die relative Aktivität der BnSCE3 im Vergleich zu Sinapin jedoch nur bei 51% (Tabelle 7). Die Untersuchung dieses Ergebnisses erfolgte durch die Ermittlung der kinetischen Konstanten dieser Reaktionen (2.3.7.). Da zu diesem Zeitpunkt nur die Hauptaktivität BnSCE3 homogen vorlag, fanden alle nachfolgenden Untersuchungen ausschließlich mit dieser Enzymfraktion statt. Die Produktbildung wurde mittels UPLC (2.5.3.) analysiert. Die Ergebnisse der kinetischen Untersuchungen fasst Tabelle 8 zusammen.

Tabelle 8: Ermittelte kinetische Konstanten K_m und V_{max} der BnSCE3 für ausgewählte Substrate der Spezifitätsuntersuchungen (Tabelle 7). Die Effizienz für Sinapin wurde auf 100% gesetzt.

Substrate	K_m (µM)	V_{max} (nkat mg^{-1})	V_{max}/K_m (nkat mg^{-1} µM^{-1})	Effizienz (%)
Sinapin (Sinapoylcholin)	2,6 ± 0,9	66 ± 3,3	25,4	100
Cinnamoylcholin	11 ± 0,9	59 ± 1,4	5,4	21
3-Phenylpropionylcholin	101 ± 14	2.525 ± 124	25,0	98

Die Daten zeigen, dass die hohe relative Aktivität der BnSCE3 bezogen auf 3-Phenylpropionylcholin aus der hohen Maximalgeschwindigkeit (V_{max}) von 2.525 nkat mg^{-1} resultiert, die damit ca. 40-mal höher im Vergleich zum putativen Hauptsubstrat Sinapin ist. Jedoch ist die Affinität (K_m) der BnSCE3 für Sinapin 40-mal höher als für das 3-Phenylpropionylkonjugat und 4-mal höher als beim Substrat Cinnamoylcholin. Somit ist die katalytische Effizienz der BnSCE3 für das physiologische Substrat Sinapin am größten, obwohl der Unterschied in der Effizienz von 3-Phenylpropionylcholin im Vergleich zu Sinapin nur marginal ist.

3.2.3. Inhibitionsversuche

Aus den bisherigen Untersuchungen zur Enzymklasse der GDSL-Lipasen (Ling, 2008; Akoh *et al.*, 2004; Brick *et al.*, 1995) geht hervor, dass das im namensgebenen GDSL-Motiv enthaltende Serin und die Aminosäuren Histidin und Aspartat an der Bildung des katalytischen Zentrums beteiligt sind. Die Bedeutung des Serinrestes für die katalytische Aktivität der als GDSL-Lipase identifizierten BnSCE3 sollte mit Hilfe eines Hemmversuches mit dem Inhibitor Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) gezeigt werden (2.3.6.). PMSF bindet

kovalent an katalytische Serine, inhibiert diese irreversibel und beeinträchtigt dadurch die Funktionalität serinabhängiger katalytischer Zentren. Die Inhibition eines GDSL-Proteins durch PMSF konnte bereits von Teissére *et al.* (1995) gezeigt werden. Die Behandlung der BnSCE3 mit dem gewählten Inhibitor führt zu einem signifikanten Aktivitätsverlust (Abbildung 10). Bei einer Konzentration von 10 mM PMSF sinkt die Enzymaktivität um nahezu 40%. Die Aminosäure Serin ist für die Funktionalität des Enzyms von Bedeutung und besitzt somit eine wichtige Rolle im katalytischen Zentrum der BnSCE3.

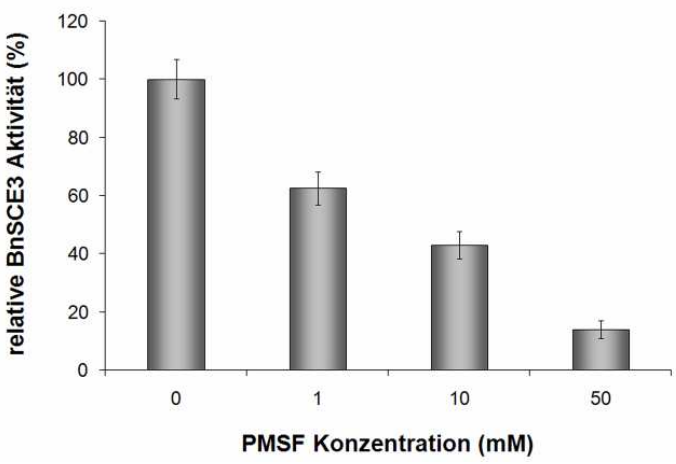


Abbildung 10: Inhibition der Sinapinesteraseaktivität (BnSCE3) durch die Zugabe des Serininhibitors Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF). Dargestellt ist die durchschnittliche relative Enzymaktivität (n=3).

3.3. Regulation der *BnSCE3*-Expression

3.3.1. Transkriptabundanz während der Keimlingsentwicklung

Die Transkriptakkumulation der *BnSCE3* während der Keimlingsentwicklung wurde mittels semiquantitativer RT-PCR (2.4.5.) untersucht. Dazu erfolgte die Extraktion der Gesamt-RNA aus trockenen *Brassica napus*-Wildtypsamen und verschiedenen Keimlingsstadien (2.3.8.). Zur Amplifikation der *BnSCE3* wurden die Primer Lip2RT_for und Lip2RT_rev und im Fall der Positivkontrolle *Ubiquitin* das Oligonukleotidpaar ubi_for und ubi_rev eingesetzt (2.4.4., Tabelle A1).

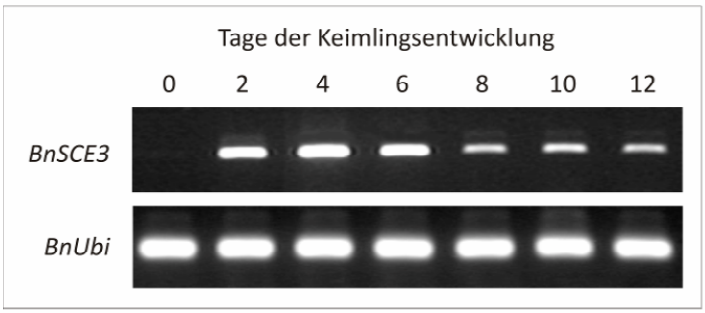


Abbildung 11: Nachweis der *BnSCE3*-Transkriptmenge in trockenen *Brassica napus*-Samen und unterschiedlichen Keimlingsstadien (zwei bis 12 Tage) durch semiquantitative RT-PCR. Als Positivkontrolle wurde das konstitutiv exprimierte Kontrollgen *Ubiquitin* (*BnUbi*) verwendet.

Wie zu erkennen ist, konnte im trockenen Samen kaum *BnSCE3*-Transkript detektiert werden (Abbildung 11). In den folgenden Keimlingsstadien stieg der Transkriptgehalt sprunghaft an. Er erreichte in der vier Tage alten Keimlingsprobe sein Maximum und fiel danach deutlich ab. In den untersuchten acht, zehn und 12 Tage alten Keimlingen blieb der Transkriptgehalt auf einem gut detektierbaren, aber geringen Niveau.

3.4. Identifizierung *BnSCE3*-homologer Gene in *Arabidopsis thaliana*

3.4.1. Klonierung und heterologe Expression

Um das homologe Gen der *BnSCE3* in *Arabidopsis thaliana* zu identifizieren, wurde sowohl die vollständige cDNA-Sequenz, als auch die abgeleitete Proteinsequenz einem Sequenzvergleich in der Internetdatenbank NCBI[28] unterzogen. In *Arabidopsis thaliana* konnten vier putative GDSL-Lipasen identifiziert werden, die eine hohe Sequenzidentität zur BnSCE3 von 77 bis 81% (auf Aminosäureebene) aufwiesen. Die Gensequenzen dieser vier homologen putativen Lipasen (*At1g28640*, *At1g28650*, *At1g28660*, *At1g28670*) liegen in Tandem-Orientierung auf dem Chromosom 1 vor.

Um zu untersuchen, ob eine der ausgewählten putativen *Arabidopsis thaliana*-GDSL-Lipasen ein homologes Gen zur identifizierten *BnSCE3* darstellt, sollten die vier putativen Lipasen exprimiert (2.4.8.) und einem Aktivitätstest mit dem Substrat Sinapin (2.3.5.) unterzogen werden. Dies erfolgte durch die Amplifikation der vollständigen Sequenzen der vier putativen Lipasen mit den jeweiligen Primerpaaren (Tabelle A1, siehe 2.4.8.) und den darauf aufbauenden Klonierungsarbeiten wie in Kapitel 2.4.8. beschrieben.

Als Expressionssystem diente ebenfalls *Nicotiana benthamiana* (2.1.2.). Für den Test der Enzymaktivität wurde der extrahierte Proteinrohextrakt (2.3.1.) der vier putativen GDSL-Lipasen- und der der Vektorkontroll-Probe (pBINPLUS, 2.1.3.) mit dem Substrat der SCE (Sinapin) inkubiert (2.3.5.).

Im Fall der putativen Lipase At1g28640 konnte unter den getesteten Versuchsbedingungen keine Aktivität des Enzyms gegenüber dem Substrat Sinapin detektiert werden. Für die anderen drei exprimierten Proteine konnte eindeutig gezeigt werden, dass sie Sinapin hydrolysieren (Abbildung 12) und somit mögliche homologe Gene zur identifizierten *BnSCE3* sein könnten.

[28] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/

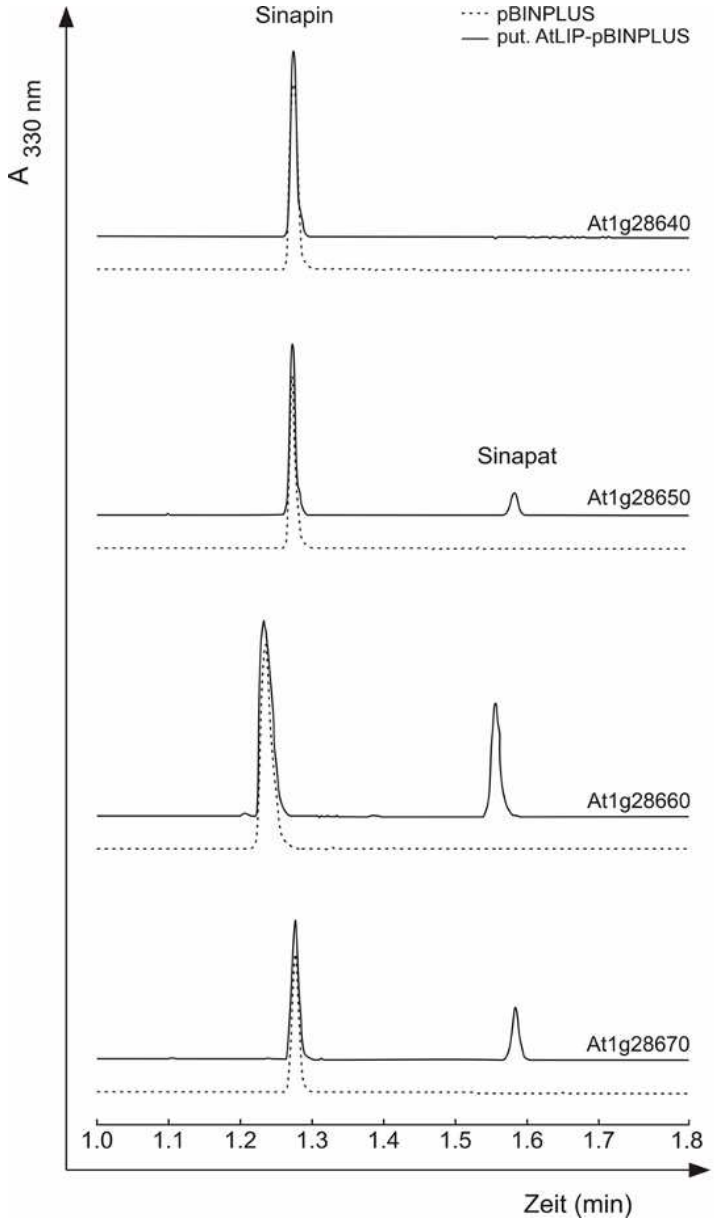


Abbildung 12: Aktivitätsnachweis der rekombinanten putativen *Arabidopsis thaliana*-GDSL-Lipasen. HPLC-Chromatogramme des Sinapinesterase-Assays, die mit Proteinrohextrakten der transformierten *Nicotiana benthamiana*-Blättern (Konstrukte: *At1g28640*-pBINPLUS, *At1g28650*-pBINPLUS, *At1g28660*-pBINPLUS, *At1g28670*-pBINPLUS [put. AtLIP-pBINPLUS] und pBIN-PLUS als Kontrolle [pBINPLUS]) und dem Substrat Sinapin durchgeführt wurden.

3.4.2. Analyse der Transkriptabundanzen

Zu Beginn sollte die Transkriptakkumulation der vier ausgewählten putativen *Arabidopsis thaliana*-GDSL-Lipasen mit der von *BnSCE3* verglichen werden. Dazu wurde der Transkriptgehalt in drei Keimlingsstadien (ein bis drei Tage alte *Arabidopsis thaliana*-Keimlinge, 1d-3d) und in einer adulten *Arabidopsis thaliana*-Blattprobe mittels RT-PCR (2.3.8., 2.4.5.) untersucht (Abbildung 13). Für die Amplifikation der Transkripte wurden die folgenden Oligonukleotide verwendet: NM631spez_F und NM631spez_R (At1g28640), NM632spez_F und NM632-spez_R (At1g28650), NM633spez_F und NM633spez_R (At1g28660), NM634spez_F und NM634spez_R (At1g28670) und im Fall der Positivkontrolle *Ubiquitin* das Oligonukleotidpaar ubi_RT_fw und ubi_RT_rev (Tabelle A1). Der Transkriptgehalt des Gens *At1g28640* war gering und unter den gewählten Bedingungen

ausschließlich im ersten Keimlingsstadium (ein Tag alt) nachzuweisen. Die Transkripte der anderen drei putativen Lipasen (*At1g28650*, *At1g28660*, *At1g28670*) waren in allen drei untersuchten Keimlingsstadien (ein bis drei Tage alt) deutlich zu detektieren und im Fall der *At1g28670* konnten Transkripte auch in der Blattprobe nachgewiesen werden.

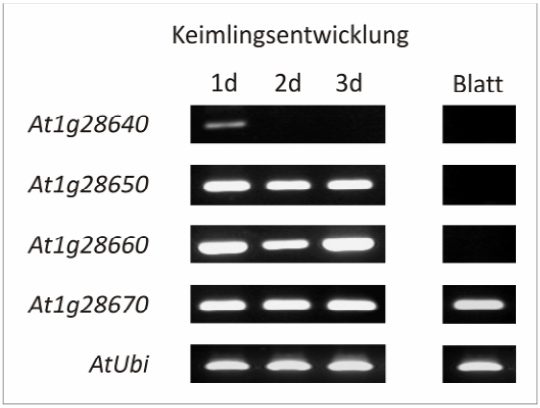


Abbildung 13: Nachweis der Transkriptmenge der vier putativen *Arabidopsis thaliana*-GDSL-Lipasen (*At1g28640*, *At1g28650*, *At1g28660*, *At1g28670*) im frühen Keimlingsstadium (ein bis drei Tage alt, 1d-3d) und im adulten Blatt mittels semiquantitativer RT-PCR. Als Positivkontrolle wurde das konstitutiv exprimierte Kontrollgen *Ubiquitin* (*AtUbi*) verwendet.

3.4.3. Untersuchung homozygoter T-DNA-Insertionslinien

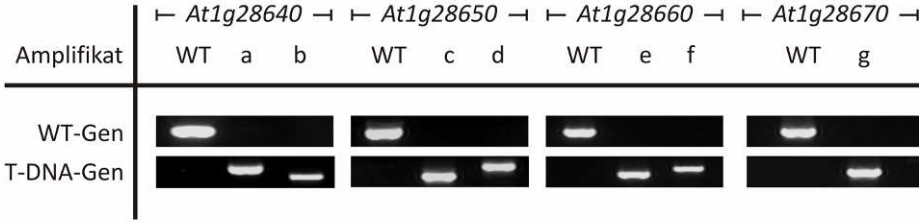
Eine Möglichkeit, die Funktion eines Gens zu untersuchen, ist dessen Ausschalten im Organismus. Die resultierenden Veränderungen im Phänotyp und im Stoffwechsel der transgenen Pflanze lassen dabei Rückschlüsse auf eine mögliche Funktion und Bedeutung des Gens für den Organismus zu. Für die vier ausgewählten putativen GDSL-Lipasen standen verschiedene Insertionsmutanten vom Salk Institute for Biological Studies[29] zur Verfügung. Mit Hilfe dieser Mutanten sollte untersucht werden, inwiefern sich der Verlust des jeweiligen Gens auf den Sinapingehalt während der Keimung auswirkt und ob eine der vier putativen GDSL-Lipasen aus *Arabidopsis thaliana* als homologes Gen der *BnSCE3* identifiziert werden kann. Eine wichtige Voraussetzung dieses Experimentes ist die Generierung von *Knockout*-Pflanzen, die im Bezug auf das ausgeschaltete Gen homozygot sind (Alonso *et al.*, 2003). Zu Beginn mussten die Pflanzen auf die korrekte Insertion der T-DNA untersucht werden (2.4.10.). Die T-DNA-Insertionslinien (A), die Ergebnisse ihrer Genotypisierung (B) und die Bestimmung der Insertionsorte (C) sind in Abbildung 14 dargestellt. Die Tatsache, dass der Sinapingehalt im Verlauf der frühen Keimungsphase in Wildtyppflanzen stark abnimmt (1.2.3., Abbildung 2), diente als zu untersuchendes Kriterium, welches in den T-DNA-Insertionsmutanten. Wenn ein homologes Gen der *BnSCE3* durch einen T-DNA-*Knockout* inaktiviert wird, sollte der Sinapingehalt im Verlauf der Keimung nicht abnehmen.

[29] Salk Institute for Biological Studies, San Diego, Kalifornien, USA; http://signal.salk.edu/

A

put. GDSL-Lipase	#	T-DNA-Insertionslinie	NASC ID	Insertionsort
At1g28640	a	SALK_111635.43.50.x	N660558	5′ UTR
	b	SALK_126472.31.85.x	N626472	Exon 4
At1g28650	c	SALK_118915.41.60.x	N618915	Exon 2
	d	SALK_010911	N660302	Exon 5
At1g28660	e	SALK_080571.32.10.x	N580571	Exon 4
	f	SALK_041461.39.60.x	N658204	Exon 5
At1g28670	g	SALK_137816.33.60.x	N637816	5′ UTR

B



C

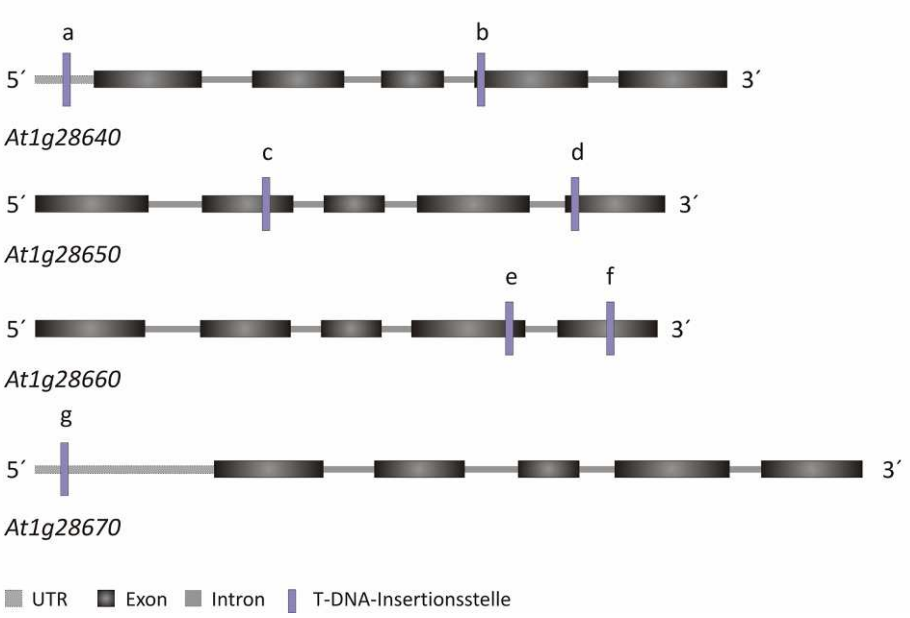


Abbildung 14: Übersicht der untersuchten T-DNA-Insertionsmutanten. Tabellarische Übersicht der generierten homozygoten T-DNA-Linien der vier ausgewählten putativen *Arabidopsis thaliana*-GDSL-Lipasen mit der jeweiligen SALK-Identifizierungsnummer und dem bestimmten Insertionsort der T-DNA (Teilabbildung **A**). Teilabbildung **B** visualisiert die Ergebnisse der in Abbildung 3 schematisch dargestellten Identifizierung homozygoter T-DNA-Linien mittels PCR mit den verwendeten Primern: LP1 - genspezifischer Primer 1, RP1 - genspezifischer Primer 1 und LBa1 - T-DNA-spezifischer Primer (Tabelle A1). Die maßstabsgerechte Illustration der genomischen Gensequenzen der vier putativen GDSL-Lipasen mit den jeweiligen identifizierten Insertionsorten der T-DNAs ist in Teilabbildung **C** dargestellt.

Die Quantifizierung der Sinapingehalte in den Extrakten der Keimpflanzen (2.5.1.) erfolgte auf Grundlage chromatographischer Analysen (2.5.3.). Die Abbildung 15 zeigt den prozentualen Sinapinverlust während der Keimung. Im *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp beträgt die Sinapinreduktion im frühen Keimungsverlauf 98%. Bei allen getesteten *Knockout*-Linien beträgt der prozentuale Verlust durchschnittlich nur 74%. Somit wirkt sich der Verlust jeder einzelnen putativen GDSL-Lipase aus *Arabidopsis thaliana* in ähnlicher Art und Weise nur schwach auf den Sinapinabbau während der Keimung aus. Die Schlussfolgerung ist, dass die vier untersuchten Gene *At1g28640*, *At1g28650*, *At1g28660*, *At1g28670* vermutlich als Isoenzyme gemeinsam für die Sinapinesterasefunktion in *Arabidopsis thaliana* fungieren.

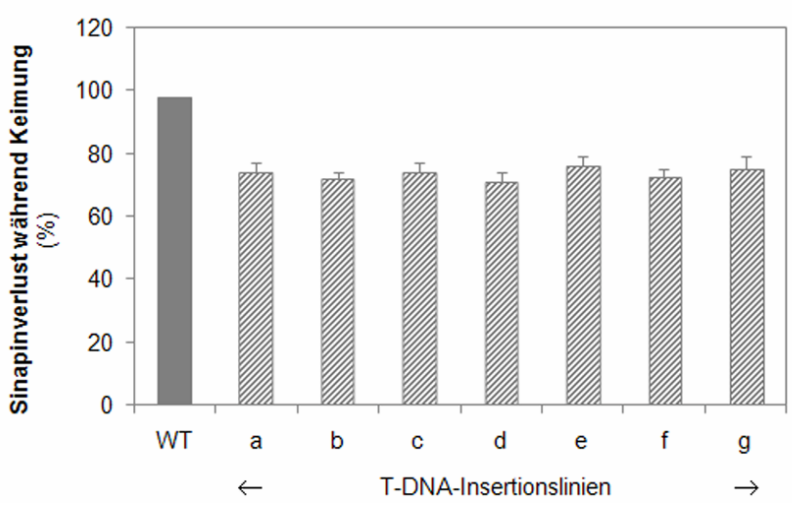


Abbildung 15: Prozentualer Verlust des Sinapins während der frühen Keimungsphase (Tag 1 bis 3) in *Arabidopsis thaliana*-Keimpflanzen des Wildtyps (WT) und der zu untersuchenden T-DNA-Insertionsmutanten (*At1g28640*: a, b; *At1g28-650*: c, d; *At1g28660*: e, f; *At1g28670*: g). Ausführliche Übersicht der T-DNA-Insertionsmutanten siehe Abbildung 14A. Es wurden von je fünf Pflanzen drei biologische Replikate analysiert.

3.5. Expression der *BnSCE3* zur Absenkung des Sinapingehaltes

Die vorliegende Arbeit sollte unter anderem die Frage beantworten, ob die identifizierte *BnSCE3* als Zielgen für die Absenkung des Sinapingehaltes in den Rapssamen verwendet werden könnte. Da die stabile Transformation von *Brassica napus* mehrere Jahre in Anspruch nimmt, sollte der Versuchsansatz aufgrund der kürzeren Generationszeit von durchschnittlich sechs Wochen vorerst in *Arabidopsis thaliana* getestet werden.

Die Expression der *BnSCE3* erfolgte samenspezifisch in *Arabidopsis thaliana* und *Brassica napus* unter Kontrolle des samenspezifischen napin590-Promotors aus *Brassica napus* (2.2., 2.4.8.). Dadurch sollte der natürliche keimungsinduzierte Abbau von Sinapin in das Stadium der Samenreifung vorverlegt werden, mit der angestrebten Folge einer Absenkung des Sinapingehaltes im reifen Samen.

3.5.1. Überexpression in Samen von *Arabidopsis thaliana*

Die resultierenden transgenen T1-Samen der *Arabidopsis thaliana*-Transformanten (2.2) konnten aufgrund des in der Expressionskassette enthaltenen *bar*-Gens auf Resistenz gegen das Herbizid Basta® im Keimlingsstadium selektiert werden. Es wurden jeweils 20 resistente T1-Pflanzen ausgewählt und bis zur Samenreife kultiviert. Die transgenen T2-Samen wurden geerntet und mittels methanolischer Extraktion hinsichtlich ihres Sinapingehaltes chromatographisch untersucht (2.5.1., 2.3.5., 2.5.3.). Die Abbildung 16 zeigt eine Auswahl der analysierten transgenen Pflanzen, wobei die Samen der transgenen Pflanze 23 mit 6% den geringsten Sinapingehalt aufwiesen.

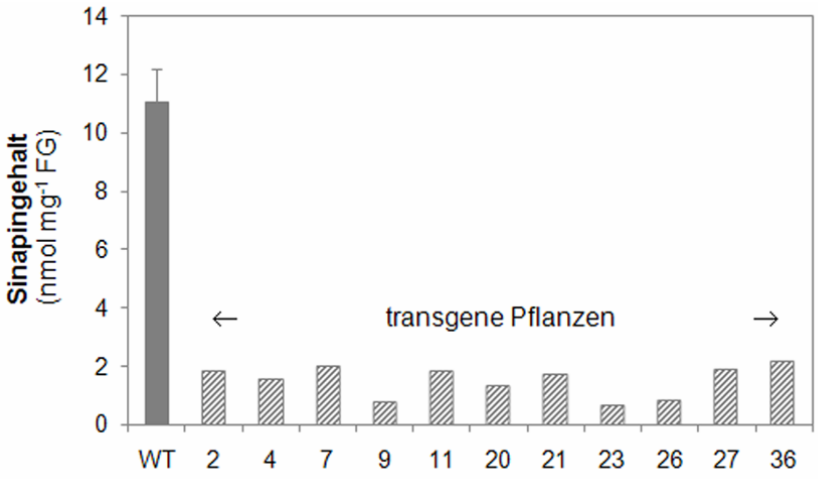


Abbildung 16: Sinapingehalt von *Arabidopsis thaliana* Wildtyp- (WT, grau) und transgenen *BnSCE3*-überexprimierenden T2-Samen (grau gestreift) der ausgewählten Pflanzen 2, 4, 7, 9, 11, 20, 21, 23, 26, 27 und 36 in nmol mg^{-1} Frischgewicht (FG).

Dieses Experiment zeigte, dass die samenspezifische Überexpression der *BnSCE3* in *Arabidopsis thaliana* eine geeignete Möglichkeit darstellt, den Sinapingehalt der Samen drastisch zu verringern. Nach diesem erfolgreichen *Proof of Concept* wurde die Methode nachfolgend für *Brassica napus* angewendet.

3.5.2. Überexpression in Samen von *Brassica napus*

Die Herstellung der *Brassica napus-BnSCE3*-Überexpressionslinien unter Kontrolle des napin590-Promotors erfolgte in Kooperation mit der Saaten-Union BIOTEC GmbH. Insgesamt konnte das transgene T2-Samenmaterial von sechs Wildtyppflanzen (T1510 101.K, T1510 102.K, T1510 103.K, T1510 104.K, T1510 105.K, T1510 106.K) und sieben phosphinothricinresistenten T1-Pflanzen (T1510.1a, T1510.1b, T1510.2, T1510.3, T1510.4, T1510.5, T1510.6) untersucht werden. In einem ersten Experiment erfolgte die Analyse des Sinapin- und restlichen Sinapatestergehaltes (abzüglich Sinapin) der Wildtyp- und transgenen T2-Samen (Abbildung 17). Dazu wurde ein Gemisch aus jeweils zehn Samen methanolisch ex-

trahiert (2.5.1.). Mittels Verseifung der Extrakte konnte der Gehalt aller Sinapatester chromatographisch ermittelt werden (2.5.1.).

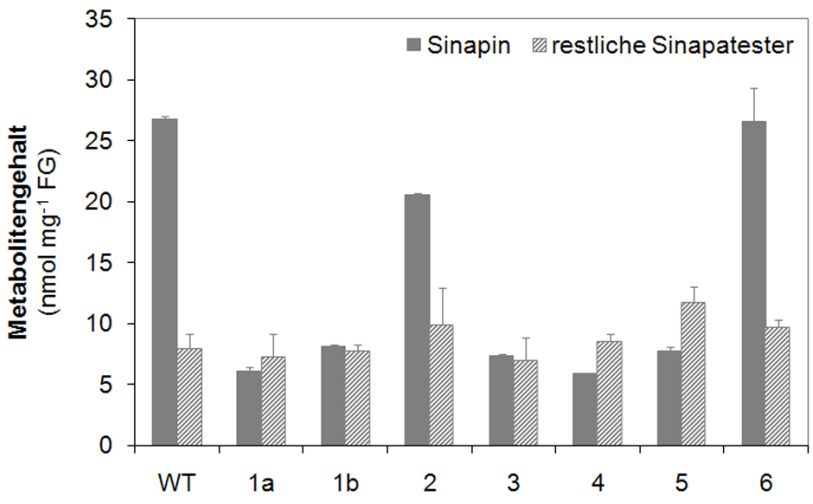


Abbildung 17: Sinapin- und restlicher Sinapatestergehalt (abzüglich des Sinapins) in *Brassica napus*-Wildtyp (WT)- und *BnSCE3*-Überexpressionssamen (T2-Samen; 1a bis 6), dargestellt in nmol mg^{-1} Frischgewicht (FG). Die Metabolitengehalte wurden aus je drei biologischen Replikaten ermittelt.

Sechs der sieben transgenen *BnSCE3*-Überexpressionslinien zeigten einen signifikant reduzierten Sinapingehalt in dem analysierten heterozygoten T2-Saatgut. Die Gehalte der Linien 1a, 1b, 3, 4 und 5 wiesen dabei die stärkste Reduktion des Sinapingehaltes von 70 bis 78% auf, bei einem nahezu unveränderten Gehalt der restlichen Sinapatester. Um zu überprüfen, welche dieser Linien nur eine Genkopie der zusätzlich inserierten *BnSCE3* im Genom trägt, wurde eine Segregationsanalyse mit Hilfe der gegen das Herbizid Basta® vorhandenen Resistenz durchgeführt. Dazu wurden 60 Samen jeder Linie ausgelegt und die jungen Keimpflanzen (vier Tage alt) im Abstand von zwei Tagen wiederholt mit der Herbizid-Lösung besprüht (2.2.). Die Basta®-intoleranten Pflanzen zeigten bereits nach einwöchiger Applikationsdauer starke Blattschäden, was die eindeutige Zuordung der resistenten und sensitiven Pflanzen nach Abschluss der Behandlung ermöglichte. Im Falle einer Einzelkopie-Insertion sollte das Verhältnis resistenter zu sensitiven Pflanzen in der F2-Generation bei 3:1 liegen, wobei sich der resistente Anteil aus einem Teil homozygoter und zwei Teilen heterozygoter Pflanzen zusammensetzt. Der Basta®-sensitive Wildtypanteil stirbt ab. Für die transgenen Linien 1a, 1b, 4 und 5 konnte diese Verteilung mit Hilfe des χ^2-Testes ermittelt werden (Daten nicht gezeigt). Nachfolgend wurden jeweils 20 resistente Jungpflanzen vereinzelt und bis zur Samenreife kultiviert. Von den geernteten T3-Samen wurden wiederum jeweils 30 ausgelegt (von jeder der 20 Pflanzen jeder der vier Linien mit Einzelkopie-Insertion). Mittels Basta®-Behandlung konnten nun die homozygoten T2-Pflanzen identifiziert werden, deren ausgewählte 30 Nachkommen alle resistent gegenüber dem Herbizid Basta® waren. Die nachfolgenden Analysen wurden mit dem homozygoten T3-Saatgut der Überexpressionslinien 1a (bezeichnet als OE1 -

T3-Saatgut der Überexpressionslinien 1a (bezeichnet als OE1 - *overexpression line* 1) und 4 (OE2 - *overexpression line* 2) durchgeführt. Die Überprüfung des Transkriptgehaltes der *BnSCE3* in reifen Samen von jeweils drei homozygoten Pflanzen der Überexpressionslinien OE1 und OE2 erfolgte durch RT-PCR (2.4.5.) mit extrahierter RNA aus reifen Samen (2.3.8.) mit dem Oligonukleotidpaar LIP2RT_F und LIP2RT_R (Tabelle A1). Als konstitutiv exprimiertes Kontrollgen diente *Ubiquitin*. Die PCR-Ergebnisse bestätigten die erfolgreiche Überexpression der *BnSCE3* in reifen *Brassica napus*-Samen (Abbildung 18).

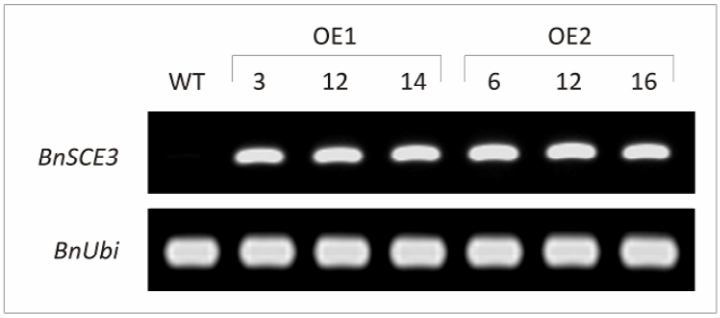


Abbildung 18: Analyse der *BnSCE3*-Transkriptmenge in reifen *Brassica napus*-Wildtyp (WT)- und Überexpressions (OE)-Samen mittels RT-PCR. Die Samen von drei homozygoten Nachkommen beider unabhängiger Überexpressionslinien OE1 (1a-3, 1a-12, 1a-14) und OE2 (4-6, 4-12, 4-16) wurden untersucht. Als Positivkontrolle diente das konstitutiv exprimierte Kontrollgen *Ubiquitin*.

Für die chromatographische Analyse der Gehalte an Sinapin und restlichen Sinapatestern (abzüglich des Sinapins) in Samen des Wildtyps und der homozygoten Überexpressionslinien OE1 und OE2 (T3-Generation) wurde ein Gemisch aus jeweils zehn Samen methanolisch extrahiert (2.5.1., Abbildung 19).

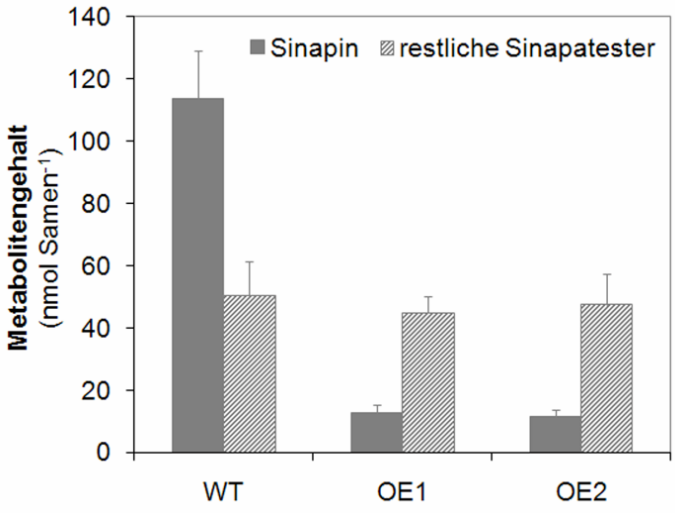


Abbildung 19: Sinapin- und restlicher Sinapatestergehalt (abzüglich des Sinapins) in *Brassica napus*-Wildtyp (WT)- und *BnSCE3*-Überexpressionssamen (T3), dargestellt in nmol pro Samen. Die Metabolitengehalte wurden aus je drei biologischen Replikaten ermittelt. Bei den Überexpressionslinien OE1 und OE2 wurden je drei biologische Replikate der drei ausgewählten homozygoten Nachkommen pro Linie analysiert (OE1-3,-12,-14 und OE2-6,-12,-16).

Der Sinapingehalt der Rapssamen konnte durch die Überexpression der *BnSCE3* im Vergleich zum Wildtyp durchschnittlich um 90% pro Samen reduziert werden. Im Fall der restlichen Sinapatester war keine signifikante Absenkung nachweisbar.

3.6. Einfluss der *BnSCE3*-Überexpression auf die Samenqualität von *Brassica napus*

Mit den nachfolgenden Untersuchungen sollte der Frage nachgegangen werden, inwieweit die samenspezifisch induzierte enzymatische Aktivität der BnSCE3 Einfluss auf morphologische und physiologische Charakteristika der Samen und sich entwickelden Pflanzen hat.

3.6.1. Veränderungen der physiologischen Sameneigenschaften

Zunächst fielen der Größenunterschied der Samen und der vermehrt auftretende faltige Phänotyp der homozygoten T3-Überexpressionssamen auf. Hinsichtlich der Keimungsrate konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Wildtyp- und homozygoten Überexpressionssamen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die nachfolgenden Untersuchungsergebnisse zur Größe (maximaler Durchmesser in mm), zum Gewicht (Einzelsamengewicht in mg) und zum Feuchtegehalt (Feuchteverlust in % nach 80°C-Inkubation für 48 h) der reifen Samen und zur Hypokotyllänge der jungen Keimpflanzen (sechs Tage) sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Vergleich der physiologischen Eigenschaften der Wildtyp (WT)- und homozygoten T3-Überexpressionssamen (Größe, Gewicht und Feuchtegehalt) und der Hypokotyllänge von sechs Tage alten Keimlingen. Die Samengröße im Querschnitt (n=30) und die Länge der Keimlingshypokotyle (n=60) sind in mm, das Samengewicht (n=60) in mg und der Feuchtegehalt (n=3 je 150 Samen) in % dargestellt. Bei den Überexpressionslinien OE1 und OE2 wurden die Samen der ausgewählten homozygoten Nachkommen analysiert (OE1-3,-12,-14 und OE2-6,-12,-16). Die Datenauswertung erfolgte mittels *t*-Test.

Eigenschaften	WT	OE1	*P*-Wert	OE2	*P*-Wert
Samengröße	2,18 ± 0,17	2,53 ± 0,15	8,8E-04	2,55 ± 0,24	7,8E-04
Samengewicht	3,70 ± 0,69	5,99 ± 0,85	5,3E-23	5,90 ± 0,91	1,7E-23
Samenfeuchte	4,60 ± 0,25	5,62 ± 0,35	3,1E-02	5,94 ± 0,17	9,1E-03
Hypokotyllänge	1,69 ± 0,29	2,14 ± 0,36	4,7E-10	2,49 ± 0,50	1,3E-17

In den analysierten Merkmalen unterscheiden sich die untersuchten Überexpressionssamen (OE) signifikant von den Wildtypsamen (WT). Sie sind durchschnittlich 17% größer und 61% schwerer im Vergleich zur Kontrolle und besitzen einen 26% höheren Feuchtigkeitsgehalt. Zusätzlich sind die Hypokotyle der jungen transgenen Keimpflanzen (sechs Tage alt) signifikant um 37% länger als die der vergleichbaren Wildtyppflanzen. Die transgenen Keimpflanzen scheinen sich unter Gewächshausbedingungen schneller zu wachsen. Dieser Effekt verliert sich jedoch im Laufe der Entwicklung und ist bei 20 Tage alten Jungpflanzen nicht mehr zu beobachten.

3.6.2. Auswirkungen auf die Samenqualität

Die Untersuchung qualitativer Parameter der Rapssamen (Wildtyp und *BnSCE3*-Überexpressionslinien) erfolgte durch die Nahinfrarotspektroskopie (NIRS, 2.5.7.), die mit Hilfe von Dipl.-Ing. Benjamin Wittkop in der Arbeitsgruppe von Prof. Wolfgang Friedt[30] durchgeführt wurde. Die folgenden Qualitätsparameter der Rapssamen wurden dabei analysiert: Gehalt an Fasern (Hemicellulose, Cellulose, Lignin), Öl, Ölsäure, Linolensäure, Rohprotein und Glucosinolaten. Die analysierten Samenqualitätsparameter der Überexpressionssamen, wie die Menge an Lignin und Glucosinolaten, sowie die landwirtschaftlich wichtigen Merkmale, wie der Öl- und Proteingehalt, weisen nur geringe Veränderungen im Vergleich zu den Wildtypsamen auf. Beim Hemicellulose- und Cellulosegehalt konnte allerdings eine deutliche Erhöhung von durchschnittlich 25% in den Überexpressionssamen beobachtet werden (Abbildung 20).

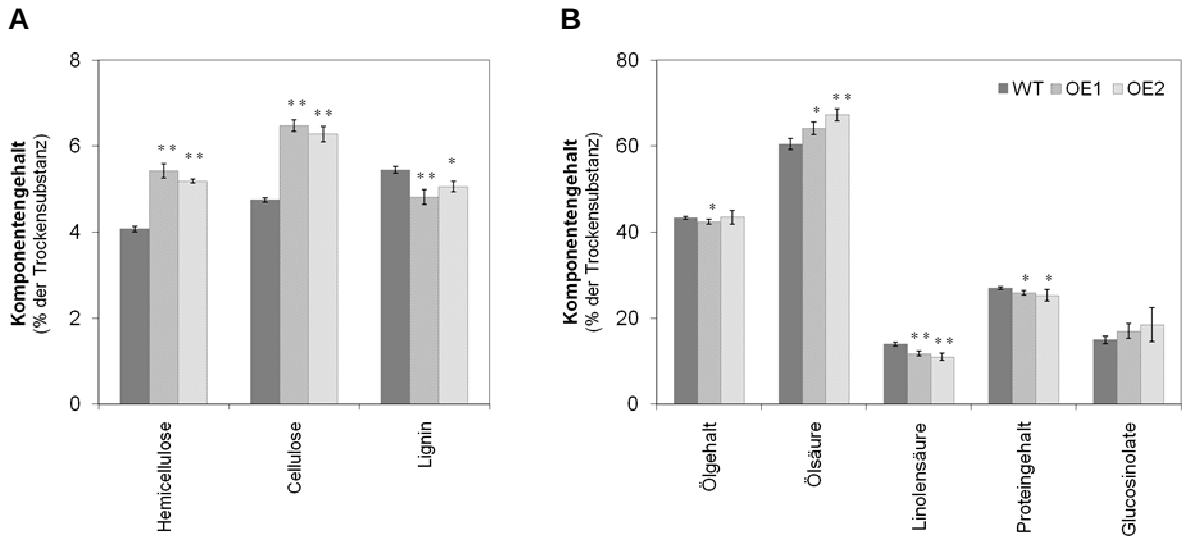


Abbildung 20: NIRS-Analyse der Qualitätsparameter der *Brassica napus*-Wildtyp (WT)- und Überexpressionssamen (OE1, OE2), dargestellt in % der Trockensubstanz. Die Komponentengehalte wurden aus je vier biologischen Replikaten mit je vier technischen Replikaten ermittelt. Bei den Überexpressionslinien OE1 und OE2 wurden die ausgewählten homozygoten Nachkommen pro Linie analysiert (OE1-3,-12,-14 und OE2-6,-12,-16). Die Daten wurden mit dem *t*-Test statistisch ausgewertet (*P*-Werte: * ≤ 0,05; ** ≤ 0,01).

3.6.3. Elektronenmikroskopische Veränderungen der Samen

Die transgenen Überexpressionssamen unterschieden sich in verschiedenen Qualitätsmerkmalen (z.B. Feuchtigkeitsgehalt, Gewicht und Größe; siehe 3.6.1.) deutlich von den Wildtypsamen. Um eventuelle strukturelle Veränderungen innerhalb des Samen zu analysieren, wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen der Samenquerschnitte durch-

[30] Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Justus-Liebig-Universität, Gießen, Deutschland

geführt. Durch die Nutzung eines *Environmental Scanning Electron Microscopes* (ESEM, 2.6.2.), konnte das native Samenmaterial mit Hilfe von Dipl.-Phys. Frank Syrowatka[31] und Dr. Gerd Hause[32] direkt untersucht werden. Sowohl ganze als auch, entlang der Quernaht, halbierte Samen wurden auf den Mikroskopträgern aufgebracht. Vier Wildtypsamen und jeweils sechs Samen der zwei zu untersuchenden *BnSCE3*-Überexpressionslinien (OE1, OE2) wurden mit dem ESEM untersucht. Dabei fielen bei der Samenschale der Überexpressionslinien (OE1 und OE2) deutlich stärkere Einbuchtungen im Vergleich zu den Wildtypsamen auf (Abbildung 21).

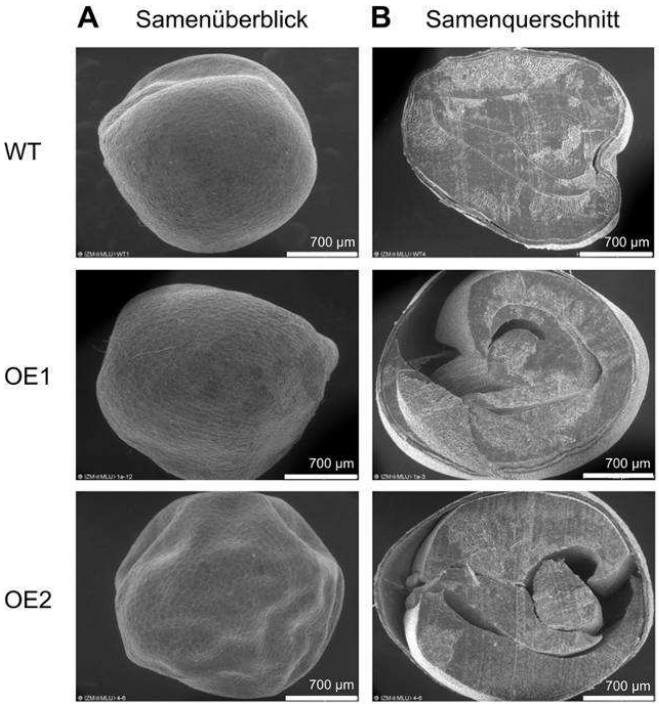


Abbildung 21: Elektronenmikroskopische Analyse der transgenen Rapssamen (*BnSCE3*-Überexpressionslinien OE1 und OE2) verglichen mit *Brassica napus*-Wildtypsamen (WT). Spalte A zeigt die Samen im Überblick, Spalte B stellt die Samenquerschnitte gegenüber. Der Balken entspricht 700 µm.

Die detaillierte Betrachtung der Samenschale, zeigte keine signifikanten Unterschiede (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu konnten bei den Samenquerschnitten häufig Hohlräume in den Überexpressionssamen detektiert werden.

3.6.4. Einfluss auf die Sekundärmetabolite

Die samenspezifische Überexpression der *BnSCE3* und der damit einhergehende direkte Eingriff in den Metabolismus der Sinapatester resultierte, wie erhofft, in einem stark verringerten Sinapingehalt (3.5.2.). Inwieweit auch andere Sekundärmetabolite einer Veränderung unterlagen, sollte ein umfassendes *Metabolite Profiling* klären. Diese Untersuchungen

[31] Interdisziplinäres Zentrum für Materialwissenschaften (IZM), Halle (Saale), Deutschland
[32] Biozentrum, Halle (Saale), Deutschland

erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Edda von Roepenack-Lahaye und Dr. Christoph Böttcher[33]. Die Analyse umfasste reife Wildtyp-Samen und reife *BnSCE3*-Überexpressionssamen der T2-Generation. Normalerweise werden Metaboliten-Analysen mit homozygotem Pflanzenmaterial durchgeführt, da sich die biochemischen Effekte anderenfalls durch das vorhandene Wildtyp-Material zu stark verdünnen würden. Aufgrund der langen Generationszeit der Rapspflanzen sollte das zu dieser Zeit verfügbare T2-Samenmaterial der *BnSCE3*-Überexpressionslinien analysiert werden. Bei diesen Samen handelte es sich jedoch um segregierendes Material, demzufolge um eine Mischung von homozygoten, heterozygoten und Wildtyp-Samen. Um das Problem des Verdünnungseffektes zu lösen, erfolgten Einzelkornanalysen. Dafür wurden von jeweils 30 Wildtyp-Samen und jeweils 60 Samen der transgenen Linien 1a, 4 und 5 (entspricht OE1, OE2 und OE3) methanolische Extrakte hergestellt (2.5.1.) und mittels UPLC/ESI-QTOF-MS analysiert (2.5.5.). Diese Linien zeigten bei der Bestimmung des Sinapingehaltes die niedrigsten Werte (Abbildung 17, 19). Eine Segregationsanalyse identifizierte sie als die Linien mit einer einfachen Insertion. Sie bildeten die Grundlage für die nachfolgende Sekundärmetabolitenanalyse.

Um innerhalb der Einzelproben zwischen Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten Samen unterscheiden zu können, wurde zu Beginn der Sinapingehalt in den Einzelsamen untersucht (2.5.1.). Es sollte in diesem Zusammenhang ebenfalls die Frage beantwortet werden, inwiefern es möglich ist, mit Hilfe des samenspezifischen Markers Sinapin die Segregationsanalyse der T2-Generation zu bestätigen (Tabelle 10).

Tabelle 10: Segregationsanalyse der Einzelsamen mit dem samenspezifischen Marker Sinapin. Die Verteilung der Einzelsinapingehalte in den Wildtyp- (WT) und Überexpressionssamen der Linien OE1, OE2 und OE3 diente als Basis zur Bestimmung des Segregationsverhältnisses. μ (Mittelwert), 2σ (zweifache Standardabweichung, umfasst 95% der Werte), 1σ (einfache Standardabweichung, umfasst 68% der Werte).

	OE1	OE2	OE3
geringster Sinapingehalt (WT=100%)	0,1%	0,1%	0,6%
Verhältnis WT/OE (μ - 2σ)	1/2,75	1/2,5	1/1,1
Verhältnis WT/OE (μ - 1σ)	1/3,0	1/2,5	1/3,2

[33] Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Abt. Stress- und Entwicklungsbiologie, Halle (Saale), Deutschland

Da das Segregationsverhältnis der Überexpressionslinien OE1 und OE2 dem erwarteten 1:3 Verhältnis nahezu entspricht und der Sinapingehalt in diesen Linien am niedrigsten war, wurden diese Proben für das *Metabolite Profiling* ausgewählt. Die Abbildung 22 verdeutlicht die Verteilung des Sinapingehaltes in den Einzelsamenproben der Überexpressionslinien OE1 und OE2.

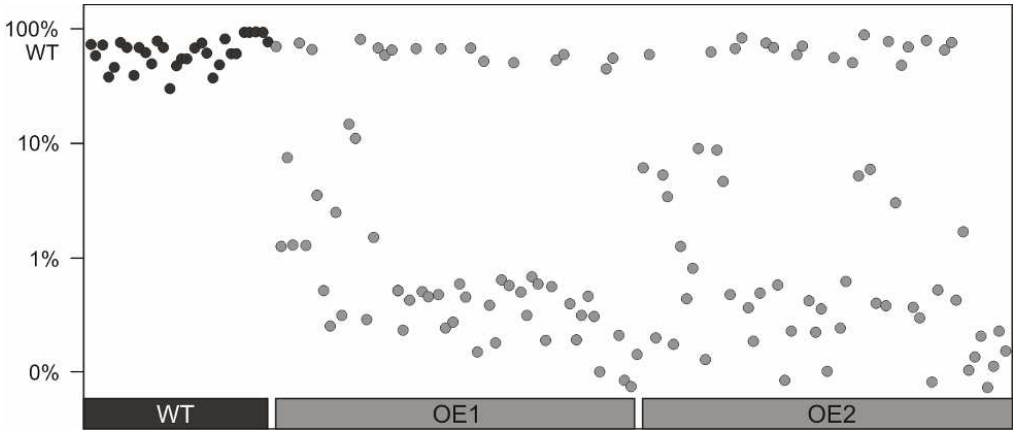


Abbildung 22: Logarithmische Darstellung des Sinapingehaltes in % vom Wildtypniveau der *Brassica napus*-Wildtyp- (WT, n=30) und *BnSCE3*-Überexpressionssamen (OE1, OE2, n= 60).

Die Sinapingehalte in den Überexpressionslinien OE1 und OE2 veranschaulichen die Segregation der analysierten T2-Generation. Somit ist die Betrachtung des samenspezifischen Markers Sinapin eine weitere Möglichkeit eine Segregationsanalyse in der T2-Generation durchzuführen.

Die Basis für die weitere Analyse der veränderten Metabolitengehalte bildeten die 30 Samenproben des Wildtyps und jeweils 30 Proben der Überexpressionlinien OE1 und OE2. Letztere eigneten sich besonders aufgrund ihres Sinapingehaltes. Dieser lag zwischen 0,1 und 1% bezogen auf das mittlere Wildtypniveau. Desweiteren fanden nur solche Metabolite Eingang in die Betrachtung, deren relative Intensitäten, im Vergleich zum Wildtypniveau, mindestens zweifach erhöht oder erniedrigt waren. Die Tabelle 11 stellt eine Zusammenfassung der annotierten Metabolite in den methanolischen Extrakten dar, die sich als signifikant verändert herausstellten.

Tabelle 11: Analyse der Sekundärmetabolite in *Brassica napus*-Wildtyp- (WT) und *BnSCE3*-Überexpressionssamen (OE1, OE2) mittels UPLC/ESI(+)-QTOF-MS basiertem *Metabolite Profiling* methanolischer Totalextrakte. Alle annotierten Metabolite sind mit den relativen Intensitäten (log2, ratio) und den *P*-Werten bezogen auf die Wildtyp-Kontrolle aufgelistet. Die Metabolite, die sich mindestens um den Faktor 20 (4,322, log2) bzw. 0,1 (-3,322, log2) in beiden Linien vom Wildtypniveau unterschieden, wurden hervorgehoben. G: Guaiacylrest, S: Syringylrest, UK: unbekannte Komponente; al: Annotationslevel (1 - Verbindung mit authentischem Standard identifiziert, 2 - Verbindung aufgrund spektroskopischer Daten identifiziert, 3 - Verbindungsklasse aufgrund spektroskopischer Daten identifiziert, 4 - unbekannte Verbindung)

Nr.	Metabolit	al	Formel	RT (s)	Quant. Ion *(m/z)*	Rel. Metabolitenint. (*ratio*, log2)	
						OE1/WT	OE2/WT
1	Benzoylcholin	1	$C_{12}H_{18}NO_2^+$	125	149,06	-3,68	-1,55
2	Feruloylcholin (FC)	1	$C_{15}H_{22}NO_4^+$	133	221,08	**-8,91**	**-8,91**
3	5-Hydroxy-FC	2	$C_{15}H_{22}NO_5^+$	109	237,08	**-8,30**	**-6,93**
4	Sinapoylcholin (SC)	1	$C_{16}H_{24}NO_5^+$	135	310,16	**-10,82**	**-9,56**
5	FC(4-*O*-8´)G	1	$C_{25}H_{34}NO_8^+$	143/146	476,23	-1,37	-1,41
6	FC(4-*O*-8´)S	2	$C_{26}H_{36}NO_9^+$	141/146	506,24	-1,10	-0,67
7	SC(4-*O*-8´)G	2	$C_{26}H_{36}NO_9^+$	171/186	506,24	-2,99	-2,75
8	SC(4-*O*-8´)S	2	$C_{27}H_{38}NO_{10}^+$	168/183	536,25	-3,07	-2,27
9	FC(5-8)G	1	$C_{25}H_{32}NO_7^+$	215	458,22	-3,47	-3,01
10	2-*O*-Sinapoylmalat	1	$C_{15}H_{16}O_9$	193	207,07	-1,78	-2,12
11	Hydroxybenzoat *O*-Hexosid	2	$C_{13}H_{16}O_8$	92	323,07	**-3,75**	**-3,49**
12	Caffeat di-*O*-Hexosid	2	$C_{21}H_{28}O_{14}$	97	527,14	-4,04	-2,65
13	Spermidinkonjugat	2	$C_{21}H_{28}O_{14}$	180/186	496,24	-1,39	-0,72
14	UK#1 (Cholinester)	3	$C_{18}H_{34}NO_4^+$	177	328,25	**-3,34**	**-3,78**
15	UK#2 (phenol. Cholinester)	3	$C_{25}H_{31}N_2O_6^+$	192	455,22	**-5,13**	**-4,76**
16	UK#3 (phenol. Cholinester)	3	$C_{26}H_{36}NO_8^+$	175	490,24	**-6,80**	**-5,74**
17	UK#4 (sulfated)	4	$C_{24}H_{22}N_2O_{12}S$	145	505,12	-2,59	-0,96
18	UK#5 (sulfated)	4	$C_{24}H_{22}N_2O_{11}S$	181	489,13	-4,77	-1,45
19	Syringoylcholin (SyC)	1	$C_{14}H_{22}NO_5^+$	89	225,08	**6,74**	**7,41**
20	Vanilloylcholin 4-*O*-Hexosid	2	$C_{19}H_{30}NO_9^+$	64	416,19	2,35	2,83
21	SyC 4-*O*-Hexosid	2	$C_{20}H_{32}NO_{10}^+$	73	446,20	**4,40**	**4,73**
22	SyC(4-*O*-8´)G	2	$C_{24}H_{34}NO_9^+$	134/148	480,22	**6,73**	**6,66**
23	Caffeoylcholin 4-*O*-Hexosid	2	$C_{20}H_{30}NO_9^+$	83/94	428,19	3,12	2,82
24	FC 4-*O*-Hexosid	2	$C_{21}H_{32}NO_9^+$	90/105	442,21	2,93	4,06
25	SC 4-*O*-Hexosid	2	$C_{22}H_{34}NO_{10}^+$	96/104	472,22	3,58	4,38
26	SC 4-*O*-Dihexosid	2	$C_{28}H_{44}NO_{15}^+$	90/99	634,27	**8,91**	**9,37**
27	SC 4-*O*-(Hexosid-Pentosid)	2	$C_{27}H_{22}NO_{14}^+$	101	604,26	**6,55**	**7,19**
28	FC(4-*O*-8´)G 4-*O´*-Hexosid	2	$C_{31}H_{44}NO_{13}^+$	111/124	638,28	2,64	3,04
29	SC(4-*O*-8´)G 4-*O´*-Hexosid	2	$C_{32}H_{46}NO_{14}^+$	128/140	668,29	4,02	4,62
30	SC(4-*O*-8´)S 4-*O´*-Hexosid	2	$C_{33}H_{48}NO_{15}^+$	133/143	698,30	3,89	4,78
31	FC(5-8)G 4-*O´*-Hexosid	2	$C_{31}H_{42}NO_{12}^+$	153	620,27	1,41	2,33
32	Sinapat 4-*O´*-Glucosid	2	$C_{17}H_{22}O_{10}$	118	409,11	4,22	4,66
33	Methylsinapat	1	$C_{12}H_{14}O_5$	314	207,07	**4,89**	**4,52**
34	Ferulat 4-*O*-Hexosid	2	$C_{16}H_{20}O_9$	110	379,10	3,84	4,47
35	Syringat 4-*O*-Hexosid	2	$C_{15}H_{20}O_{10}$	94	383,09	3,48	3,61
36	Kaempferol 3-*O*-Sophorosid	2	$C_{27}H_{30}O_{16}$	169	287,06	3,06	4,08
37	Kaempferol 3-*O*-Sinapoylsoph.	2	$C_{38}H_{40}O_{20}$	185	369,12	3,16	2,97
38	UK#6 (phenol. Cholinester)	3	$C_{30}H_{44}NO_{13}^+$	128	626,28	4,26	5,34
39	UK#7 (phenol. Cholinester)	3	$C_{15}H_{26}NO_4^+$	175	225,11	2,94	3,20
40	UK#8 (phenol. Cholinester)	3	$C_{17}H_{28}NO_4^+$	229	251,13	2,58	2,52
41	UK#9 (phenol. Cholinester)	3	$C_{26}H_{42}NO_{12}^+$	188	560,27	2,46	2,43
42	UK#10 (phenol. Cholinester)	3	$C_{22}H_{34}NO_{11}^+$	97	488,21	**4,19**	**5,10**

Aufgrund der hohen Gehalte an Cholinestern in den reifen Samen, wie zum Beispiel Sinapin als Hauptkomponente, wurden diese in einem Teil der methanolischen Samenextrakte durch die Anwendung einer Festphasenextraktion abgereichert (2.5.5.). Dies ermöglichte die Detektion auch niedrig konzentrierter Komponenten, die anderenfalls durch die Cholinester maskiert werden. Die Zusammenfassung der annotierten Metabolite in den Cholinester-abgereicherten methanolischen Extrakten, welche als signifikant verändert identifiziert werden konnten, sind in der Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 12: Analyse der Sekundärmetabolite in *Brassica napus*-Wildtyp- (WT) und *BnSCE3*-Überexpressionssamen (OE1, OE2) mittels UPLC/ESI(+)-QTOF-MS basiertem *Metabolite Profiling* Cholinesterabgereicherter methanolischer Extrakte. Alle annotierten Metabolite sind mit den relativen Intensitäten (log2, ratio) und den *P*-Werten bezogen auf die Wildtyp-Kontrolle aufgelistet. Die Metabolite, die sich mindestens um den Faktor 20 (4,322, log2) bzw. 0,1 (-3,322, log2) in beiden Linien vom Wildtypniveau unterschieden, wurden hervorgehoben. G: Guaiacylrest, S: Syringylrest, UK: unbekannte Komponente; al: Annotationslevel (1 - Verbindung mit authentischem Standard identifiziert, 2 - Verbindung aufgrund spektroskopischer Daten identifiziert, 4 - unbekannte Verbindung)

Nr.	Metabolit	al	Formel	RT (s)	Quant. Ion *(m/z)*	Rel. Metabolitenint. (*ratio*, log2)	
						OE1/WT	OE2/WT
10	2-*O*-Sinapoylmalat	1	$C_{15}H_{16}O_9$	193	207,07	-1,13	-1,53
11	Hydroxybenzoat *O*-Hexosid	2	$C_{13}H_{16}O_8$	92	323,07	**-4,86**	**-5,80**
12	Caffeat di-*O*-Hexosid	2	$C_{21}H_{28}O_{14}$	97	527,14	-3,33	-1,95
17	UK#4 (sulfated)	4	$C_{24}H_{22}N_2O_{12}S$	145	505,12	-2,59	-1,05
18	UK#5 (sulfated)	4	$C_{24}H_{22}N_2O_{11}S$	181	489,13	-5,51	-1,52
43	2-*O*-Feruloylmalat	2	$C_{14}H_{14}O_8$	191	333,06	**5,07**	**5,21**
32	Sinapat 4-*O´*-Glucosid	2	$C_{17}H_{22}O_{10}$	118	409,11	4,04	3,72
33	Methylsinapat	1	$C_{12}H_{14}O_5$	314	207,07	**7,99**	**8,48**
34	Ferulat 4-*O*-Hexosid	2	$C_{16}H_{20}O_9$	110	379,10	4,02	4,16
35	Syringat 4-*O*-Hexosid	2	$C_{15}H_{20}O_{10}$	94	383,09	2,55	3,39
36	Kaempferol 3-*O*-Sophorosid	2	$C_{27}H_{30}O_{16}$	169	287,06	**5,37**	**4,97**
37	Kaempferol 3-*O*-Sinapoylsoph.	2	$C_{38}H_{40}O_{20}$	185	369,12	**5,25**	**3,61**
44	Methylsinapat 4-*O*-Hexosid	2	$C_{18}H_{24}O_{10}$	200	423,13	**8,16**	**9,19**
45	Sinapat 4-*O*-Pentosid	2	$C_{16}H_{20}O_9$	130	379,10	1,91	2,31
46	Sinapat-Cysteinkonjugat	2	$C_{14}H_{19}NO_7S$	90	346,10	**3,92**	**4,51**
47	Sinapat-Glutathionkonjugat	2	$C_{21}H_{29}N_3O_{11}S$	101	308,09	2,23	3,16
48	Sinapoyl-Methylcysteinsulfoxid	2	$C_{15}H_{19}NO_7S$	128	358,10	**6,67**	**10,51**
49	UK#11	4	$C_{19}H_{32}O_9$	185	427,19	2,33	1,46
50	UK#12	4	$C_{12}H_{11}NO_3$	218/242	240,06	2,71	2,35

Die in den Tabellen 11 und 12 aufgelisteten Metabolite umfassen alle signifikanten metabolischen Veränderungen im Phenylpropanstoffwechsel, begründet durch die samenspezifische Überexpression der *BnSCE3*. Von allen gemessenen Komponenten sind ausschließlich solche aufgeführt, deren Gehalt in den Überexpressionssamen mindestens zweifach erhöht oder erniedrigt vorlag. Alle anderen Metabolite, für die keine quantitativen Unterschiede

in den transgenen Samen detektiert werden konnten, wurden nicht tabellarisch aufgenommen.

Die umfassenden massenspektrometrischen Daten sowie alle Strukturformeln der 50 detektierten Komponenten sind im Anhang in der Tabelle A3 und in Abbildung A1 dargestellt. Die signifikant veränderten Metaboliten umfassen Hydroxybenzoesäuren, Hydroxyzimtsäuren, Kaempferolderivate und einige Komponenten, die bisher lediglich als Cholinester oder schwefelhaltige Verbindungen klassifiziert werden konnten. Diese Verbindungen wurden in den Tabellen als unbekannte Komponenten (UK) bezeichnet.

Grundsätzlich konnte festgestellt werden, dass die beiden unabhängigen *BnSCE3*-Überexpressionslinien, bezogen auf die Sekundärmetabolitengehalte, ein ähnliches Muster aufwiesen. Die stärksten Veränderungen betrafen, wie erwartet, die Reduktion des Sinapingehaltes und weiterer Cholinester, wie zum Beispiel Feruloylcholin und 5-Hydroxy-Feruloylcholin. Das bei der BnSCE3-vermittelten Hydrolyse freiwerdende Produkt Sinapat akkumuliert jedoch nicht, sondern führte zu einer moderaten Erhöhung anderer Sinapatkonjugate, wie zum Beispiel Methylsinapat, Methylsinapat 4-*O*-Hexosid, Sinapat-Cysteinkonjugat und Sinapat 4-*O*′-Glucosid (Abbildung 30). Auffällig war die Beobachtung, dass anscheinend ein Teil des Sinapins in Form von 4-*O*-Glucosiden, 4-*O*-di-Hexosiden, 4-*O*-Hexosid-Pentosen und Guaiacyl- und Syringylkonjugaten akkumulierte. Ähnliche Ergebnisse ergaben sich für Feruloylcholin.

Interessanterweise stellten sich auch in der Gruppe der Flavonoide Unterschiede zwischen den *BnSCE3*-Überexpressions- und den Wildtypsamen heraus. Die zwei Verbindungen Kaempferol 3-*O*-Sophorosid und Kaempferol 3-*O*-Sinapoylsophorosid akkumulierten in den transgenen Samen, während der Gehalt anderer Flavonoide unbeeinflusst blieb. Zusammenfassend führt die samenspezifische Überexpression der *BnSCE3* zu starken Veränderungen in den Gehalten vieler Sekundärstoffe. Jedoch kommt es durch die moderate Akkumulation verschiedener phenolischer Komponenten nicht zu einer Kompensation der Reduktion an Sinapin- und Sinapatverbindungen.

Die folgende Abbildung 23 verdeutlicht die metabolischen Veränderungen in den transgenen *BnSCE3*-Überexpressionssamen im Vergleich zur Wildtypkontrolle mittels eines HPLC-Elutionsprofils methanolischer Samenextrakte.

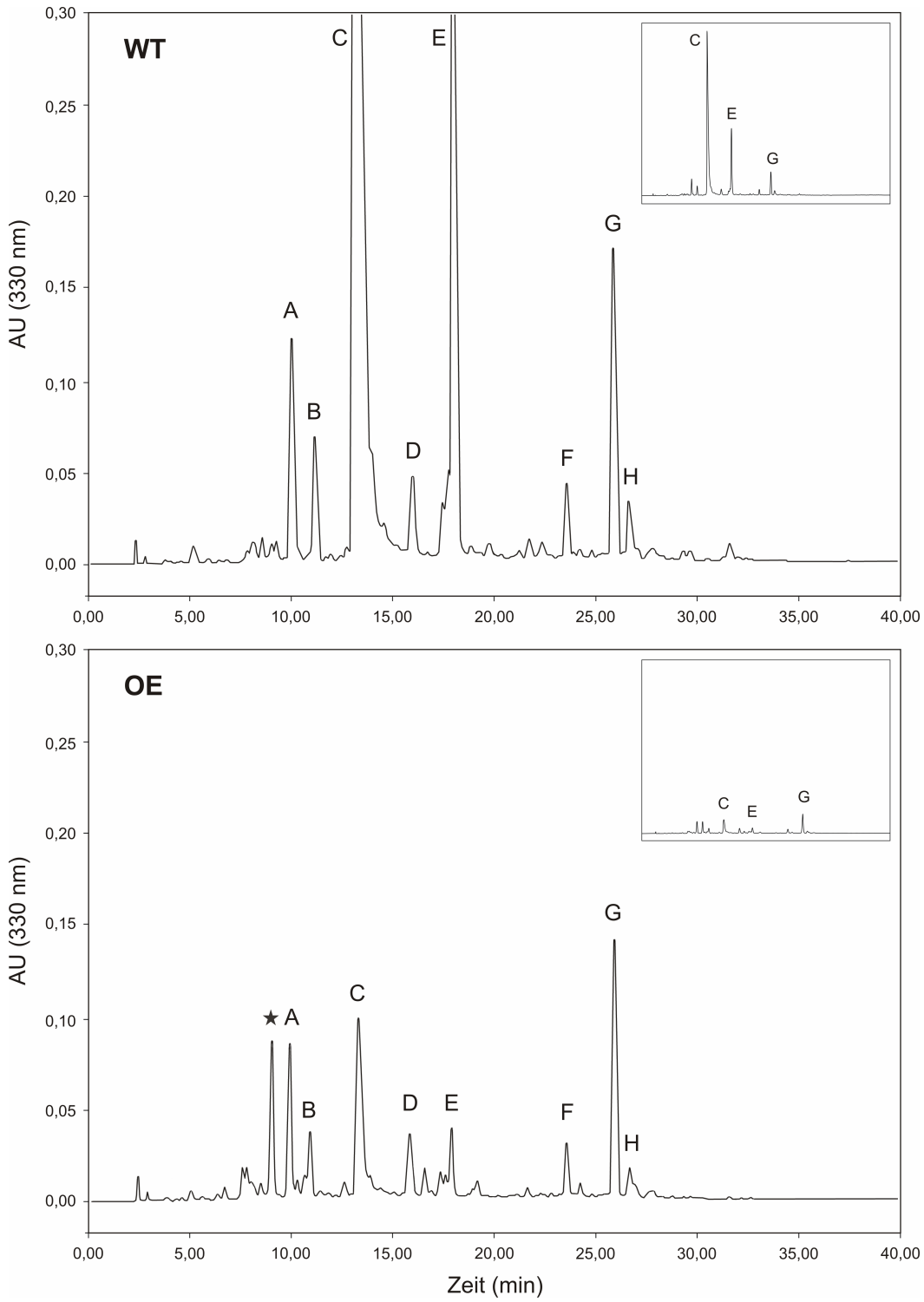


Abbildung 23: HPLC-Elutionsprofil methanolischer Samenextrakte von *Brassica napus* (0,30 AU). Das Profil von Wildtypsamen wird dem einer charakteristischen *BnSCE3*-Überexpressionssamenprobe (OE = OE1) gegenübergestellt. Die Übersichtsabbildungen (oben rechts) zeigen das Elutionsprofil bei 1,20 AU. Legende: ★ = (*E*)-Sinapat 4-*O*´-Glucosid; A = 1-*O*-(*E*)-Sinapoyl-β-Glucose; B = Kaempferol 3-[2´´-*O*-(*E*)-Sinapoyl-β-Sophorosid]-7-*O*-β-Glucosid; C = 1-*O*-(*E*)-Sinapoylcholin (Sinapin); D = (*E*)-Sinapat; E = 2-*O*-(*E*)-Sinapoyl-*S*-Malat; F = 1,2-Di-*O*-(*E*)-Sinapoyl-β-Gentiobiose; G = 1,2-Di-*O*-(*E*)-Sinapoyl-β-Glucose; H = 1,2,2´-Tri-*O*-(*E*)-Sinapoyl-β-Gentiobiose.

3.6.5. Veränderung der Primärmetabolite

Der Shikimatweg gilt als zentrale Verbindung zwischen dem Primärstoffwechsel und dem Sekundärstoffwechsel. Er stellt mit der Verfügbarkeit von Kohlenhydraten die Grundlage für die Synthese von aromatischen Aminosäuren und vielen sekundären Metaboliten dar (Herrmann und Weaver, 1999). Aufgrund der Stoffwechselverknüpfungen sollte der Frage nachgegangen werden, inwieweit auch primäre Metabolite durch die Veränderung der *BnSCE3*-Überexpression betroffen sind.

Dafür wurde eine Reihe polarer Metabolite in reifen Samen von *Brassica napus* analysiert. Diese Untersuchungen erfolgten in Zusammenarbeit mit Dipl.-Ing. Alexander Erban[34] in der Arbeitsgruppe von Dr. Joachim Kopka (2.5.5.). Es sollte dabei das Spektrum der polaren Primärmetabolite in den transgenen *BnSCE3*-Überexpressionssamen mit dem in den Wildtyp-Samen verglichen werden. Zur Beachtung der biologischen Variabilität, wurden jeweils die Samen von drei homozygoten Nachkommen der Überexpressionslinien OE1 (1a-3, 1a-12, 1a-14) und OE2 (4-4, 4-12, 4-16) vereint. Von allen zu analysierenden Proben (WT, OE1, OE2) gingen acht biologische Replikate mit einem Samenpool von 20 Samen in die Untersuchung ein. Für die Normierung der Proben wurde diesen während der Extraktion Sorbitol-13C als interner Standard zugefügt. Eine weitere Normierung der Messwerte basierte auf den Samenfrischgewichten. Die erste Auswertung der gaschromatographischen Rohdaten erfolgte mit Hilfe des *TagFinder* (Luedemann *et al.*, 2008). Die relativen Intensitäten der annotierten Metabolite sind in der Tabelle 13 dargestellt. Jene, deren Intensitäten in den beiden unabhängigen Linien signifikant erhöht bzw. erniedrigt waren, wurden hervorgehoben. Die Analyse zeigte, dass die samenspezifische Überexpression der *BnSCE3* und der daraus resultierende direkte Eingriff in den Sekundärstoffwechsel, in erster Linie in den Sinapatestermetabolismus, auch signifikante Auswirkungen auf verschiedene Bereiche des Primärstoffwechsels hat.

[34] Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Potsdam-Golm, Deutschland

Tabelle 13: GC-TOF-MS-Analyse der polaren Primärmetabolite in *Brassica napus*-Samen der transgenen *BnSCE3*-Überexpressionslinien (OE1, OE2) und in Wildtypsamen (WT). Alle annotierten Metabolite sind mit den relativen Intensitäten (*ratio*) und den *P*-Werten bezogen auf die Wildtyp-Kontrolle aufgelistet. Die Bestimmung der Intensitäten erfolgte mittels GC-TOF-MS in jeweils acht biologischen Replikaten der Überexpressionslinien OE1 und OE2 und des Wildtyps mit einem Gemisch von 20 Samen. Die Signifikanz wurde mit der Varianzanalyse (ANOVA) ermittelt. Signifikante Unterschiede in beiden transgenen Linien sind hervorgehoben (Schwellenwert: *ratio* 1,5 und 0,7). KEEG-ID: Identifizierung des Metaboliten in der KEEG-Datenbank, OE1: Überexpressionslinie 1, OE2: Überexpressionslinie 2, WT: Wildtyp, *P*-Wert: Signifikanzniveau

Metabolit	**Summenformel**	**KEGG-ID**	**Relative Intensität der Metabolite**			
			OE1/WT		**OE2/WT**	
			ratio	***P*-Wert**	***ratio***	***P*-Wert**
Organische Säuren						
Arabinonat	$C_5H_{10}O_6$	C00545	0,90	1,8E-01	0,82	4,1E-03
Citrat	$C_6H_8O_7$	C00158	**0,78**	**3,4E-03**	**0,82**	**3,1E-03**
Erythronat	$C_4H_8O_5$	NA	**1,24**	**1,9E-04**	**1,65**	**8,6E-04**
Fumarat	$C_4H_4O_4$	C00122	**0,15**	**8,4E-08**	**0,11**	**5,1E-08**
Galactonat	$C_6H_{12}O_7$	C00880	1,14	6,4E-02	0,72	1,0E-04
Gluconat	$C_6H_{12}O_7$	C00257	1,31	2,1E-01	1,44	2,9E-01
Glutarat, 2-OH-	$C_5H_8O_5$	C03196	0,92	1,6E-01	0,87	1,7E-02
Glycolat	$C_2H_4O_3$	C00160	0,96	5,1E-01	0,85	6,8E-02
Gulonat	$C_6H_{12}O_7$	C00800	**1,23**	**1,0E-03**	**1,24**	**7,5E-03**
Hexadecanoat	$C_{16}H_{32}O_2$	C00249	1,05	2,0E-01	1,11	3,5E-03
Hexanoat	$C_6H_{12}O_2$	C01585	1,26	7,4E-02	1,30	6,4E-02
Ribonat	$C_5H_{10}O_6$	C01685	0,97	6,2E-01	0,93	2,8E-01
Saccharat	$C_6H_{10}O_8$	C00767	1,03	7,5E-01	1,20	3,0E-02
Stearat	$C_{18}H_{36}O_2$	C01530	1,09	6,0E-02	1,12	6,3E-03
Succinat	$C_4H_6O_4$	C00042	**1,65**	**3,5E-05**	**1,40**	**5,6E-06**
Threonat	$C_4H_8O_5$	C01620	0,62	4,2E-05	0,88	1,4E-01
Polyole						
Arabitol	$C_5H_{12}O_5$	C01904	1,10	9,0E-02	1,85	1,7E-10
Ethanolamin	C_2H_7NO	C00189	1,22	1,8E-01	1,17	2,4E-01
Galactinol	$C_{12}H_{22}O_{11}$	C01235	**2,02**	**3,9E-07**	**2,11**	**1,4E-08**
Glycerol	$C_3H_8O_3$	C00116	1,16	6,3E-01	0,81	4,5E-02
Inositol, myo-	$C_6H_{12}O_6$	C00137	0,85	1,2E-01	0,77	1,4E-02
Maltitol	$C_{12}H_{24}O_{11}$	NA	1,56	3,1E-01	1,71	2,6E-01
Mannitol	$C_6H_{14}O_6$	C00392	**1,96**	**2,4E-11**	**2,28**	**4,4E-09**
Sorbitol	$C_6H_{14}O_6$	C00794	**1,74**	**7,1E-03**	**1,29**	**1,3E-02**
Monosaccharide						
Glucose	$C_6H_{12}O_6$	C00031	0,66	1,4E-05	1,66	4,2E-01
Fructose	$C_6H_{12}O_6$	C00095	1,13	8,0E-01	1,73	5,5E-01
Oligosaccharide						
Saccharose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	C00089	1,02	8,8E-01	0,94	6,9E-01
Raffinose	$C_{18}H_{32}O_{16}$	C00492	**0,60**	**2,7E-04**	**0,61**	**8,8E-04**
Aminosäuren						
γ-Aminobutanoat	$C_4H_9NO_2$	C00334	1,25	2,2E-01	1,14	3,5E-01
Asparagin	$C_4H_8N_2O_3$	C00152	**0,54**	**2,6E-06**	**0,59**	**6,0E-06**
Aspartat	$C_4H_7NO_4$	C00049	**1,68**	**3,4E-05**	**1,27**	**8,0E-03**
Glutamat	$C_5H_9NO_4$	C00025	1,10	7,8E-02	1,04	4,4E-01
Glutamin	$C_5H_{10}N_2O_3$	C00064	0,70	2,4E-01	0,56	5,3E-02
Histidin	$C_6H_9N_3O_2$	C00135	1,54	9,6E-03	1,03	8,2E-01

Isoleucin	$C_6H_{13}NO_2$	C00407	1,05	7,3E-01	0,76	1,1E-01
Leucin	$C_6H_{13}NO_2$	C00123	1,05	6,9E-01	0,88	3,8E-01
Lysin	$C_6H_{14}N_2O_2$	C00047	1,84	9,7E-04	1,31	6,3E-02
Phenylalanin	$C_9H_{11}NO_2$	C00079	**0,59**	**1,0E-07**	**0,60**	**3,0E-07**
Pipecolat	$C_6H_{11}NO_2$	C00408	**0,12**	**1,1E-02**	**0,22**	**2,7E-02**
Prolin	$C_5H_9NO_2$	C00148	0,61	4,5E-01	0,38	1,8E-01
Pyroglutamat	$C_5H_7NO_3$	C02238	1,18	4,0E-03	1,06	2,5E-01
Serin	$C_3H_7NO_3$	C00065	**0,41**	**4,3E-09**	**0,51**	**1,3E-07**
Threonin	$C_4H_9NO_3$	C00188	1,13	2,5E-01	0,88	1,8E-01
Tryptophan	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	C00078	1,01	9,4E-01	0,61	6,5E-05
Tyrosin	$C_9H_{11}NO_3$	C00082	0,70	1,2E-01	0,65	5,4E-02
Valin	$C_5H_{11}NO_2$	C00183	1,13	4,8E-01	0,80	2,2E-01
Phosphate						
Guanosine-5-P	$C_{10}H_{14}N_5O_8P$	C00144	1,07	7,9E-01	1,05	8,6E-01
Glycerol-3-P	$C_3H_9O_6P$	C00093	**1,30**	**3,1E-03**	**1,30**	**3,3E-03**
Glycerophosphoglycerol	$C_6H_{15}O_8P$	C03274	1,12	1,6E-01	1,30	1,7E-02
Phosphat	H_3O_4P	C00009	1,20	6,7E-02	1,10	2,5E-01
Nitroverbindungen						
Nicotinat	$C_6H_5NO_2$	C00253	1,30	1,6E-03	1,07	1,9E-01
2-Pyridon	C_5H_5NO	C02502	1,11	2,1E-01	1,01	8,9E-01

NA - KEGG Komponenten-ID ist nicht verfügbar

Die Unabhängige Komponentenanalyse (ICA, *Independent Component Analysis*) verdeutlicht die klare Trennung des dargestellten Metabolitenprofils der Wildtyp (WT)- von den Überexpressionssamen (OE1, OE2; Abbildung 24).

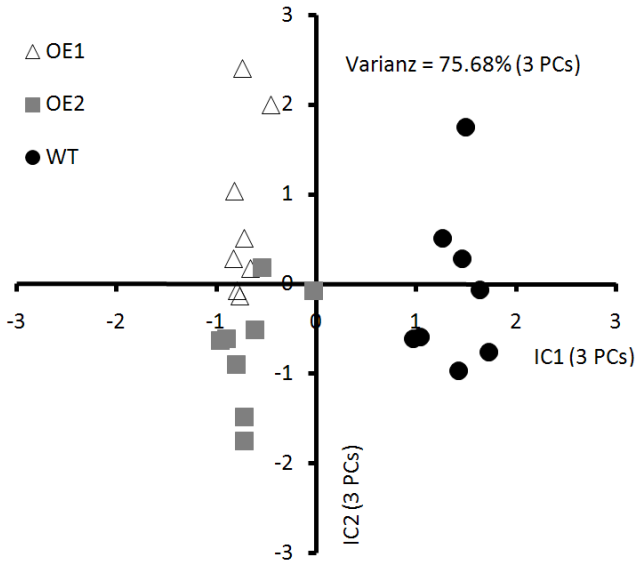


Abbildung 24: Unabhängige Komponentenanalyse (ICA) der polaren Primärmetabolitenprofile der *Brassica napus*-Wildtyp (WT ●)- und Überexpressionssamen (OE1 ■, OE2 △). Bei den Überexpressionslinien OE1 und OE2 wurden die ausgewählten homozygoten Nachkommen pro Linie analysiert (OE1-3,-12,-14 und OE2-6,-12,-16). Die Datenpunkte verdeutlichen das Metabolitenprofil der einzelnen biologischen Replikate (n=8).

Wie die Ergebnisse des durchgeführten *Metabolite Profilings* (Tabelle 13) herausstellen, sind verschiedene Bereiche des Primärstoffwechsels durch die *BnSCE3*-Überexpression unter-

schiedlich stark beeinflusst, wie zum Beispiel die der organischen Säuren, der Polyole, der Zucker und der Aminosäuren.

Bezüglich der Metaboliten des Citratzyklus konnte eine signifikante Erhöhung des Succinatgehaltes festgestellt werden, während der Fumaratgehalt deutlich reduziert vorlag. Innerhalb der Polyole zeigten die Ergebnisse eine signifikante Erhöhung der Galactinol-, Mannitol- und Sorbitolgehalte. Bei den Aminosäuren waren die Gehalte von Asparagin, Phenylalanin, Pipecolat und Serin stark erniedrigt, während sich der Aspartatgehalt in den Samen der Überexpressionslinien erhöhte. Das Oligosaccharid Raffinose wurde in geringeren Mengen nachgewiesen, während Glycerol-3-Phosphat in erhöhten Mengen vorlag.

Der Gehalt an freiem Cholin wurde mit Hilfe des Choline/Acetylcholine Quantification Kits von BioCat[35] ermittelt (2.5.6.). Dieser einfache und sensitive Test ermöglichte die Quantifizierung des Cholingehaltes mittels Fluoreszenz.

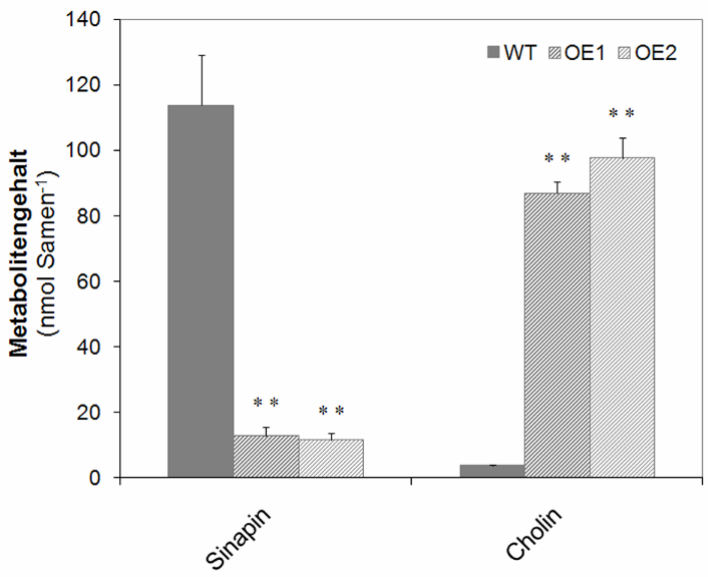


Abbildung 25: Gegenüberstellung des Sinapin- und Cholingehaltes in *Brassica napus*-Wildtyp (WT)- und *BnSCE3*-Überexpressionssamen, dargestellt in nmol pro Samen. Die Metabolitengehalte wurden aus je drei biologischen und je drei technischen Replikaten ermittelt. Bei den Überexpressionslinien OE1 und OE2 wurden je drei biologische Replikate der drei ausgewählten homozygoten Nachkommen analysiert (OE1-3,-12,-14 und OE2-6,-12,-16). Die Daten wurden mit dem *t*-Test statistisch ausgewertet (*P*-Werte: ** ≤ 0,01).

Die Quantifizierung ergab, dass der Gehalt an freiem Cholin in den transgenen Samen der Überexpressionlinien OE1 und OE2 22- bzw. 24-fach höher war als in den Wildtypproben (Abbildung 25). Dabei führt die induzierte enzymatische Aktivität der BnSCE3 in reifen Rapssamen zur Abnahme des Sinapingehaltes um durchschnittlich 90% pro Samen. Das durch die Hydrolyse des Sinapins freiwerdende Cholin scheint den äquivalenten Anstieg des Cholingehaltes zu bedingen.

[35] BioCat, Heidelberg, Deutschland

3.6.6. Auswirkungen auf den Lipidgehalt

Bereits die Untersuchungen zur Substratspezifität (3.2.1.) der BnSCE ließen einen möglichen Zusammenhang zwischen der BnSCE3 und dem Lipidgehalt in den Samen vermuten (Abbildung 9). Dabei wurde mittels Dünnschichtchromatographie (DC) nachgewiesen, dass die BnSCE3 *in vitro* in der Lage ist, Phosphatidylcholin (PC) zu hydrolysieren, nicht aber Triacylglycerin (TAG). Somit lag die Vermutung nahe, dass die samenspezifische Überexpression der *BnSCE3* zu einer Erniedrigung des PC-Gehaltes in den transgenen Rapssamen führt, wohingegen der TAG-Gehalt unverändert bleiben sollte.

Die nachfolgenden Untersuchungen zu den Auswirkungen der *BnSCE3*-Überexpression auf den Lipidgehalt, erfolgten in Kooperation mit Prof. Dr. Ruth Welti und Mary R. Roth[36]. Es wurden jeweils fünf Replikate von jeweils sechs reifen Wildtyp-Samen bzw. reifen Samen der transgenen homozygoten *BnSCE3*-Überexpressionslinien OE1 und OE2 analysiert. Zu Beginn wurde mittels Gaschromatographie (GC) der Gesamtfettsäuregehalt bestimmt (2.5.4.). Die Zusammensetzung des Fettsäuregehaltes lag in den Wildtypsamen bei 3% Palmitinsäure (16:0), 2% Stearinsäure (18:0), 74% Ölsäure (18:1), 18% Linolsäure (18:2) und 4% α-Linolensäure (18:3). Für die Samen der Überexpressionslinien OE1 und OE2 konnten ähnliche Werte ermittelt werden, die sich nicht signifikant vom Wildtypniveau unterschieden (Abbildung 26).

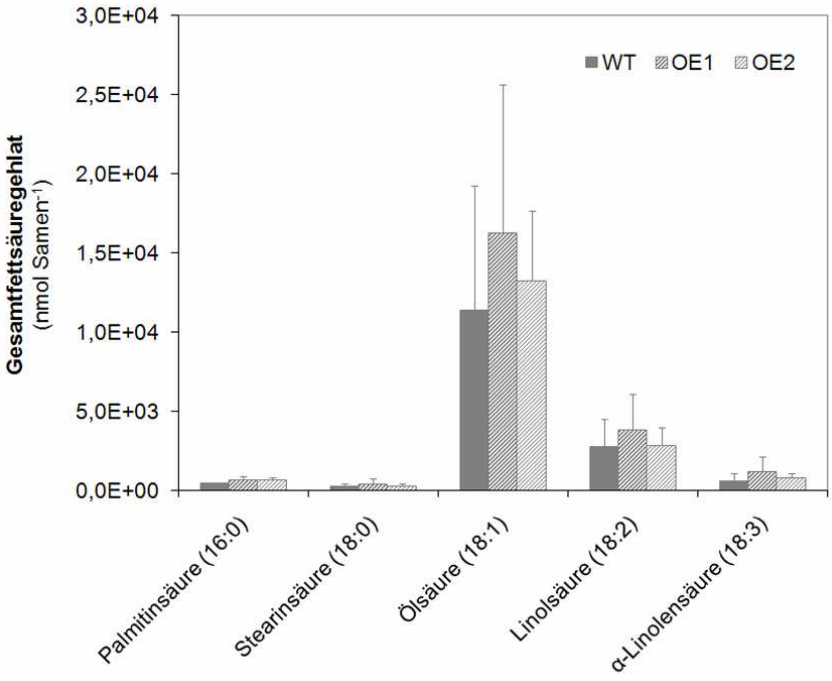


Abbildung 26: Analyse der Gesamtfettsäuregehalte der Wildtyp (WT)- und homozygoten BnSCE3-Überexpressionssamen (OE1, OE2) mittels GC in nmol pro Einzelsamen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte von fünf biologischen Replikaten.

[36] Kansas Lipidomics Research Center, Kansas State University, Kansas, USA

Die massenspektrometrische Untersuchung des Lipidgehaltes verschiedener Substanzklassen der Lipide ist in Abbildung 27 dargestellt. Signifikante Veränderungen zwischen den Gehalten der Wildtyp- und Überexpressionssamen ließen sich bei den Glycerophospholipiden Phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylinositol (PI) beobachten. Die Gehalte in nmol pro Einzelkorn lagen in den Samen der Überexpressionslinien OE1 und OE2 erhöht vor. Eine deutliche Erhöhung in beiden Überexpressionslinien konnte ebenfalls für die Phosphatidsäure detektiert werden. Bei den untersuchten Galactolipiden Digalactosyldiacylglycerol (DGDG) und Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) ergaben sich keine deutlichen Unterschiede.

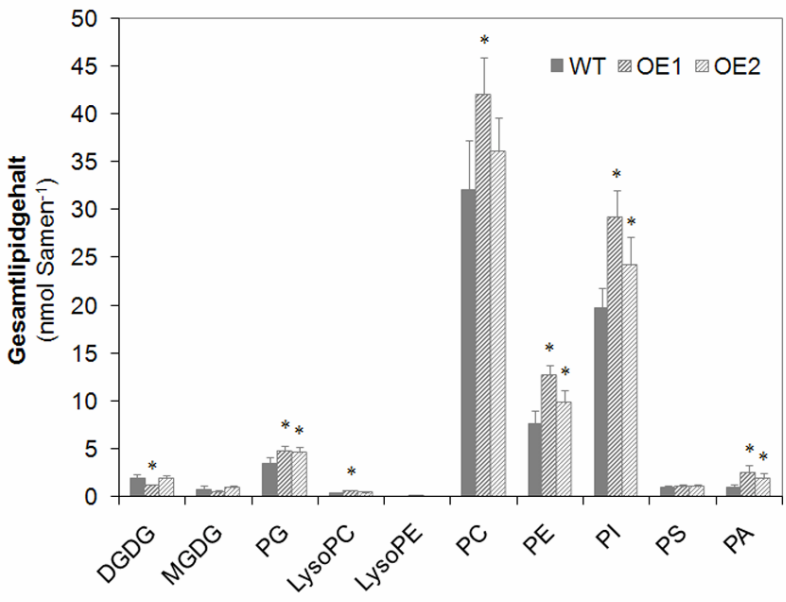


Abbildung 27: Analyse der Gesamtlipidgehalte der Wildtyp (WT)- und homozygoten BnSCE3-Überexpressionssamen (OE1 und OE2) mittels ESI-MS/MS in nmol pro Einzelsamen. DGDG (Digalactosyldiacylglycerol), MGDG (Monogalactosyldiacylglycerol), PG (Phosphatidylglycerol), LysoPC (Lysophosphatidylcholin), LysoPE (Lysophosphatidylethanolamin), PC (Phosphatidylcholin), PE (Phosphatidylethanolamin), PI (Phosphatidylinositol), PS (Phosphatidylserin), PA (Phosphatidsäure). Die Daten repräsentieren Mittelwerte von fünf biologischen Replikaten. Die mit einem Stern markierten Werte unterscheiden sich signifikant von den Wildtypwerten ($P \leq 0{,}05$; *t*-Test).

Die umfangreiche Analyse der Lipidspezies (Abbildung 28) verdeutlichte, dass die Erhöhung der Glycerophospholipidgehalte in den Überexpressionssamen (Abbildung 27) jeweils auf diverse Phospholipidspezies zurückzuführen war und nicht auf eine bestimmte Spezies.

Für PC stellten sich die Spezies 36:2 und 36:3 (Anzahl Acylkohlenstoff: Anzahl der Doppelbindungen) mit über 70% des gesamten PC als Hauptspezies heraus. Angesichts der Fettsäurezusammensetzung werden diese PC-Varianten hauptsächlich durch 18:1-18:1- und 18:1-18:2-Acylkombinationen bestimmt.

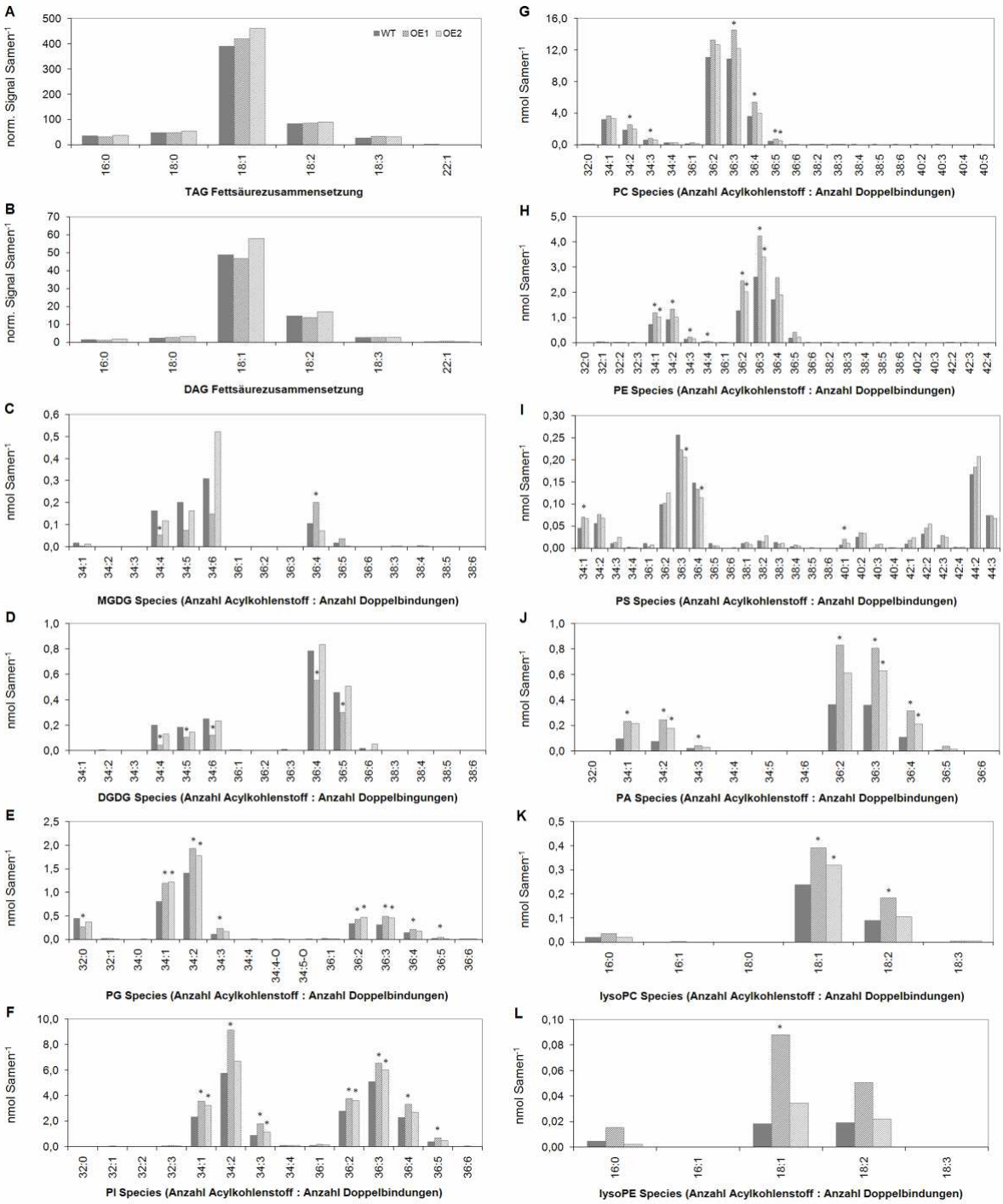


Abbildung 28: Analyse der Lipidspezies der Wildtyp (WT)- und homozygoten BnSCE3-Überexpressionssamen (OE1, OE2) mittels ESI-MS/MS. TAG (Triacylglycerol), DAG (Diacylglycerol), MGDG (Monogalactosyldiacylglycerol), DGDG (Digalactosyldiacylglycerol), PG (Phosphatidylglycerol), PI (Phosphatidylinositol), PC (Phosphatidylcholin), PE (Phosphatidylethanolamin), PS (Phosphatidylserin), PA (Phosphatidsäure), LysoPC (Lysophosphatidylcholin), LysoPE (Lysophosphatidylethanolamin). Die Daten repräsentieren Mittelwerte von fünf biologischen Replikaten. Die mit einem Stern markierten Werte unterscheiden sich signifikant von den Wildtypwerten ($P \leq 0{,}05$; *t*-Test).

Die anderen extraplastidär gebildeten Phospholipide PE, PS und PI zeichneten sich ebenfalls durch einen hohen Anteil an Spezies aus, die 36 C-Atome enthielten. In den analysierten Rapssamen zählten die 34:5- und 34:6-Kombinationen zu den Hauptvarianten bei den MGDG-Spezies, wobei 34:6 MGDG eine 16:3-18:3-Kombination repräsentiert.

3.6.7. Einfluss auf die Sekundärmetabolite im Keimungsverlauf

Der folgende Versuch diente der Feststellung, inwieweit sich die samenspezifische Überexpression der *BnSCE3* auf die Sekundärmetabolite im Verlauf der Keimung auswirkt. Es sollten hierbei sowohl ganze Keimpflanzen, als auch isolierte Keimblätter untersucht werden. Da die Expression der *BnSCE3* unter der Kontrolle des samenspezifischen napin590-Promotors des Napingens erfolgte, ist die Expression der Esterase im Samen am stärksten (Blundy *et al.*, 1991; Jiang *et al.*, 1996; Ellerström *et al.*, 1996). Die Pflanzen wurden für 20 Tage im Gewächshaus auf Erde angezogen. Alle vier Tage erfolgte die Probenentnahme. Das jeweilige verwendete Pflanzenstadium ist in Abbildung 29 dargestellt.

Abbildung 29: Dokumentation der *Brassica napus*-Keimlinge im Verlauf von 20 Tagen für die Analyse ganzer Keimpflanzen. Abgebildet sind *Brassica napus*-Wildtyppflanzen. Der Balken entspricht 5 cm.

Die Untersuchung der vollständigen Keimpflanzen erfolgte in Kooperation mit Dr. Edda von Roepenack-Lahaye[37]. Es wurden Wildtypkeimpflanzen und die homozygoten F3-Nachkommen der Überexpressionslinien OE1 und OE2 analysiert (OE1-3,-12,-14 und OE2-6,-12,-16). Zur methanolischen Extraktion der Metabolite diente gemörsertes, lyophilisiertes Pflanzenmaterial (2.5.1.). Für die Normierung der Proben wurden den Extrakten interne Standards zugefügt. Eine weitere Normierung der Messwerte erfolgte aufgrund der Menge des eingesetzten lyophilisierten Pflanzenmaterials. Mittels dieser Methode war es möglich, den Gehalt der Metabolite für eine Keimpflanze zu berechnen. Es wurden alle signifikant veränderten Metabolite, die während des *Metabolite Profilings* der Samen identifiziert wur-

[37] Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Abt. Stress- und Entwicklungsbiologie, Halle (Saale), Deutschland

den, ebenfalls für den Keimungsverlauf analysiert. Alle signifikant veränderten Massensignale wurden nachfolgend pro Keimlingsstadium vereint (Abbildung 30).

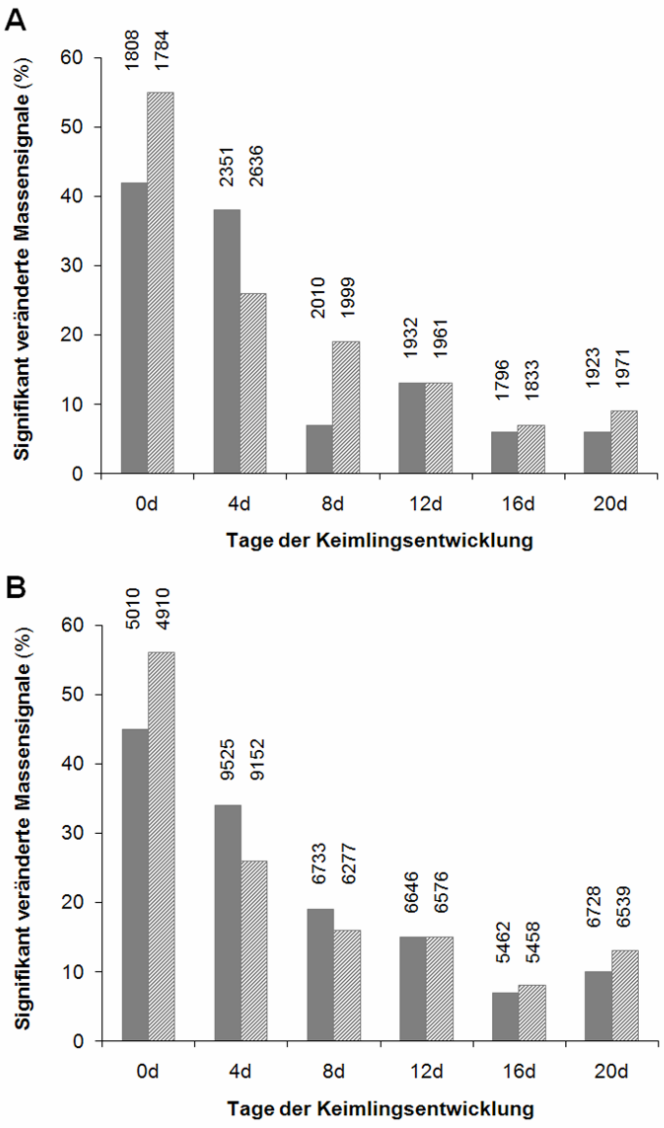


Abbildung 30: Prozentual veränderte Massensignale in den Totalextrakten der Überexpressionslinien OE1 (dunkelgrau) und OE2 (hellgrau gestreift) im Vergleich zu den Wildtypsamen bzw. -keimlingen (A). Prozentual veränderte Massensignale in den cholinesterabgereicherten Extrakten der Überexpressionslinien OE1 (dunkelgrau) und OE2 (hellgrau gestreift) im Vergleich zu den Wildtypsamen bzw. -keimlingen (B). Die genaue Anzahl der detektierten Massensignale in jeder Probenklasse ist über den jeweiligen Balken angegeben.

Dadurch wurde deutlich, dass die noch während des Samenstadiums vorhandenen starken Unterschiede zwischen den Wildtyp- und den Überexpressionsproben im Laufe der Keimlingsentwicklung immer geringer werden. In dem letzten analysierten Keimlingsstadium von 20 Tage alten Rapskeimlingen lagen die Unterschiede nur noch bei 10%. Eine Auswahl an Metaboliten, die in den reifen Überexpressionssamen besonders stark akkumulieren und bei denen diese Erhöhung bis in die frühen Keimlingsstadien nachzuweisen ist, sind in Abbildung 31 dargestellt. Dabei handelt es sich um die bereits beschriebenen Sinapoyl- und Sinapathexosekonjugate, Guaiacylkonjugate und Methylsinapat (3.6.4.).

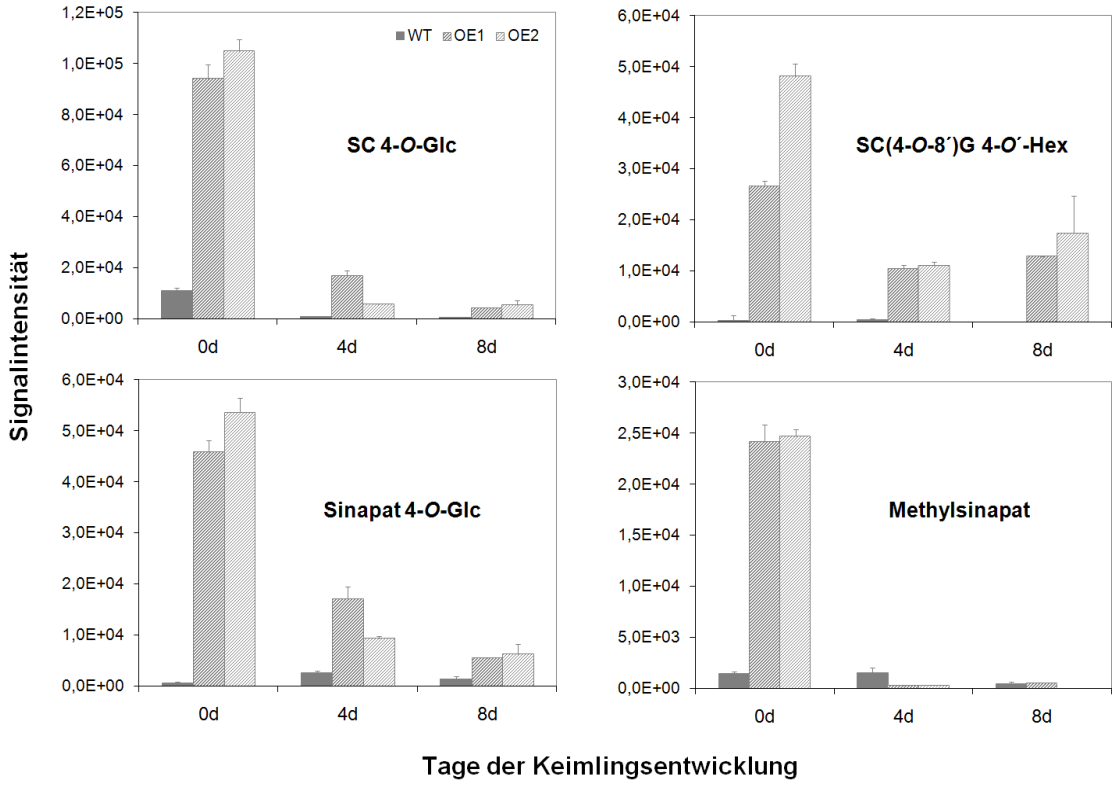


Abbildung 31: Darstellung der Gehalte von Sinapoylcholin-4-*O*-Glucosid (SC 4-*O*-Glc), Sinapoylcholin (4-*O*-8´) Guaiacyl 4-*O*´-Hexosid (SC(4-*O*-8´)G 4-*O*´-Hex), Sinapat-4-*O*-Glucosid (Sinapat 4-*O*-Glc) und Methylsinapat in *Brassica napus*-Wildtyp (WT)- und *BnSCE3*-Überexpressionssamen bzw. den entsprechenden Keimlingsstadien (4d und 8d). Dargestellt ist die ermittelte normierte Signalintensität pro Samen bzw. Keimpflanze. Die Metabolitengehalte wurden aus je drei biologischen Replikaten ermittelt. Bei den Überexpressionslinien OE1 und OE2 wurden je drei biologische Replikate der drei ausgewählten homozygoten Nachkommen analysiert (OE1-3,-12,-14 und OE2-6,-12,-16).

Für ausgewählte Metabolite wurde die Analyse mit den isolierten Keimblättern wiederholt. Pro Extraktion wurde dabei ein Keimblattpaar eingesetzt (Abbildung 32). Untersucht wurden Wildtypkeimpflanzen und homozygotes Samenmaterial der *BnSCE3*-Überexpressionslinien OE1 und OE2 (OE1-3,-12,-14 und OE2-6,-12,-16). Für die methanolische Extraktion der Metaboliten wurde gemörsertes Pflanzenmaterial eines Keimblattpaares eingesetzt (2.5.1.). Es wurden jeweils drei biologische Replikate analysiert (2.5.3.).

Die in Abbildung 33 dargestellte Analyse des Sinapin-, Sinapoylmalat- und Sinapoylglucosegehaltes in den Samen bzw. Keimblattpaaren der Wildtyp- bzw. *BnSCE3*-Überexpressionspflanzen OE1 und OE2 zeigte eine deutliche Reduktion des Sinapingehaltes in den reifen Samen (null Tage) und eine verzögerte Sinapoylmalatakkumulation in den jungen transgenen Keimpflanzen.

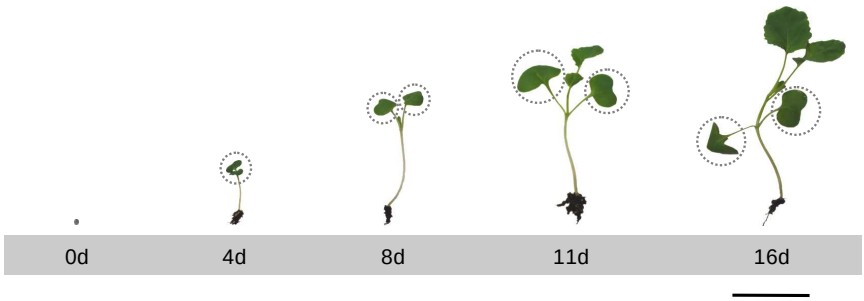


Abbildung 32: *Brassica napus*-Keimlinge im Verlauf von 16 Tagen für die Analyse der isolierten Keimblattpaare (grau gestrichelter Kreis). Abgebildet sind *Brassica napus*-Wildtyppflanzen. Der Balken entspricht 5 cm.

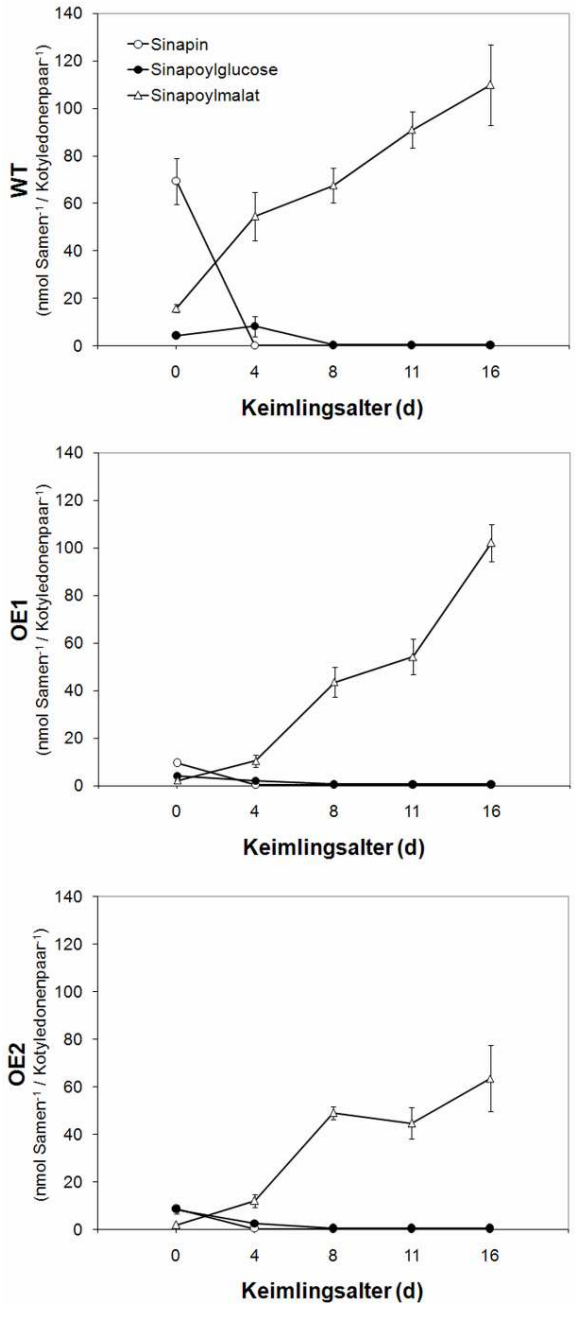


Abbildung 33: Sinapin-, Sinapoylglucose- und Sinapoylmalatgehalt in reifen Samen und Keimblättern sich entwickelnder *Brassica napus*-Wildtyp (WT)- und BnSCE3-Überexpressionspflanzen (OE1, OE2). Die Keimblätter wurden paarweise nach 4, 8, 11 und 16 Tagen geerntet. Die methanolischen Extrakte wurden mittels UPLC analysiert. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte ± sd von fünf biologischen Replikaten.

3.6.8. Einfluss von UV-B-Strahlung auf die Keimung

Die Bedeutung sekundärer Pflanzenstoffe wie Flavonoide, Hydroxyzimtsäuren und ihrer Konjugate bezüglich ihrer UV-schützenden Funktion ist in der Literatur hinreichend beschrieben (Landry *et al.*, 1995; Booij-James *et al.*, 2000; Caldwell *et al.*, 2007). Bei den generierten transgenen Rapspflanzen handelt es sich um samenspezifische *BnSCE3*-Überexpressionslinien. Es konnte gezeigt werden, dass die transgenen Samen und Keimpflanzen dieser Linien einen reduzierten Sinapingehalt, eine verzögerte Akkumulation von Sinapoylmalat in den Keimblättern (Abbildung 33) und weitere Veränderungen im Sekundärstoffwechsel aufweisen (Tabelle 11, 12). Daher sollte der Einfluss der UV-B-Strahlung während der Keimung untersucht werden.

Erfolgt eine uneingeschränkte Keimung der transgenen Samen unter erhöhter UV-B-Strahlung, wie entwickeln sich die Keimpflanzen aufgrund der verzögerten Akkumulation der UV-protektiven Komponente Sinapoylmalat in den Keimblättern und gibt es UV-B induzierte metabolische Unterschiede?

Die Samen konnten Dank der Unterstützung von Dr. Andreas Albert[38] in einem Sonnensimulator unter definierten UV-B-Bedingungen auskeimen (2.8.). Es wurden jeweils 100 Samen der Wildtyp-Kontrolle und der Überexpressionslinien OE1 und OE2 auf feuchter Erde ausgelegt. Nach drei Tagen wurde die Keimungsrate der Samen bestimmt. Die transgenen Samen keimen, wie die Wildtypsamen, unter beiden Konditionen (-UV-B, +UV-B) ohne signifikante Unterschiede (Daten nicht gezeigt).

Die starke Erniedrigung des Sinapingehaltes und weiterer phenolischer Sekundärstoffe durch die samenspezifische Überexpression der Sinapinesterase (*BnSCE3*) scheint auf die Keimung unter UV-B-Exposition keine Auswirkungen zu haben. Jedoch ließen sich an den jungen Keimpflanzen erste Unterscheide zwischen den Kontroll- und den UV-B-Expositionsbedingungen dokumentieren. Die Keimpflanzen, die unter UV-B-Bestrahlung wuchsen, unabhängig davon, ob es sich um die Wildtyp- oder transgenen Keimpflanzen handelte, zeigten eine deutliche Rotfärbung des Hypokotyls. Nach acht Tagen war dieser Unterschied besonders deutlich zu erkennen (Abbildung 34).

[38] Abteilung Experimentelle Umweltsimulation am Institut für biochemische Pflanzenpathologie, Helmholtz Zentrum München, München, Deutschland

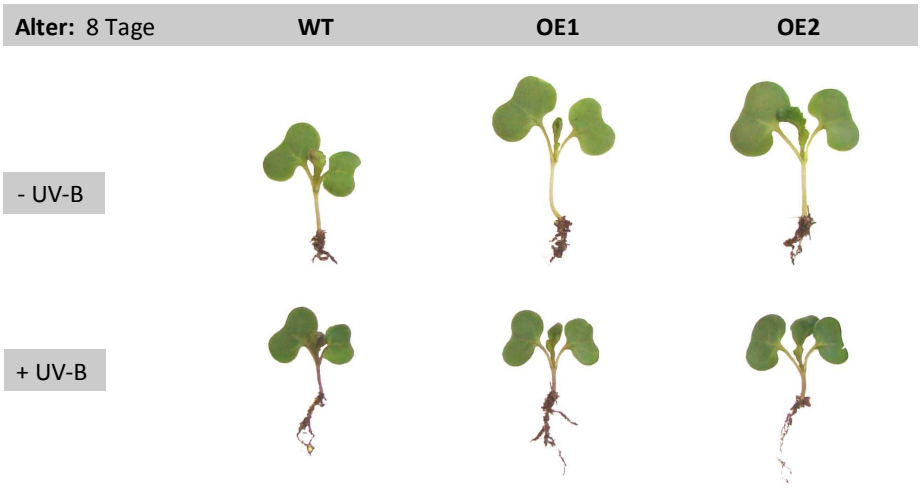


Abbildung 34: Exemplarische Übersicht der Phänotypen der acht Tage alten Keimpflanzen (WT - Wildtyp, OE1 - Überexpressionslinie 1, OE2 - Überexpressionslinie 2), welche ohne (-UV-B) bzw. mit UV-B-Strahlung (+UV-B) angezogen wurden.

Jedoch schienen die Wildtypkeimpflanzen zu diesem Zeitpunkt eine stärkere Rotfärbung des Hypokotyls aufzuweisen und damit stärker auf den UV-B-Stress zu reagieren. Weitere dokumentierte UV-B-Stressreaktionen bei den Wildtyp- und transgenen Keimpflanzen waren die deutliche Wölbung der Keimblatträndер nach oben. Zusätzlich waren die Keimblätter der gestressten Pflanzen wesentlich kleiner als unter den jeweiligen Kontrollbedingungen. Unter Kontrollbedingungen war das Hypokotyl bei den transgenen Keimpflanzen deutlich länger als bei den Wildtyppflanzen. Dieser Effekt konnte bereits bei vorherigen Keimungsversuchen beobachtet werden (Tabelle 9). Jedoch schien dieses Phänomen unter UV-B-Stress nicht aufzutreten. Unter UV-B-Bedingungen waren keine signifikanten Größenunterschiede zwischen den Keimpflanzen (WT, OE1, OE2) festzustellen.

Bei den elf Tage alten Keimpflanzen bestätigte sich die Annahme, dass der Wildtyp stärker auf die UV-B-Exposition reagiert als die Keimpflanzen der Überexpressionslinien OE1 und OE2. Die Wildtyppflanzen waren kleiner und die Rotfärbung der Hypokotyle, der Blattstengel und Blattadern auf der Blattunterseite der Keim- und Primärblätter stärker ausgeprägt (Abbildung 35).

Für die Untersuchungen möglicher UV-B induzierter Veränderungen der Blattmetabolite wurden unterschiedliche Keimblattstadien analysiert. Pro methanolischer Extraktion wurde ein gemörsertes Keimblattpaar eingesetzt (2.5.1.).

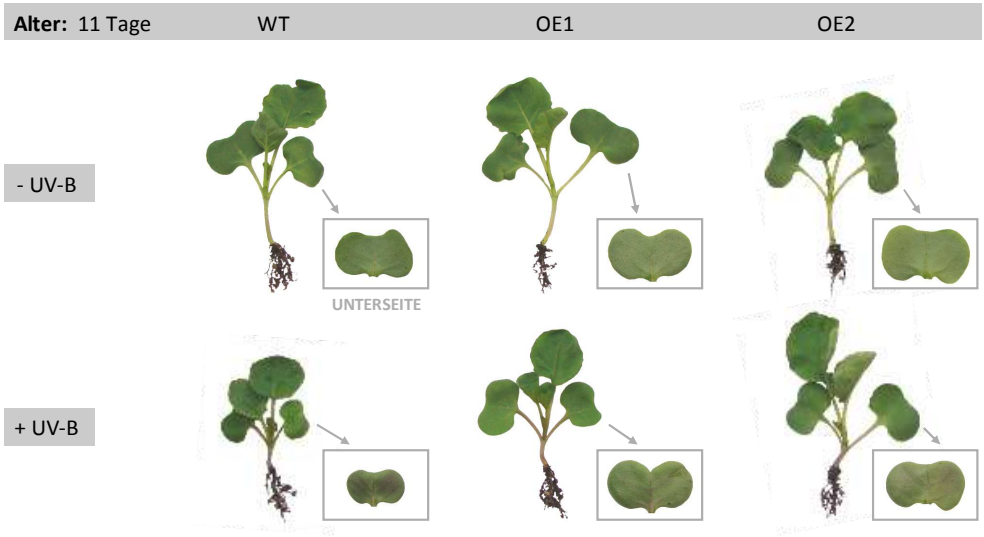


Abbildung 35: Exemplarische Übersicht der Phänotypen der elf Tage alten Keimpflanzen (WT - Wildtyp, OE1 - Überexpressionslinie 1, OE2 - Überexpressionslinie 2), welche ohne (-UV-B) bzw. mit UV-B-Strahlung (+UV-B) angezogen wurden. Zu jeder Keimpflanze ist exemplarisch die vergrößerte Aufnahme einer Keimblattunterseite abgebildet.

Untersucht wurden Wildtyp- und Überexpressionskeimpflanzen der Linien OE1 und OE2, welche unter Kontroll- bzw. UV-B-Stress-Bedingungen angezogen wurden. Es wurden jeweils fünf biologische Replikate mittels UPLC analysiert (2.5.3.). Bei den untersuchten Sinapatestern handelte es sich um die Samenhauptkomponente Sinapin, Sinapoylglucose und das im Blatt akkumulierende Sinapoylmalat. Sie erfüllen neben den Flavonoiden ebenso die wichtige Funktion der UV-Absorbtion (Li *et al.*, 2010).

Doch inwieweit sind die *BnSCE3*-Überexpressionslinien durch ihren reduzierten Gehalt an schützenden Sinapatestern unter UV-B-Stress gegenüber den Wildtyp-Pflanzen benachteiligt?

Die nachfolgenden Abbildungen 36 und 37 fassen die Ergebnisse der analysierten Sinapatester- und Flavonoidgehalte zusammen. Die Betrachtung der Sinapatestergehalte verdeutlicht, dass es im ersten untersuchten Keimlingsstadium (vier Tage) der Wildtypproben zur Erhöhung des Sinapoylmalatgehaltes durch die UV-B-Bestrahlung kam. In den älteren Blattproben setzt sich dieser Trend jedoch nicht fort, hier kam es vielmehr zur Abnahme des Sinapoylmalatgehaltes. In den Überexpressionslinien konnten neben den bereits beschriebenen metabolischen Unterschieden, wie der Reduktion des Sinapoylmalatgehaltes (3.6.4., Tabelle 11 und 12), keine eindeutigen Unterschiede bezüglich der UV-B-Exposition detektiert werden.

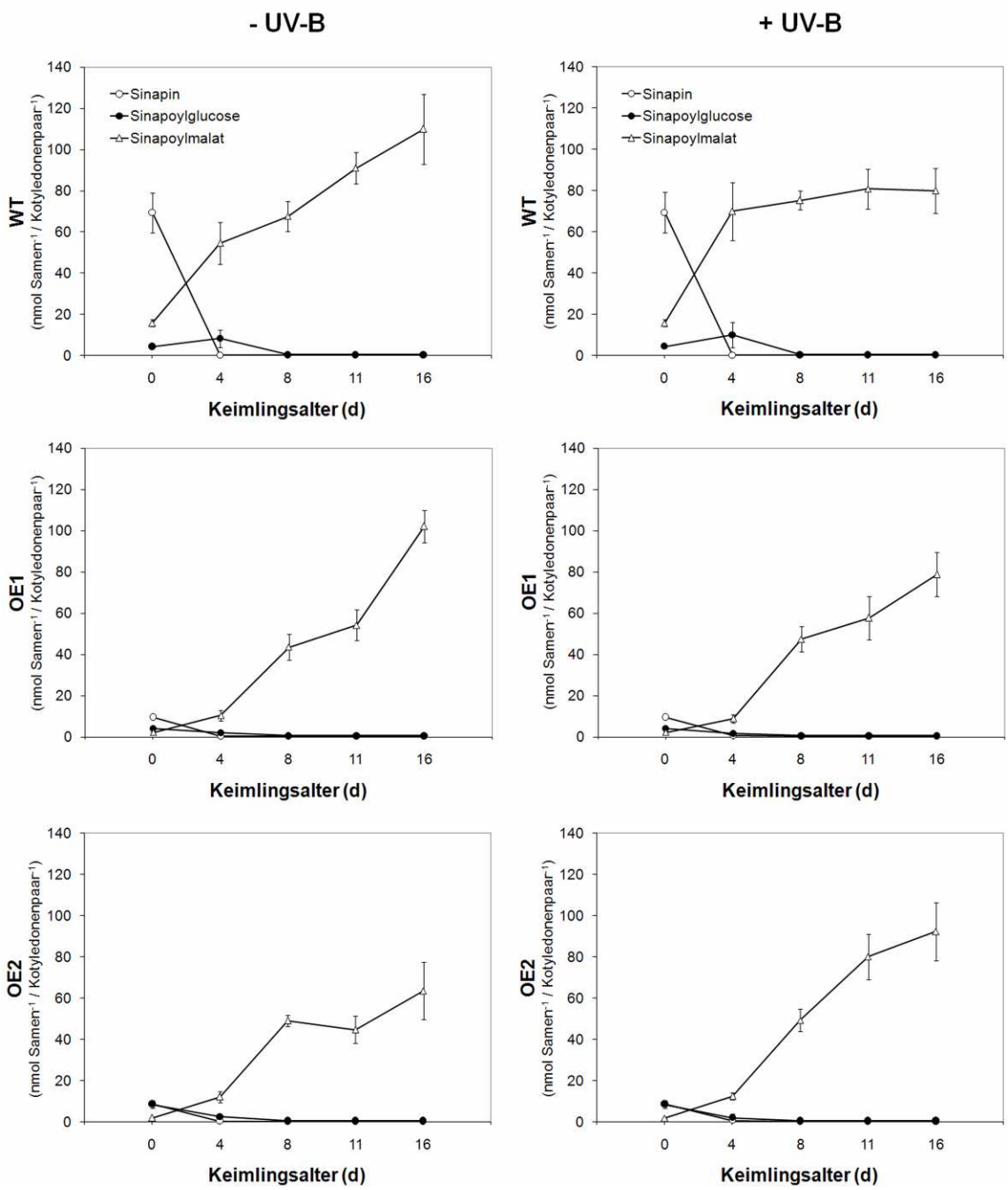


Abbildung 36: Sinapin-, Sinapoylglucose- und Sinapoylmalatgehalt in reifen Samen und Keimblättern sich entwickelnder *Brassica napus*-Wildtyp (WT)- und BnSCE3-Überexpressionspflanzen (OE1, OE2) unter Kontroll (-UV-B)- und UV-B-Stressbedingungen (+UV-B). Die Keimblätter wurden paarweise nach vier, acht, elf und 16 Tagen geerntet. Die methanolischen Extrakte wurden mittels UPLC analysiert. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte ± sd von fünf biologischen Replikaten.

Für die Analyse der Flavonoidgehalte wurden die Signale der detektierten Quercetin- und Kaempferolderivate jeweils zusammengefasst dargestellt (Abbildung 37). Unter den Kontrollbedingungen konnten bezüglich des Flavonoidgehaltes keine Unterschiede zwischen den Wildtypproben und den Proben der beiden Überexpressionslinien festgestellt werden.

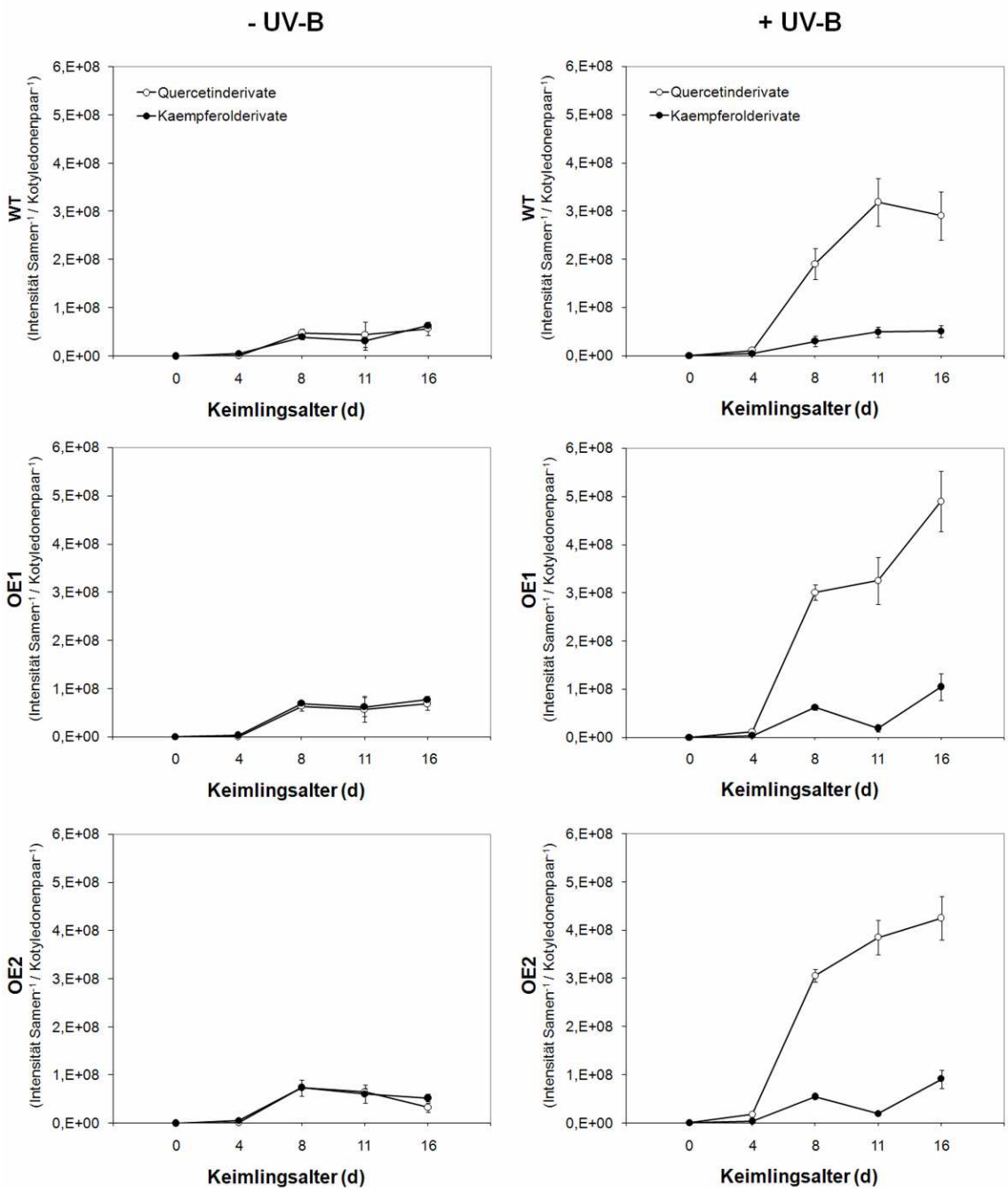


Abbildung 37: Gehalt an Quercetin- und Kaempferolderivaten in reifen Samen und Keimblättern sich entwickelnder *Brassica napus*-Wildtyp (WT)- und BnSCE3-Überexpressionspflanzen (OE1, OE2) unter Kontroll (-UV-B)- und UV-B-Stressbedingungen (+UV-B). Die Keimblätter wurden paarweise nach vier, acht, elf und 16 Tagen geerntet. Die methanolischen Extrakte wurden mittels UPLC analysiert. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte ± sd von fünf biologischen Replikaten.

Dagegen kam es durch die UV-B-Bestrahlung in allen untersuchten Proben zu einer deutlichen Erhöhung der detektierten Quercetinderivate. Die analysierten Kaempferolderivate veränderten sich kaum. In den *BnSCE3*-Überexpressionslinien OE1 und OE2 stieg der Quercetin- und Kaempferolderivatanteil unter UV-B-Bestrahlung noch stärker an im Vergleich zu den analysierten Wildtypkeimblättern.

4. Diskussion

4.1. Die Identifizierung der Sinapinesterase aus *Brassica napus*

Das primäre Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung der Sinapinesterase (SCE) aus *Brassica napus*. Zu Beginn dieser Arbeit war lediglich bekannt, dass die Sinapinhydrolyse in *Raphanus sativus* und *Brassica napus* keimlingsspezifisch abläuft und die maximale Esteraseaktivität in zwei Tage alten Rapskeimlingen detektiert werden kann (Strack, 1977; Strack, 1981; Milkowski *et al.*, 2004). Das Aktivitätsmaximum der SCE korreliert dabei mit dem starken Abfall des Sinapingehalts während der Keimung (Abbildung 2). Da keinerlei Sequenzinformationen des Enzyms vorlagen, wurde der klassische Weg der Proteinreinigung gewählt, um die SCE aus *Brassica napus* isolieren und identifizieren zu können. Dabei wurden drei Esteraseaktivitäten in dem Keimlingsstadium mit der höchsten Sinapinesteraseaktivität (Milkowski *et al.*, 2004), detektiert (BnSCE1, BnSCE2, BnSCE3; Abbildung 5; Clauss *et al.*, 2008). Mittels acht chromatographischer Reinigungsschritte wurde die BnSCE3, als aktivste und am geringsten kontaminierte Fraktion, bis zur Homogenität aufkonzentriert. Der abschließende Reinigungsschritt resultierte in zwei dicht nebeneinander liegenden Proteinbanden (Haupt- und Nebenbande; Abbildung 5). Die Größe dieser Proteinbanden betrug zwischen 44 und 46 kDa. Gelfiltrationsexperimente ergaben mit 47 kDa eine ähnliche Größe, was die Schlussfolgerung zulässt, dass es sich bei der BnSCE3 (Hauptbande) um ein monomeres Protein handelt. Die Proteinbanden wurden ausgeschnitten und einem tryptischen Verdau sowie massenspektrometrischen Untersuchungen unterzogen, um erste Sequenzinformationen über die aufgereinigte Enzymaktivität zu erhalten. Die Nebenbande ergab keine Sequenzinformation. Mit Hilfe der ermittelten Peptide der Hauptproteinbande konnten degenerierte Primer abgeleitet werden. Diese führten zur Amplifikation eines 471 bp großen cDNA-Fragmentes der SCE, welches den 3′-Bereich eines offenen Leserahmens umfasste. Nachdem mittels 5′-RACE-Technik die fehlende 5′-Region der putativen SCE amplifiziert wurde, konnte mit Hilfe abgeleiteter Primer die vollständige cDNA der putativen Sinapinesterase aus *Brassica napus* (BnSCE3) kloniert werden. Sequenzvergleiche identifizierten die BnSCE3 als bereits beschriebene BnLIP2 (GDSL ähnliche Lipase 2, Accession Nr. AY871275, Ling *et al.*, 2006). Ling und Mitarbeiter vermuteten, dass die BnLIP2 in Fettstoffwechselprozesse der Pflanzenentwicklung und -morphogenese involviert sein könnte (Ling *et al.*, 2006).

Die geringen Größenunterschiede der BnSCE3, ermittelt durch SDS-PAGE und Gelfiltration, deuten darauf hin, dass das Protein in seiner nativen Form möglicherweise modifi-

ziert vorliegt. Die innerhalb der Sequenz detektierten fünf putativen Glycosidierungsstellen unterstützen diese Vermutung (Abbildung 7). Bei den Fraktionen BnSCE1 und BnSCE2 handelt es sich möglicherweise um Isoformen der BnSCE3.

Die heterologe Überexpression des Proteins in *Escherichia coli* führte zu keinem aktiven Protein. Durch die heterologe Überexpression der isolierten *BnSCE3*-cDNA in *Nicotiana benthamiana* konnte die Funktionalität des Enzyms jedoch nachgewiesen werden. Die heterolog überexprimierte und nachfolgend isolierte BnSCE3 setzte Sinapin zu freier Sinapinsäure und Cholin um (Abbildung 8). Dieses Ergebnis lieferte den ersten eindeutigen Beweis dafür, dass die isolierte Enzymaktivität Sinapinesteraseaktivität besitzt. Desweiteren spiegelt sich die entwicklungsabhängige Regulation der Esteraseaktivität auch im Transkriptgehalt des Gens wieder, der zwischen dem ersten und zweiten Tag der Keimlingsentwicklung deutlich ansteigt (Abbildung 11). Bis zum sechsten Tag bleibt der Transkriptgehalt auf hohem Niveau, bevor er bis zum zwölften Tag abfällt. Die verbreitete Expression der *BnLIP2 (BnSCE3)* in Geweben wie Wurzel, Stängel, Blatt, Knospe und Blüte (Ling *et al.*, 2006), könnte ein Hinweis darauf sein, dass das Enzym möglicherweise in verschiedene Stoffwechselwege involviert ist, da in diesen Organen das natürliche Substrat des Enzyms - Sinapin - nicht vorkommt.

Ling *et al.* (2006) vermuteten des Weiteren, dass die untersuchte *BnLIP2 (BnSCE3)* in mehr als sechs Kopien im *Brassica napus*-Genom vorkommt. Die im Zuge dieser Arbeit durchgeführten *Southern Blot*-Untersuchungen (Daten nicht gezeigt) bestätigten diese Ergebnisse. Somit könnte es sich bei den beiden Fraktionen BnSCE1 und BnSCE2 um Isoenzyme der BnSCE3 handeln, die durch andere Gene kodiert werden. Die amphidiploide Art *Brassica napus* setzt sich aus den Chromosomensätzen von *Brassica napus* und *Brassica oleracea* zusammen (U, 1935), somit sind für jedes Gen mehrere Kopien zu erwarten.

4.2. Die *BnSCE3* und ihre homologen Gene in *Arabidopsis thaliana*

Durch vergleichende Untersuchungen mit der Brassicaceae *Arabidopsis thaliana* und *in silico*-Analysen der Domänen- und Motivstruktur der BnSCE3 konnte gezeigt werden, dass die isolierte Sinapinesterase der Klasse der GDSL-Lipase ähnlichen Proteine zuzuordnen ist und die cDNA starke Ähnlichkeit zu annotierten Genen von *Arabidopsis thaliana* aufweist. So konnten vier *Arabidopsis*-Sequenzen identifiziert werden, die mit bis zu 80% eine sehr hohe Ähnlichkeit zur BnSCE3 auf Aminosäureebene aufzeigen - *At1g28640*, *At1g28650*, *At1g28660*, *At1g28670*, welche in Tandem-Orientierung auf dem Chromosom 1 lokalisiert sind (Clauss *et al.*, 2008). Die Analyse der *Arabidopsis thaliana*-Proteine, welche,

wie die BnSCE3, ebenfalls zur Gruppe der GDSL-Lipasen gehören, sollte klären, inwieweit sie überhaupt eine Rolle im Sinapinstoffwechsel spielen. Die Überprüfung der Funktionalität erfolgte ebenfalls durch die Überexpression der cDNAs im pflanzlichen Expressionssystem *Nicotiana benthamiana*. Die entsprechenden Proteinextrakte wurden mittels Sinapinesterase-Assay auf ihre hydrolytische Aktivität untersucht. Bis auf die putative GDSL-Lipase At1g28640, waren alle anderen rekombinanten Proteine unter den durchgeführten Testbedingungen in der Lage, Sinapin zu Sinapinsäure und Cholin zu hydrolysieren (Abbildung 12). Für At1g28640 konnte ein solcher Umsatz nicht gezeigt werden, obwohl das korrespondierende Gen am ersten Tag der Keimlingsentwicklung zumindest schwach exprimiert wird (Abbildung 13). Für die anderen untersuchten putativen GDSL-Lipasen konnte ein hoher Transkriptgehalt in der gesamten, analysierten Keimlingsphase nachgewiesen werden (Abbildung 13). Die Transkripte der *At1g28670* konnten zusätzlich in reifen Blättern detektiert werden, wo Sinapin als mögliches Substrat nicht vorkommt. Somit könnte *At1g28670*, wie auch für *BnSCE3* vermutet, in weitere Stoffwechselprozesse der Pflanzen involviert sein (Akoh *et al.*, 2004; Ling *et al.*, 2006).

Der erfolgreiche Funktionstest der exprimierten Gene *At1g28650*, *At1g28660* und *At1g28670* unterstreicht die Vermutung, dass es sich bei den drei putativen GDSL-Lipasen um Homologe zur *BnSCE3* in *Arabidopsis thaliana* handelt. Nachfolgend wurden für die jeweiligen Gene homozygote Linien von T-DNA-Insertionsmutanten generiert (Übersicht Abbildung 14). Auch für *At1g28640* wurden entsprechende Mutanten untersucht, obwohl das heterolog überexprimierte Protein Sinapin nicht umsetzen konnte.

Der Funktionsverlust der jeweiligen Gene in T-DNA-Insertionsmutanten sollte sich auf den Sinapinstoffwechsel und damit direkt auf den Sinapingehalt auswirken. Anzunehmen wäre eine unterdrückte Sinapinhydrolyse und die daraus resultierende Sinapinakkumulation während der Keimung. Die Messung des Sinapingehaltes erfolgte in ein und drei Tage alten *Arabidopsis*-Keimlingen. Alle untersuchten *Knockout*-Linien zeigten bezüglich des prozentualen Sinapinverlustes jedoch nicht den erwarteten Effekt der Sinapinakkumulation. Der Sinapingehalt veränderte sich vom ersten zum zweiten Keimpflanzenstadium signifikant, jedoch wiederum nicht so dramatisch wie im Wildtyp (Abbildung 15). In den Wildtypkeimpflanzen reduzierte sich der Sinapingehalt während der frühen Keimlingsphase um 98%. In jeder der analysierten *knockout*-Linien betrug der prozentuale Verlust durchschnittlich 74%, das heißt es konnte ein eindeutiger, jedoch im Vergleich zum Wildtyp verzögerter, keimungsinduzierter Abbau des Sinapins beobachtet werden. Diese Befunde weisen darauf hin, dass jede der vier untersuchten putativen GDSL-Lipasen am

Sinapinabbau während der frühen Keimlingsentwicklung beteiligt ist. Ein Wildtyp-ähnlicher Sinapinabbau setzt möglicherweise die Funktionalität aller vier Gene voraus (Abbildung 15). Es wurde außerdem deutlich, dass der Ausfall eines der Enzyme keine drastischen Auswirkungen auf den Sinapinabbau hat. Der Abbau von Sinapin wird in *Arabidopsis thaliana* vermutlich additiv durch mehrere Enzyme realisiert. In der Literatur gibt es einige Beispiele für Gene, die vermutlich aus Genduplikationen entstanden sind und ähnliche Funktionen ausüben. Die *SMT* aus *Arabidopsis thaliana* liegt in einem tandemartig organisierten Genverband auf Chromosom 2, wobei die entsprechenden Enzyme alle dieselbe Spezifität gegenüber Sinapin aufweisen (Stehle *et al.*, 2009). Im Gegensatz zu prokaryotischen Genomen, in denen die Gene in Operon-Strukturen organisiert sind, wurde lange Zeit angenommen, dass die Gene eukaryotischer Genome zufällig verteilt vorliegen und nicht operon-ähnlich lokalisiert sind (Amoutzias und Van de Peer, 2008). Durch Genomdatenanalysen, beispielsweise von *Caenorhabditis elegans* und *Saccharomyces cerevisiae*, wurde geschlussfolgert, dass auch eukaryotische Gene in Genverbänden organisiert sein können, die in gemeinsamen Stoffwechselwegen aktiv sind (Hurst *et al.*, 2004; Wong und Wolfe, 2005; Yi *et al.*, 2007). Vermutlich ermöglicht diese Art der genomischen Organisation eine koordinierte Genexpression und Kopplung funktionell verwandter Gene. Die Organisation funktionell verwandter Gene in Genomverbänden scheint für die Organismen von evolutionärem Vorteil zu sein (Amoutzias und Van de Peer, 2008). Einige metabolische *Cluster* konnten in den letzten Jahren identifiziert werden. Beispielsweise die Gene der Diterpenbiosynthese in *Oryza sativa*, der Triterpenbiosynthese in *Avena sativa* und *Arabidopsis thaliana* (Gierl und Frey, 2001; Qi *et al.*, 2004; Shimura *et al.*, 2007; Field und Osbourn, 2008).

4.3. Die Charakterisierung der BnSCE3 als GDSL-ähnliche Lipase

Aufgrund von Motivanalysen und Sequenzvergleichen konnte die isolierte BnSCE3 eindeutig als GDSL-Lipase-ähnliches Enzym identifiziert werden (AY871275; Ling *et al.*, 2006; Clauss *et al.*, 2008). Die anderen, in den Sinapatesterstoffwechsel involvierten Enzyme leiten sich von der Klasse der SCPL-Proteine ab. In früheren Arbeiten (Fraser *et al.*, 2005) wurde das auch für die SCE angenommen. Diese leitet sich jedoch von den GDSL-Lipasen ab. Proteinsequenzen, die Ähnlichkeiten zur BnSCE3 bis zu 83% aufweisen, konnten in *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Triticum aestivum* und *Zea mays* identifiziert werden (Ling *et al.*, 2006; Clauss *et al.*, 2008). Denkbar wäre, bei Betrachtung der molekularen Evolution der Enzyme, dass ein ursprünglich auf den Lipidstoffwechsel spezialisiertes Enzym wäh-

rend der Evolution einer Neofunktionalisierung unterlag und die Funktion beispielsweise auf Cholinester ausgeweitet wurde (Tabelle 7).

Die GDSL-Lipasen sind in eukaryotischen und prokaryotischen Organismen verbreitet (Akoh *et al.*, 2004). Sie stellen eine Untergruppe der Lipasen dar, die durch das charakteristische GDSL/I-Sequenzmotiv im N-terminalen Bereich des Proteins definiert sind (Upton und Buckley, 1995; Akoh *et al.*, 2004). Das aktive Zentrum der GDSL-Lipasen ist sehr flexibel und kann mittels *Induced Fit*-Mechanismus verschiedenartige Substrate akzeptieren (Akoh *et al.*, 2004). Dies ist die Grundlage der breiten Substratspezifität dieser Enzymklasse. Bisher konnten einige pflanzliche GDSL-Lipasen identifiziert werden. Ihre spezifischen Funktionen im Stoffwechsel konnten jedoch nur für einige Enzyme aufgeklärt werden. Sie spielen vermutlich eine Rolle bei Abwehrprozessen, denn ihre Expression kann durch Salicylsäure und die Interaktion mit Pathogenen gesteigert werden, wodurch die Widerstandskraft der Pflanze erhöht wird (Lee und Cho, 2003; Hong *et al.*, 2008; Kwon *et al.*, 2009). Ebenso konnte die Induktion einiger GDSL-Lipasen bei verschiedenen abiotischen Stressoren beobachtet werden (Naranjo *et al.*, 2006; Riemann *et al.*, 2007; Hong *et al.*, 2008). Desweiteren konnte die Beteiligung der GDSL-Lipasen an hormonell regulierten Wachstums- (Kiba *et al.*, 2005; Cao *et al.*, 2006) und anderen Entwicklungsprozessen (Mayfield *et al.*, 2001; Riemann *et al.*, 2007), wie der Samenkeimung (Cao *et al.*, 2006; Kondou *et al.*, 2008) gezeigt werden. Die Aufklärung der Funktion, die die einzelnen GDSL-Lipasen erfüllen, wird durch ihre außergewöhnlich breite Substratspezifität erschwert (Ling *et al.*, 2006). Innerhalb der Lipase-Unterklasse der GDSL-Proteine gehört die BnSCE3 zur Untergruppe der SGNH-Hydrolasen, die durch vier Aminosäurereste Serin, Glycin, Aspartat, Histidin in vier konservierten Peptidblöcken gekennzeichnet sind (Ling *et al.*, 2006). Dabei sind die Aminosäuren Serin, Aspartat und Histidin Bestandteil der katalytischen Triade dieser Enzymklasse und somit von entscheidender Bedeutung für die enzymatische Funktionalität dieser Proteine.

Die Untersuchung der Substratspezifität der nativen BnSCE3 und der zwei Esterasefraktionen BnSCE1 und 2 bestätigte die für die Klasse der GDSL-Lipasen typisch außergewöhnlich breite Substratspezifität. Die Enzymfraktionen wurden mit 16 unterschiedlichen phenolischen Substraten sowie mit zwei Vertretern der Lipide auf ihre enzymatische Aktivität getestet (Tabelle 7; Clauss *et al.*, 2008). Die phenolischen Substanzen wurden dabei systematisch anhand verschiedener Eigenschaften ausgewählt, um Rückschlüsse auf die Bedeutung der Anzahl und Beschaffenheit der Substituenten am aromatischen Ring, der Struktur der Seitenkette sowie der gebundenen Reste auf die enzymatische Aktivität ablei-

ten zu können (Abbildung 38). Die Ergebnisse verdeutlichen, dass innerhalb der Hydroxyzimtsäure-Cholinester Sinapin das favorisierte Substrat darstellt, gefolgt von Cinnamoylcholin für BnSCE3 und Feruoylcholin für BnSCE1 und 2 (Tabelle 7).

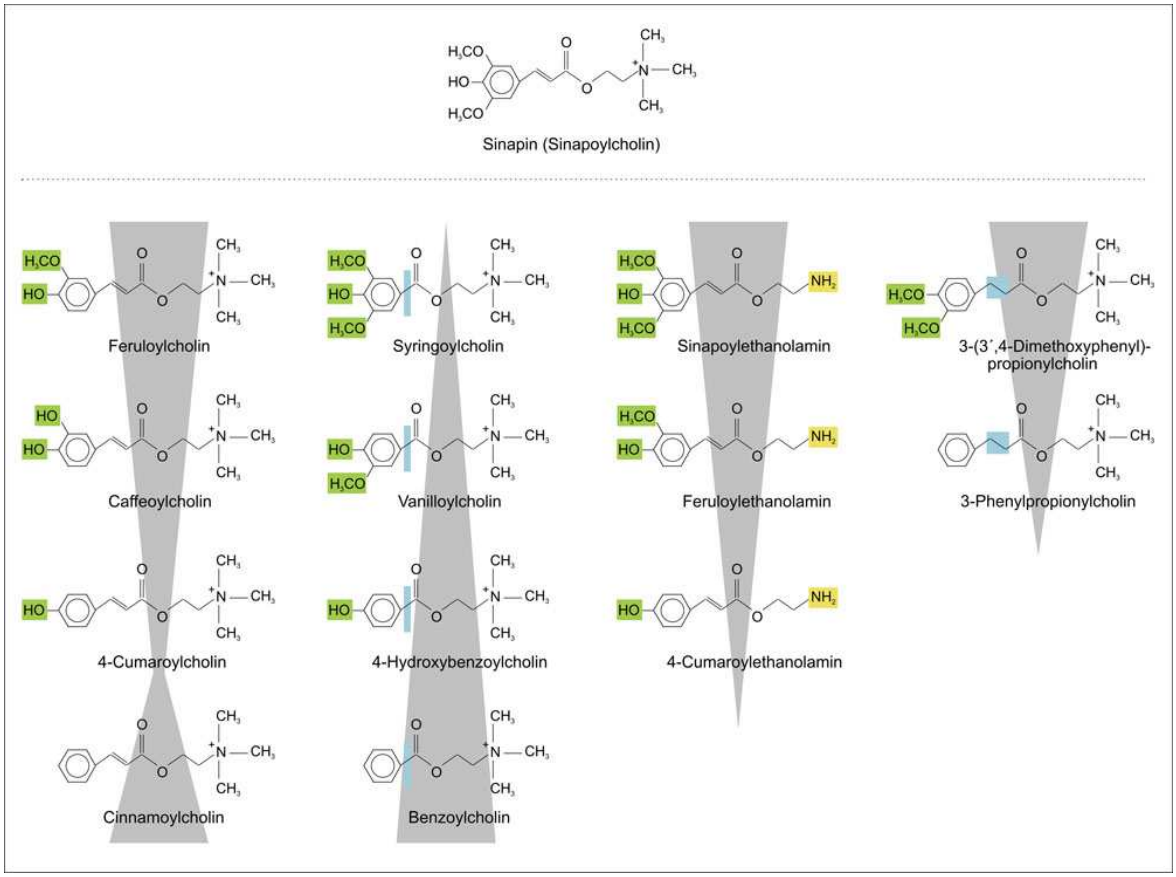


Abbildung 38: Darstellung der verwendeten phenolischen Verbindungen zum Test der Substratspezifität der BnSCE1, BnSCE2 und BnSCE3. Die Verbindungen wurden in wichtigen Charakteristika modifiziert: Substituenten am aromatischen Ring (grün), Kettenlänge und Vorhandensein der Doppelbindung in der Seitenkette (blau) und die Wahl des Restes am Ende der Seitenkette (gelb). Die grauen Dreiecke im Hintergrund der Verbindungen symbolisieren die jeweilige relative Aktivität der BnSCE3.

Eine Verkürzung der Seitenkette der Phenylpropanoidsubstrate führt zu einer drastischen Reduktion der enzymatischen Aktivität. Komponenten mit einer stark verkürzten Seitenkette, wie zum Beispiel Syringoylcholin, werden unter den hier angewendeten Testbedingungen als Substrat nicht erkannt. Im Gegensatz dazu führt das Fehlen der Doppelbindung in der C_3-Seitenkette, wie bei 3-Phenylpropionylcholin, zu einer starken Erhöhung der Enzymaktivität, weit über die für Sinapin gemessene Aktivität hinaus. Der Vergleich von Cinnamoylcholin zu 3-Phenylpropionylcholin macht deutlich, dass im Fall der BnSCE3 allein das Fehlen der Doppelbindung zu einer fast 50-fachen Erhöhung der Enzymaktivität führt. Der Austausch des Cholinrestes gegen Ethanolamin hat den gegenteiligen Effekt. Dieser führt zu einer reduzierten enzymatischen Aktivität. Die Spezifität beruht demzufol-

ge auf dem Phenylpropan-Teil der phenolischen Substanzen und dem Cholinrest. Um die überraschenden Ergebnisse der Verbindungen 3-Phenylpropionylcholin und Cinnamoylcholin, die sich lediglich in einer Doppelbindung unterscheiden (Abbildung 38), näher zu untersuchen, wurden die kinetischen Konstanten dieser Reaktionen im Vergleich zu Sinapin ermittelt (Tabelle 8). Dabei zeigte sich, dass die hohe Umsatzrate des Substrates 3-Phenylpropionylcholin auf die durchschnittlich 40-fach höhere Maximalgeschwindigkeit (V_{max}) im Vergleich zu den anderen Substanzen zurückzuführen ist. Die katalytische Effizienz (V_{max}/K_m) ist für Sinapin jedoch am größten, direkt gefolgt von 3-Phenylpropionylcholin und am geringsten für Cinnamoylcholin. Die Affinität der BnSCE3 ist wie erwartet für Sinapin, als angenommenes Hauptsubstrat, 40-mal höher als für 3-Phenylpropionylcholin und 4-mal mal höher als für Cinnamoylcholin. Die zwei getesteten Sinapoylkonjugate Sinapoylglucose und Sinapoylmalat, wichtige Hauptkomponenten im Stoffwechsel der Sinapatester (Milkowski *et al.*, 2004), stellten keine Substrate dar. Diese Komponenten sind keine Cholinester und verdeutlichen dadurch die Wichtigkeit des Cholinrestes für die Spezifität der BnSCE3. Für die *Raphanus sativus*-Sinapinesterase war das nicht der Fall, da diese auch Sinapoylglucose als Substrat akzeptierte (Nurmann und Strack, 1979). Für die BnSCE3 scheint das Vorhandensein des Cholinrestes ein entscheidendes Kriterium für die Aktivität des Enzyms zu sein.

Bedingt durch die Zuordnung des Enzyms zur Klasse der GDSL-Lipasen wurden auch Lipide als potenzielle Substrate getestet (Abbildung 9; Clauss *et al.*, 2008). Phosphatidylcholin wurde von allen drei Fraktionen umgesetzt. Triacylglycerol, als Vertreter der Neutralfette, wurde nicht hydrolysiert. Die hydrolytische Freisetzung von Ölsäure aus Phosphatidylcholin durch die BnSCE-Aktivitäten deutet auf eine Phospholipase A-Aktivität (PLA-Aktivität) der BnSCE-Fraktionen (Wang, 2001) hin. Die PLA spaltet Phospholipide entweder am ersten (PLA_1) oder am zweiten Kohlenstoffatom (PLA_2) des Glycerins.

Aufgrund der Sequenzähnlichkeit zu GDSL-Lipasen, bei denen sich die katalytische Triade aus den Aminosäuren Serin, Aspartat und Histidin zusammensetzt, sollte mit dem Serinhemmer Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) die Bedeutung des Serinrestes bei der Sinapinhydrolyse untersucht werden (Abbildung 10; Clauss *et al.*, 2008). Die Behandlung des Enzyms mit dem Inhibitor ergab eine eindeutige Beteiligung eines Serinrestes (Fahrney und Gold, 1963) bei der enzymatischen Aktivität des Enzyms bezüglich Sinapin.

Die samenspezifische Überexpression der *BnSCE3* und die daraus resultierende Reduktion des Sinapingehaltes bestätigen die Vermutung, dass die BnSCE3 als GDSL-Lipase-

ähnliches Enzym in die Sinapinhydrolyse *in planta* involviert ist. Somit scheinen die GDSL-Lipasen während der Evolution neue Funktionen im Phenylpropanoidstoffwechsel übernommen zu haben. Mitglieder dieser Enzymfamilie könnten sich während der Evolution aufgrund ihres flexiblen aktiven Zentrums (*Induced Fit*) als geeignete Kandidaten erwiesen haben, um Funktionen im Sekundärstoffwechsel, wie der Sinapinhydrolyse, zu übernehmen. Durch Kristallstrukturanalysen und entsprechende *Docking*-Experimente könnten die breite Substratspezifität und Plastizität des Enzyms weiter untersucht werden und zusammen mit phylogenetischen Analysen Hinweise über dessen evolutive Entwicklung geben. Leider konnten diese Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus Zeitgründen nicht mehr durchgeführt werden.

4.4. Engineering des Sinapinstoffwechsels

Aufgrund verschiedener antinutritiver, phenolischer Inhaltsstoffe ist die Nutzung des wertvollen eiweißreichen Samenproteins von *Brassica napus* für die Ernährung stark limitiert (Ismail *et al.*, 1981; Bell, 1993; Bhinu *et al.*, 2009). Da Sinapin den größten Anteil der phenolischen Komponenten im Samen einnimmt (Ismail *et al.*, 1981; Kozlowska *et al.*, 1983; Shahidi und Naczk, 1992; Bhinu *et al.*, 2009), ist die Reduktion des Sinapingehaltes eine essenzielle Vorraussetzung für die Nutzung der Rapsproteine in der Tierfutter- und Lebensmittelindustrie.

Charakteristisch für die Vertreter der *Brassicaceae* ist das Vorkommen von Sinapatestern mit Sinapin als Hauptkomponente und taxonomischem Merkmal. Verschiedene *Brassica*-Spezies zeichnen sich durch beträchtliche Schwankungen des Sinapatestergehaltes aus (Bouchereau *et al.*, 1991; Kräling *et al.*, 1991; Matthäus, 1997; Wang *et al.*, 1998; Zum Felde *et al.*, 2006). So konnten z.B. Velasco und Möllers (1998) durch die vergleichende Studie von 1.361 Rapssamenproben zeigen, dass der Sinapatestergehalt von 5 bis 18 mg/g Samen variiert. Es war bisher nicht möglich, durch klassische Züchtungsprogramme Rapspflanzen mit einem niedrigen Sinapatestergehalt zu generieren (Zum Felde *et al.*, 2007). Durch die vollständige Identifizierung aller am Sinapinstoffwechsel beteiligten Enzyme (Abbildung 1) besteht die Möglichkeit, molekularbiologisch in den Stoffwechsel einzugreifen. Die Identifizierung der Sinapinesterase im Zuge dieser Arbeit stellte sich als wichtiger Ausgangspunkt zur Modifikation des Sinapinstoffwechsels heraus. Dabei sollte die Eignung einer samenspezifischen *BnSCE3*-Überexpression als molekularer Ansatz zur Sinapinreduktion überprüft werden (Clauss *et al.*, 2008).

Mit unterschiedlichen die Sinapinsynthese betreffenden molekularen Ansätzen, wurde dieses Ziel in der Vergangenheit bereits verfolgt. Strategien, um die Sinapinbiosynthese durch die Manipulationen des frühen Phenylpropanoidstoffwechsels zu unterdrücken, beruhten auf der *antisense-* bzw. dsRNAi-Suppression folgender Enzyme: Ferulat-5-Hydroxylase (*fah1*; Nair *et al.*, 2000), Cinnamat-4-Hydroxylase (*c4h*), 4-Cumaratester-3-Hydroxylase (*c3h*) und Caffeat-*O*-Methyltransferase (*comt*) (Bhinu *et al.*, 2009). Diese Ansätze stellten sich jedoch als wenig effektiv hinsichtlich einer Sinapinabsenkung heraus. Im Gegensatz dazu schienen sich die späteren Schritte der Sinapinbiosynthese besser zu eignen. So zeigten Hüsken *et al.* (2005), dass die Suppression der UDP-Glucose:Sinapinsäure-Glucosyltransferase (SGT, UGT84A9) mittels dsRNAi eine Reduktion des Sinapingehaltes in *Brassica napus*-T3-Samen bis zu 72% im Vergleich zum Wildtyp verursacht. Der Gesamtsinapatestergehalt konnte um 76% reduziert werden. Dabei änderten sich die Zusammensetzung und der Gehalt des Öls, des Proteins und der Fettsäuren nicht. Die transgenen *UGT84A9i*-Pflanzen zeigten auch noch in der sechsten Samengeneration eine stabile Sinapinsuppression (Wolfram *et al.*, 2010). Ein weiterer Ansatz bestand in der dsRNAi-vermittelten Suppression der Sinapoylglucose:Cholin-Sinapoyltransferase (SCT; Weier *et al.*, 2008), dem Schlüsselenzym der Sinapinbiosynthese. Zwar konnte der Sinapingehalt reduziert werden, doch im Zuge dieses transgenen Ansatzes erhöhte sich der Gehalt an Sinapoylglucose, dem Acyldonor für die Sinapinbiosynthese (Weier *et al.*, 2008; Bhinu *et al.*, 2009). Das ist problematisch, denn der erhöhte Sinapoylglucosegehalt kompensiert die Reduktion des Sinapingehaltes. Die nachfolgende Kombination der beiden RNAi-vermittelten Suppressionsansätze resultierte in der Reduktion des Gesamtsinapatestergehaltes auf durchschnittlich 40%. Dazu wurde ein RNAi-Konstrukt entwickelt, welches die Aktivität der SGT und der SCT samenspezifisch reduziert (Weier *et al.*, 2008; Mittasch *et al.*, 2010). Der Sinapingehalt konnte jedoch nur um 70% gesenkt werden.

Die Identifizierung der BnSCE3 ermöglichte einen neuartigen transgenen Ansatz zur Absenkung des Sinapingehaltes (Clauss *et al.*, 2008). Da die BnSCE3 die keimungsinduzierte Hydrolyse des Sinapins vermittelt, sollte die samenspezifische Überexpression des Enzyms die Biosynthese mit der Hydrolyse synchronisieren und somit zur gewünschten Reduktion des Sinapingehaltes im Samen führen. Eine organspezifische Expression bietet den großen Vorteil, zeitlich und lokal begrenzt in die Entwicklung der Pflanzen und in deren Stoffwechsel eingreifen zu können.

Die samenspezifische Überexpression der *BnSCE3* und die damit einhergehende Verschiebung der Genexpression aus der frühen Samenkeimung in die Phase der Samenreifung

konnte mit Hilfe des Napin-Promotors gewährleistet werden, der die Expression des Samenspeicherproteins Napin reguliert (Blundy *et al.*, 1991; Jiang *et al.*, 1996; Ellerström *et al.*, 1996). Vorversuche dieser samenspezifischen *BnSCE3*-Überexpressionstrategie in *Arabidopsis thaliana* bestätigten den Erfolg dieser Strategie. *BnSCE3*-überexprimierende Samen zeigten eine Reduktion des Sinapingehaltes um 94% im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 16; Clauss *et al.*, 2008). Die transgenen *BnSCE3*-überexprimierenden T2-Samen von *Brassica napus* wurden ebenfalls auf ihren Sinapingehalt untersucht. Dabei zeigte sich, dass dieser innerhalb der generierten sieben transgenen Linien von 22 bis 98% im Vergleich zu den Wildtypsamen schwankte (Abbildung 17). Die Linien T1510.1a, T1510.1b, T1510.3, T1510.4 und T1510.5 wiesen die stärkste Reduktion des Sinapingehaltes um 70 bis 78% auf. Segregationsanalysen mit Hilfe des Selektionsmarkers Basta® ergaben vier Linien, die eine Einzelkopie-Insertion des Überexpressionskonstruktes trugen. Die Linien, aufgeführt als Überexpressionslinie 1 und 2 (T1510.1a = OE1, *Overexpression Line 1* und T1510.4 = OE2, *Overexpression Line 2*), konnten im Zuge dieser Arbeit eingehend charakterisiert werden (Clauss *et al.*, 2011). Eine biochemische Segregation über den Sinapingehalt als Marker bestätigte die zu erwartende 3:1-Verteilung in den Linien mit einer Einzelkopie-Insertion. In der generierten homozygoten T3-Generation der transgenen Überexpressionslinien gelang die Reduktion des Sinapingehaltes um 90% (Abbildung 19). Bislang war es durch keinen züchterischen oder früheren molekularbiologischen Ansatz möglich, den Sinapingehalt im Samen so stark zu reduzieren.

Nach Feststellung eines deutlichen Einflusses der *BnSCE3*-Überexpression auf den Sinapingehalt, sollte der Frage nachgegangen werden, inwieweit die samenspezifisch induzierte enzymatische Aktivität der BnSCE3 und die damit einhergehende Reduktion des Sinapingehaltes Einfluss auf morphologische und physiologische Charakteristika der Rapssamen und der sich entwickelnden Pflanzen hat. Durch die breite Substratspezifität der BnSCE3 sind weitere Effekte der samenspezifischen Überexpression auf die Pflanzen möglich. Bei den durchgeführten Keimungstests zeigte sich, dass die Sinapinreduktion keinen Einfluss auf die Samenvitalität hat. Lediglich die jungen Keimpflanzen zeigten ein induziertes Wachstum. Die Hypokotyle der sechs Tage alten Keimpflanzen waren signifikant länger im Vergleich zu den Wildtyppflanzen (Tabelle 9).

Der Abbau des Sinapins während der frühen Keimlingsentwicklung ist wichtig für nachfolgende Stoffwechselschritte, wie die Sinapoylmalatbiosynthese. Sinapoylmalat akkumuliert hauptsächlich in den Vakuolen der Epidermis und schützt die Blätter vor schädigender UV-B-Strahlung (Landry *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1993; Sheahan, 1996; Booij-James *et al.*,

2000). Überraschenderweise veränderte sich der Sinapoylmalatgehalt, trotz der Sinapinreduktion, in den Samen nicht und wies lediglich eine verzögerte Akkumulation während der Keimlingsentwicklung auf (Abbildung 33). Jedoch scheinen sich diese kinetischen Unterschiede nicht auf die Widerstandskraft der keimenden Samen und der sich entwickelnden jungen Keimlinge unter erhöhter UV-B-Exposition auszuwirken (Abbildung 36). Es konnten weder signifikante metabolische, noch morphologische Veränderungen beobachtet werden, die allein auf die Wirkung der UV-B-Exposition zurückzuführen sind. Eine erste Vermutung war, dass die Sinapoylmalatbiosynthese durch die im Zuge der Überexpression akkumulierenden neuen Sinapatesterverbindungen aufrecht gehalten wird, welche während der frühen Keimlingsentwicklung abgebaut werden (Abbildung 31). Sie könnten die Sinapinsäure für die nachfolgenden Biosyntheseschritte zur Verfügung stellen. Denn auch im Sinapoylglucosegehalt konnten keine Unterschiede zwischen den transgenen Samen und den Wildtypsamen detektiert werden (Abbildung 33, 36). Die im transgenen Samen akkumulierenden Sinapatesterkonjugate SC 4-*O*-Glc, SC (4-*O*-8′)G 4-*O*′-Hex, Sinapat 4-*O*-Glc und Methylsinapat (Tabelle 11, 12; Abbildung 30) kompensieren den Sinapinverlust jedoch nicht. Des Weiteren zeigte die Untersuchung der Keimpflanzen, dass die drastischen metabolischen Veränderungen im Samen sich im Laufe der Keimlingsentwicklung (16 Tage) wieder normalisieren und sich dem Wildtypniveau angleichen (Abbildung 30). Ab dem vierten Tag der Keimlingsentwicklung setzt auch in den *BnSCE3*-Überexpressionspflanzen die Akkumulation von Sinapoylmalat ein (Abbildung 33). Das weist darauf hin, dass ab diesem Zeitpunkt die *de novo*-Synthese von Sinapoylmalat einsetzt, da die transgenen Pflanzen für die Biosynthese des Sinapoylmalates nicht auf die Reserven aus dem Sinapin zurückgreifen können. Die in den transgenen Samen akkumulierten neuen Sinapoyl- bzw. Sinapatkonjugate (Abbildung 31) spielen, wie zu Beginn vermutet, als Reserve quantitativ jedoch keine Rolle.

Die durch den transgenen Ansatz induzierten Veränderungen beeinflussen die Samen- und Pflanzenentwicklung nur in geringem Maße. Die leicht erhöhte Keimungsrate und das schnellere Wachstum der Keimpflanzen in der frühen Keimlingsentwicklung (Tabelle 9) könnten auf den erhöhten Wassergehalt, möglicherweise ausgelöst durch die erhöhte Konzentration an hygroskopischem Cholin (Abbildung 25) in den Überexpressionssamen, zurückzuführen sein. Der Cholingehalt in den transgenen Rapssamen erhöhte sich in ähnlichem Umfang, wie sich der Sinapingehalt reduzierte, was den Nährwert der Samen zusätzlich steigern könnte (Zeisel, 2000). Zum anderen könnte das Cholin durch eine induzierte Expression der Cholinoxidase (COX, Rozwadowski *et al.*, 1991; Sakamoto und Mura-

ta, 2001; Huang *et al.*, 2008) in Betain umgesetzt werden. Betain ist für seine schützenden Eigenschaften bezüglich unterschiedlicher abiotischer Stressoren, wie z.B. bei Kältestress, bekannt (Sakamoto und Murata, 2000). Eine Akkumulation von Betain aufgrund des erhöhten Cholingehaltes in den transgenen *BnSCE3*-Überexpressionssamen könnte somit zu einer gesteigerten Vitalität der Samen und sich entwickelnder Keimlinge führen.

Um herauszufinden, welche Auswirkungen die *BnSCE3*-Überexpression auf den Sekundärstoffwechsel und andere Stoffwechselwege des Samens hat, wurde eine umfassende Analyse der Primär- und Sekundärmetabolite der Samen durchgeführt (Clauss *et al.*, 2011).

Aufgrund der hohen Gehalte an Cholinestern in den reifen Samen, mit Sinapin als Hauptkomponente, wurden diese in einem Teil der methanolischen Samenextrakte durch die Verwendung einer Festphasenextraktion abgereichert. Dies ermöglichte die Detektion auch niedrigkonzentrierter Komponenten, die anderenfalls durch die Cholinester maskiert werden würden (Böttcher *et al.*, 2011). Neben der deutlichen Reduktion des Sinapingehaltes zeigte die Untersuchung des Metabolitenprofils weitere Veränderungen. Diese umfassen beispielsweise die glycosidierten Derivate des Sinapins, wie das 4-*O*-Dihexosid und das 4-*O*-Hexosid-Pentosid (Metaboliten Nr. 26 und 27; Tabelle 11) oder das Sinapat 4-*O*-Glucosid (Nr. 32; Tabelle 11, 12). Ein Großteil der Komponenten des Phenylpropanoidstoffwechsels wird durch Glycosyltransferasen modifiziert. Dadurch erhöht sich die Löslichkeit, verringert sich die Reaktivität und verbessert sich die Stabilität der Verbindung (Bowles *et al.*, 2005; Aksamit-Stachurska *et al.*, 2008). Glycosyltransferasen ermöglichen die Detoxifizierung biotischer Gifte und Xenobiotika, wie Herbizide, Pestizide und Schadstoffe (Loutre *et al.*, 2003; Poppenberger *et al.*, 2003).

Anscheinend kann die induzierte BnSCE3-Aktivität die oben genannten glycosidierten Derivate des Sinapins nicht umsetzen, da diese in den Überexpressionssamen akkumulieren. Die Anreicherung von phenolischen Glycosiden zeigte sich auch in anderen Mutanten. Zu diesen gehören transgene Pappeln und Espen, welche in der Ligninbiosynthese verändert wurden durch das Ausschalten der 4-Cumarat:CoA-Ligase (4CL), der Caffeoyl-CoA *O*-Methyltransferase (CCoAOMT) oder der Überexpression der Coniferaldehyd-5-Hydroxylase (CAld5H) (Meyersmann *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2010), als auch in den *Arabidopsis thaliana ugt84A2* Mutanten, in denen die SGT ausgeschaltet wurde (Meißner *et al.*, 2008). Auch das Auftreten von weiteren Komponenten der Sinapinsäure, konjugiert mit Methyl- (Nr. 33, 34, Tabelle 11, 12) oder Cysteinresten (Nr. 46, 48, Tabelle 12) lässt deutlich werden, dass die Pflanze versucht, die Gehalte der freien Sinapinsäure zu reduzieren. Sina-

pinsäure, als ein Vertreter phenolischer Substanzen, ist in der Lage mit Proteinen zu interagieren und Komplexe zu bilden. Dadurch können die Proteine ihre Funktion verlieren (Mieth *et al.*, 1983; Naczk *et al.*, 1998). Der Schutz der Zelle vor freier Sinapinsäure durch Derivatisierung und Kompartimentierung ist deshalb essenziell.

Die dsRNAi-vermittelte Suppression der *UGT84A9* in *Brassica napus* (Hüsken *et al.*, 2005) ergab in den Samen eine deutliche Reduktion der Sinapatester-Nebenkomponenten, wie glycosidischen Estern und Kaempferolglycosiden (Baumert *et al.*, 2005). Die Reduktion dieser Verbindungen konnte bei den *BnSCE3*-Überexpressionssamen in diesem Umfang nicht festgestellt werden. Das unterstreicht, dass bei diesem transgenen Ansatz ein anderer Mechanismus der Sinapinreduktion vorliegt. Möglicherweise führt die transient freigesetzte Sinapinsäure zu einem negativen Feedback auf die Sinapinbiosynthese (Milkowski und Strack, 2010).

Neben den Veränderungen des Sekundärstoffwechsels, konnten im Zuge der durchgeführten Metabolitenstudie auch vielfältige Veränderungen im Primärstoffwechsel festgestellt werden, die im Zuge der *BnSCE3*-Überexpression auftreten (Tabelle 13, Abbildung 39). Bei diesen Untersuchungen kam die Methode der Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC/MS) zur Anwendung. Die durch die *BnSCE3*-Überexpression veränderten Primärmetabolite in den Samen von *Brassica napus* stammen aus verschiedenen Stoffwechselwegen. Die zusätzlich durchgeführten Untersuchungen zu den möglichen Veränderungen im Lipidstoffwechsel mittels Elektronensprayionisation-Massenspektrometrie (ESI-MS/MS) komplementieren die Charakterisierung der transgenen *Brassica napus*-Samen. Die *BnSCE3*-Überexpression scheint globale Auswirkungen auf den Stoffwechsel zu haben. So wird die Glycolyse ebenso beeinflusst, wie der Citratzyklus, der Aminosäure- und Phospholipidstoffwechsel und erwartungsgemäß Teile des Sekundärstoffwechsels (Abbildung 39). Dabei wurde deutlich, dass die Auswirkungen innerhalb des komplexen, metabolischen Netzwerks des Samen sehr diverser Natur und teilweise nur schwer zu interpretieren sind. Der erhöhte Gehalt an Phosphatidylcholin ist vermutlich auf den erhöhten Cholingehalt (Abbildung 25, 27, 39), der in den Samen der Überexpressionslinien detektiert wurde, zurückzuführen und wirkt sich ebenfalls auf den Gehalt an aktivierten Fettsäuren (Bates *et al.*, 2009) und auf die Bildung anderer Phospholipide aus. Aufgrund der Tatsache, dass die BnSCE3 *in vitro* Phosphatidylcholin (PC) spaltet, hätte man hier auch eine Reduktion des PC-Gehaltes vermuten können.

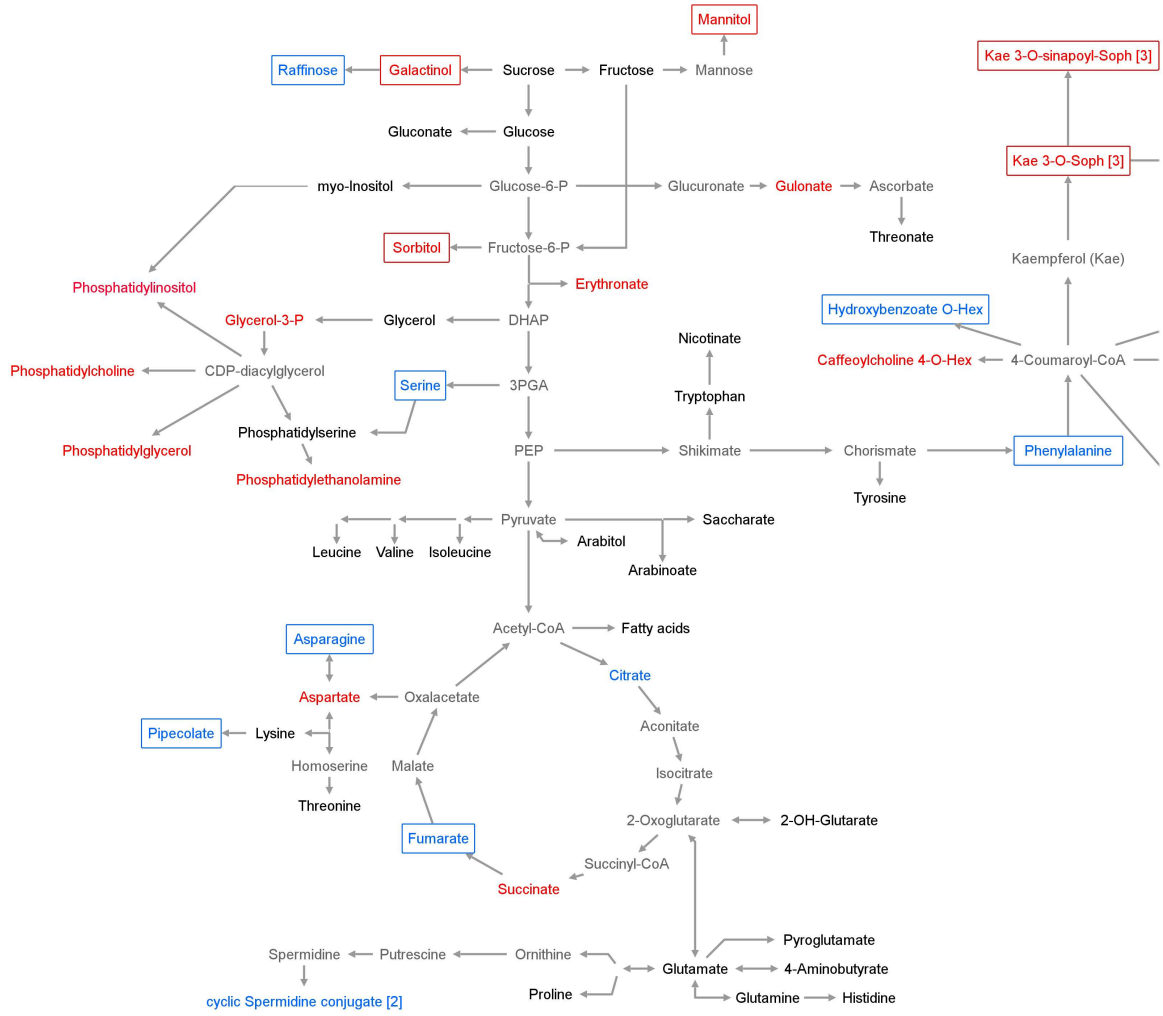
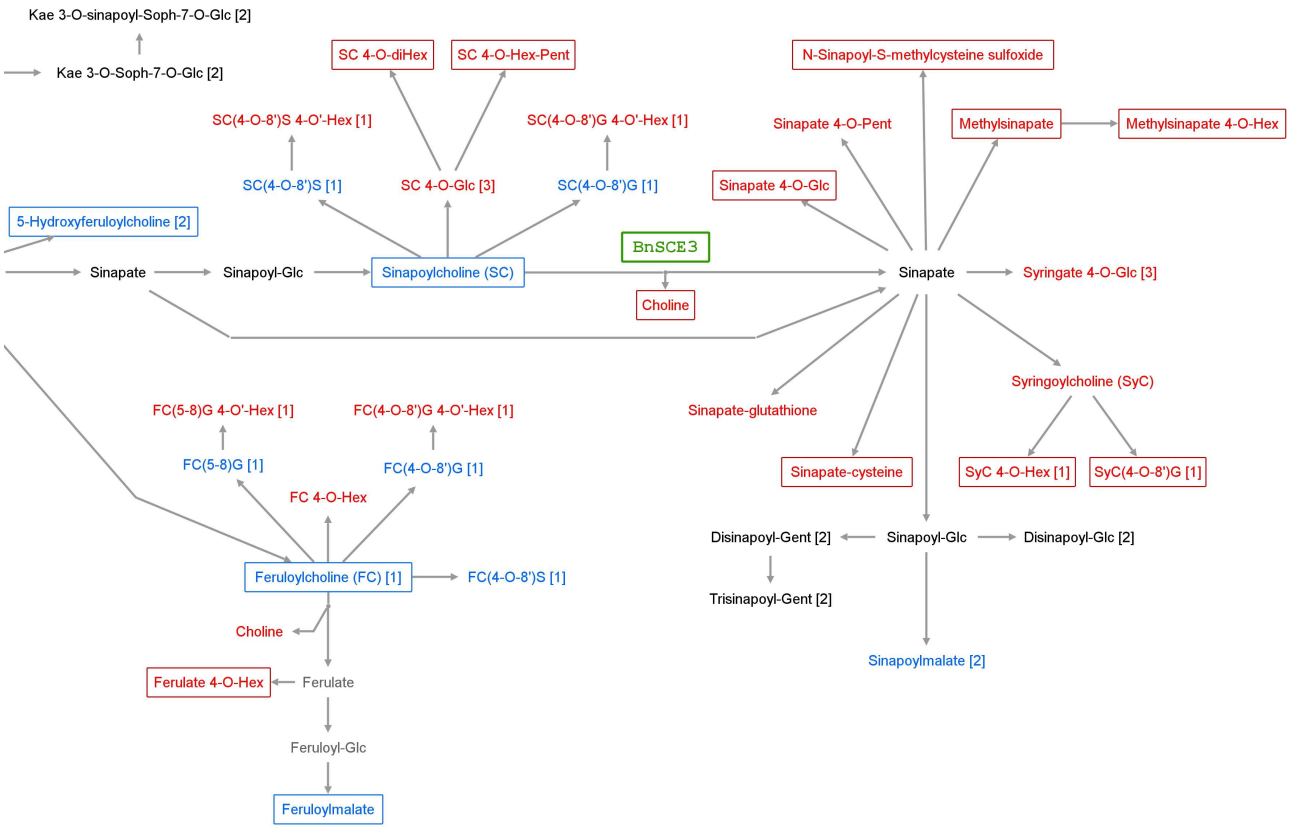


Abbildung 39: Veränderungen im Primär- und Sekundärstoffwechsel der transgenen *Brassica napus-BnSCE3*-Überexpressionssamen der Linien OE1 und OE2. Komponenten, die signifikant erhöhte Mengen aufweisen, wurden rot markiert. Komponenten mit reduzierten Gehalten wurden blau markiert. Schwarz markierte Verbindungen wurden gemessen, waren jedoch unverändert und graue Komponenten wurden nicht detektiert. Die überexprimierte *BnSCE3* wurde in grün hervorgehoben. Die gerahmten Verbindungen weisen die stärksten Veränderungen in beiden transgenen Linien im Vergleich zur Wildtypkontrolle auf mit folgenden Schwellenwerten: Primärmetabolite (*ratio* 1,5 und 0,7; Tabelle 13) und Sekundärmetabolite (*ratio* 20 [$\log_2$ 4,322] und 0,1 [$\log_2$ -3,322]; Tabelle 11, 13, A3 und Abbildung A1). Abbildung 26 und 27 zeigen die erhöhten Phospholipidgehalte. Die Pfeile symbolisieren sowohl Ein- als auch Mehrschrittreaktionen, basierend auf bekannten biochemischen Reaktionen. Die Reaktionsschritte des Phenylpropanstoffwechsels basieren auf den Publikationen von Humphreys und Chapple, 2002; Boerjan *et al.*, 2003 und Weng *et al.*, 2010. G - Guaiacylrest, Gent - Gentiobiose, Glc - Glucose, Hex - unbekannter Hexoserest, Pent - Pentose, S - Syringylrest, Soph - Sophorose, [1] - Böttcher *et al.*, 2009, [2] - Baumert *et al.*, 2005, [3] - Wolfram *et al.*, 2010.



Ebenso führt der erhöhte Gehalt an Glycerol-3-Phosphat durch die Bildung von CDP-Diacylglycerol zu einer veränderten Phospholipidbiosynthese. Die Analyse der Lipide zeigte deutlich, dass die Vertreter der Phosphatidylcholine in den Samen die Hauptvertreter innerhalb der Phospholipide darstellen. Sie wurden verstärkt in den Ölkörpern der Rapssamen gefunden (Tzen *et al.*, 1993; Katavic *et al.*, 2006). Tzen *et al.* (1993) identifizierten Phosphatidylinositol als Hauptkomponente der Lipide in den Ölkörpern.

Die Tatsache, dass die *BnSCE3*-Überexpression den Stoffwechsel unterschiedlich stark beeinflusst, zeigt, wie wichtig es ist, den Stoffwechsel als Ganzes zu betrachten und nicht einzelne Stoffwechselwege isoliert zu analysieren. Möglicherweise fördert die breite Substratspezifität der BnSCE3 die pleiotropen Auswirkungen auf den Primär- und Sekundärstoffwechsel als Folge der Überexpression.

Kürzlich durchgeführte Untersuchungen mit der *Arabidopsis*-Mutante *sct* (Sinapoylglucose:Cholin-Sinapoyltransferase) zeigten ähnlich multiple Effekte auf den pflanzlichen Stoff-

wechsel (Huang *et al.*, 2009). Die resultierenden Veränderungen des Transkriptoms dieser Mutante erhöhten jedoch die Empfindlichkeit der transgenen Pflanzen gegenüber *Sclerotinia sclerotiorum*, einem Pilz, der die Weißstängeligkeit bei Wild- und Kulturpflanzen auslöst (Purdy, 1979; Bolton *et al.*, 2006) und unter anderem Rapspflanzen befällt. Dieser Effekt korrelierte mit einem reduzierten Gehalt verschiedener Abwehrstoffe, wie zum Beispiel Salicylsäure und Glucosinolaten, ausgelöst durch eine unbekannte metabolische Wechselwirkung zur Sinapinbiosynthese. Entsprechende Untersuchungen der transgenen *BnSCE3*-Überexpressionspflanzen konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden. Im Gegensatz dazu scheint die samenspezifische Überexpression der *BnSCE3* eine viel versprechende Strategie zur Generierung von Niedrigsinapinlinien zu sein, da diese die für die Landwirtschaft wichtigen Eigenschaften der Samen, wie den Ölgehalt und dessen Zusammensetzung sowie den Protein- und Glucosinolatgehalt nicht signifikant beeinflusst. Die ermittelten weitreichenden Veränderungen im Metabolitenprofil *BnSCE3*-überexprimierender Samen bestätigen die Notwendigkeit derartiger Analysen zur Absicherung der „substanziellen Äquivalenz" transgener Pflanzen, das heißt der grundlegenden Übereinstimmung in den wesentlichen qualitätsbildenden Merkmalen mit den derzeit genutzten konventionellen Sorten (Chen *et al.*, 2003).

Über die biologische Funktion des Sinapins und dessen Lokalisation ist trotz aller bisher durchgeführten Untersuchungen relativ wenig bekannt. Durch die während der Keimung aktive BnSCE3 wird Sinapin zu Sinapinsäure und freiem Cholin hydrolysiert (Nurmann und Strack, 1979; Strack, 1980). Sinapin könnte daher als Sinapinsäurespeicher für den nach der Keimung einsetzenden weiterführenden Sinapatesterstoffwechsel und als Cholinspeicher für die Membranlipidbiosynthese dienen (Strack, 1981). Jedoch konnte die Rolle des Sinapins auch durch Mutantenanalysen bisher nicht eindeutig geklärt werden. Die *Arabidopsis thaliana*-Mutanten *fah1* und *sng2* akkumulieren aufgrund einer gestörten Sinapinbiosynthese freies Cholin anstelle von Sinapin (Chapple *et al.*, 1992; Shirley *et al.*, 2001; Shirley und Chapple, 2003) und zeigten dabei ebenso wie im Fall der *BnSCE3*-Überexpression keine Beeinträchtigungen ihrer Vitalität, mit denen Rückschlüsse auf die Funktion des Sinapins geschlossen werden könnten. Aufgrund der antinutritiven Eigenschaften der Phenolsäuren und ihrer Ester wurde die fraßhemmende und antifungale Wirkung des Sinapins diskutiert, was zum Schutz des Samen als essenzielle reproduzierende Einheit beitragen könnte.

Aus züchterischer Sicht ist die Reduktion des Sinapingehaltes durch die Überexpression der *BnSCE3* sinnvoll. Jedoch bleibt der Gehalt an anderen Sinapinsäureestern unverändert

auf relativ hohem Niveau. Die Identifizierung der *BnSCE3*-Sequenz und der Beweis, dass die samenspezifische Überexpression des Gens zu einer starken Reduktion des Sinapingehaltes führt, liefert die Voraussetzung für weitere molekulare Züchtungsansätze. In ersten Versuchen, die molekularen Ansätze der SGT-RNAi-Suppression und der *BnSCE3*-Überexpression zu vereinen, zeigte sich das enorme Potenzial dieser Kombination, welche in Zukunft näher untersucht werden sollte. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit die Akkumulation des Sinapins auf zwei metabolischen Ebenen zu beeinflussen: zum einen durch die Hemmung der Biosynthese, ausgelöst durch die Supression der SGT und zum anderen durch die Förderung des Abbaus, induziert durch die Überexpression der SCE. Die Kombination dieser Ansätze bietet den Vorteil, dass neben der Sinapinakkumulation (SCE) auch eine mögliche Anreicherung des metabolischen Vorläufers Sinapoylglucose (SGT) unterdrückt wird.

4.5. Weiterführende Arbeiten

Die Identifizierung der Sinapinesterase aus *Brassica napus* ermöglichte den Einsatz dieses Enzyms in einem transgenen Ansatz zur Reduktion des Sinapingehaltes. Diese Strategie war erfolgreich, und die transgenen Samen konnten umfangreich charakterisiert werden.

Ansätze für weiterführende Experimente ergeben sich aus Fragestellungen, bei denen Untersuchungen zur Regulation, evolutiven Entwicklung, Strukturaufklärung und zur Lokalisation des Enzyms im Mittelpunkt stehen.

Um die Struktur des Enzyms untersuchen zu können, muss ausreichend heterolog exprimiertes Protein in aktiver Form für Kristallisationsexperimente gewonnen werden. Dazu sollte ein geeignetes Expressionssystem identifiziert und die Proteinexpression für dieses System optimiert werden. Erste computerbasierte Modellierungsversuche scheiterten, da keine passende Kristallstruktur als *Template* verfügbar war. Auch die Aufklärung der Bedeutung des Hauptsubstrats Sinapin ist eine interessante Aufgabenstellung. Um die Bedeutung des Sinapins für den Samen zu klären, könnten Fütterungsexperimente mit den *BnSCE3*-Überexpressionssamen dienen. Sollte Sinapin als Fraßschutz dienen, wäre anzunehmen, dass die sinapinarmen *BnSCE3*-Überexpressionssamen eine größere Akzeptanz gegenüber Fraßfeinden besitzen.

Mit Hilfe des heterolog überexprimierten Proteins der Sinapinesterase könnten spezifische Antikörper generiert und die Versuche zur Bestimmung der Lokalisation der BnSCE3 fortgeführt und abgeschlossen werden.

Der im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich etablierte molekulare Züchtungsansatz zur Reduktion des Sinapingehaltes bietet weitere Möglichkeiten. Erste Versuche zeigten, dass die Kombination der samenspezifischen *BnSCE3*-Überexpression mit dem *SGT*-RNAi-*Knockdown* erstmals sowohl den Sinapin- als auch den Sinapatestergehalt deutlich minimiert. Eine umfassende Charakterisierung dieser Doppelmutanten ist eine viel versprechende Aufgabe für die zukünftige Forschung.

5. Zusammenfassung

Die in den Sinapinstoffwechsel der Rapssamen und jungen Keimpflanzen involvierte Sinapinesterase, welche die keimungsspezifische Hydrolyse des Speicherstoffes Sinapin zu Sinapinsäure und Cholin katalysiert, stand im Mittelpunkt dieser Promotionsarbeit. Ein entscheidender Aspekt zu Beginn der Arbeit war die erstmalige Identifizierung sowie die molekulare und biochemische Charakterisierung der Sinapinesterase aus *Brassica napus*. Es sollten zum einen Einblicke in die evolutionäre Abstammung dieses Enzyms erzielt werden. Zum anderen bestand die Fragestellung, inwieweit sich die Sinapinesterase als Ausgangspunkt für einen molekularen Ansatz zur Reduktion des Sinapingehaltes eignen könnte. Im Rahmen dieser Arbeit konnten folgende Resultate erzielt werden:

- Die zu Beginn dieser Arbeit durchgeführte Reinigung der nativen Sinapinesterase (BnSCE3) aus jungen *Brassica napus*-Keimlingen in Zusammenarbeit mit Dr. Alfred Baumert (Leibniz-Institut für Pflanzenbiochmie, Abt. Sekundärstoffwechsel) ermöglichte die Klonierung der cDNA. Auf Grundlage der generierten Sequenzinformation konnte die Sinapinesterase BnSCE3 der Proteinklasse der GDSL-Lipasen zugeordnet werden.

- Biochemische Untersuchungen des gereinigten Enzyms bestätigten, dass die Sinapinesterase ein für die Klasse der GDSL-Lipasen typisches breites Substratspektrum aufweist. Das Vorhandensein des Cholinrestes sowie die Kettenlänge und die vorhandene Doppelbindung scheinen grundlegende strukturelle Eigenschaften des Substrates zu sein, welche durch die BnSCE3 erkannt werden. Die Anzahl und Beschaffenheit der Substituenten am aromatischen Ring spielen im Gegensatz dazu vermutlich eine untergeordnete Rolle. Die Ergebnisse zur Substratspezifität weisen darauf hin, dass das Vorhandensein des Cholinrestes ein entscheidendes Kriterium für die Aktivität der BnSCE3 darstellt.

- Die heterologe Überexpression des Enzyms in *Nicotiana benthamiana*-Blättern und der nachfolgende Enzymassay bestätigten, dass die identifizierte BnSCE3 in der Lage ist, die Hydrolyse des Substrates Sinapin in Sinapinsäure und Cholin zu katalysieren und es sich somit um die Sinapinesterase handelt.

  Die Überexpression der *BnSCE3* unter Kontrolle des samenspezifischen napin590-Promotors in *Arabidopsis thaliana*- und *Brassica napus*-Samen verlegte den natürlichen keimungsinduzierten Abbau der antinutritiven, abundanten Samenkomponete Sinapin in das Stadium der Samenentwicklung, was eine Absenkung des Sina-

pingehaltes um bis zu 94% im Vergleich zur jeweiligen Wildtypkontrolle zur Folge hatte.

- Eine solche starke Reduktion konnte erstmals erzielt werden. Umfangreiche Untersuchungen der Auswirkungen der samenspezifischen *BnSCE3*-Überexpression in *Brassica napus* auf die physiologischen Eigenschaften der Samen und mögliche metabolische Veränderungen ergaben, dass die Vitalität der Samen und Anfälligkeit der Keimlinge bezüglich UV-Stressbedingungen durch die Überexpression nicht beeinflusst wurden. Die metabolischen Veränderungen wirkten sich pleiotrop auf große Teile des Primär- und Sekundärstoffwechsels aus. Beispielsweise erhöhte sich der Phosphatidylcholin- und Cholingehalt in den transgenen Rapssamen. Eine signifikante Änderung des Öl-, Protein- und Glucosinolatgehaltes konnte nicht detektiert werden.
- Die im transgenen Samen akkumulierenden Sinapatesterkonjugate SC 4-*O*-Glc, SC (4-*O*-8′)G 4-*O*′-Hex, Sinapat 4-*O*-Glc und Methylsinapat kompensieren den Sinapinverlust nicht. Im Laufe der Keimlingsentwicklung normalisieren sich die umfangreichen metabolischen Veränderungen und gleichen sich dem Wildtypniveau an.
- Der im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich etablierte molekulare Ansatz bietet weitere Möglichkeiten zur Minimierung des Sinapingehaltes. Erste Versuche zeigten, dass die Kombination der samenspezifischen *BnSCE3*-Überexpression mit dem *SGT*-RNAi-*Knockdown* sowohl den Sinapingehalt als auch den Gehalt an restlichen Sinapatestern stark reduziert.
- Die Identifizierung und umfangreiche Charakterisierung der BnSCE3 in der vorliegenden Arbeit gibt einen weiteren Einblick in den Sinapin-Metabolismus der Pflanze. Die weiterhin unbeantwortete Frage nach der physiologischen Bedeutung des Sinapins sollte durch weiterführende Analysen der generierten transgenen Linien untersucht werden.

6. Literaturverzeichnis

Akoh, C. C., Lee, G. C., Liaw, Y. C., Huang, T. H., Shaw, J. F. (2004) GDSL family of serine esterases/lipases. *Prog Lipid Res* **43:** 534-552

Aksamit-Stachurska, A., Korobczak-Sosna, A., Kulma, A., Szopa, J. (2008) Glycosyltransferase efficiently controls phenylpropanoid pathway. *BMC Biotechnol* **8:** 25-41

Alonso, J. M., Stepanova, A. N., Leisse, T. J., Kim, C. J., Chen, H., *et al.* (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301:** 653-657

Amoutzias, G. und Van de Peer, Y. (2008) Together we stand: genes cluster to coordinate regulation. *Dev Cell* **14:** 640-642

Bates, P. D., Durrett, T. P., Ohlrogge, J. B., Pollard, M. (2009) Analysis of acyl fluxes through multiple pathways of triacylglycerol synthesis in developing soybean embryos. *Plant Physiol* **150:** 55-72

Baucher, M., Halpin, C., Petit-Conil, M., Boerjan, W. (2003) Lignin: genetic engineering and impact on pulping. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **38:** 305-350

Baucher, M., Monties, B., Van Montagu, M., Boerjan, W. (1998) Biosynthesis and genetic engineering of Lignin. *Crit Rev Plant Sci* **17:** 125-197

Baumert, A., Milkowski, C., Schmidt, J., Nimtz, M., Wray, V., *et al.* (2005) Formation of a complex pattern of sinapate esters in *Brassica napus* seeds, catalyzed by enzymes of a serine carboxypeptidase-like acyltransferase family? *Phytochemistry* **66:** 1334-1345

Bell, J. M. (1993) Factors affectrngthe nutritional value of canola meal: A review. *Can J Anim Sci* **73:** 679-697

Bewley, J. D. und Black, M. (1994) *Seeds: Germination, structure and composition. New York: Plenum.*

Bhinu, V. S., Schafer, U. A., Li, R., Huang, J., Hannoufa, A. (2009) Targeted modulation of sinapine biosynthesis pathway for seed quality improvement in *Brassica napus. Transgenic Res* **18:** 31-44

Blair, R. und Reichert, D. R. (1984) Carbohydrate and phenolic constituents in a comprehensive range of rapeseed and canola fractions: Nutritional significance for animals. *J Sci Food Agric* **35:** 29-35

Blundy, K. S., Blundy, M. A., Crouch, M. L. (1991) Differential expression of members of the napin storage protein gene family during embryogenesis in *Brassica napus*. *Plant Mol Biol* **17:** 1099-1104

Boerjan, W., Ralph, J., Baucher, M. (2003) Lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* **54:** 519-546

Bolton, M. D., Thomma, B. P. H. J., Nelson, B. D. (2006) *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Mol Plant Pathol* **7:** 1-16

Booij-James, I. S., Dube, S. K., Jansen, M. A., Edelman, M., Mattoo, A. K. (2000) Ultraviolet-B radiation impacts light-mediated turnover of the photosystem II reaction center heterodimer in Arabidopsis mutants altered in phenolic metabolism. *Plant Physiol* **124:** 1275-1284

Bopp, M. und Lüdicke, W. (1975) Über den Abbau des Sinapins während der frühen Ontogenese der Keimlinge von *Sinapis alba* L. *Z Naturforsch* **30c:** 663-667

Böttcher, C., von Roepenack-Lahaye, E., Scheel, D. (2011) Resources for metabolomics. Genetics and genomics of the *Brassicaceae*. Bancroft and R. Schmidt. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag. 469-503

Böttcher, C., Westphal, L., Schmotz, C., Prade, E., Scheel, D.*, et al.* (2009) The multifunctional enzyme CYP71B15 (PHYTOALEXIN DEFICIENT3) converts cysteine-indole-3-acetonitrile to camalexin in the indole-3-acetonitrile metabolic network of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **21:** 1830-1845

Bouchereau, A., Hamelin, J., Lamour, I., Renard, M., Larher, F. (1991) Distribution of sinapine and related compounds in seeds of Brassica and allied Genera. *Phytochemistry* **30:** 1873-1881

Bowles, D., Isayenkova, J., Lim, E. K., Poppenberger, B. (2005) Glycosyltransferases: managers of small molecules. *Curr Opin Plant Biol* **8:** 254-263

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72:** 248-254

Brick, D. J., Brumlik, M. J., Buckley, J. T., Cao, J. X., Davies, P. C.*, et al.* (1995) A new family of lipolytic plant enzymes with members in rice, arabidopsis and maize. *FEBS Lett* **377:** 475-480

Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L. (2000) Biochemistry and molecular biology of plants, American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland. .

Caldwell, M. M., Bornman, J. F., Ballare, C. L., Flint, S. D., Kulandaivelu, G. (2007) Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation, and interactions with other climate change factors. *Photochem Photobiol Sci* **6:** 252-266

Cao, D., Cheng, H., Wu, W., Soo, H. M., Peng, J. (2006) Gibberellin mobilizes distinct DELLA-dependent transcriptomes to regulate seed germination and floral development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **142:** 509-525

Chapple, C. C., Vogt, T., Ellis, B. E., Somerville, C. R. (1992) An *Arabidopsis* mutant defective in the general phenylpropanoid pathway. *Plant Cell* **4:** 1413-1424

Chen, F., Duran, A. L., Blount, J. W., Sumner, L. W., Dixon, R. A. (2003) Profiling phenolic metabolites in transgenic alfalfa modified in lignin biosynthesis. *Phytochemistry* **64:** 1013-1021

Clauss, K., Baumert, A., Nimtz, M., Milkowski, C., Strack, D. (2008) Role of a GDSL lipase-like protein as sinapine esterase in *Brassicaceae*. *Plant J* **53:** 802-813

Clauss, K., von Roepenack-Lahaye, E., Böttcher, C., Roth, M. R., Welti, R., *et al.* (2011) Overexpression of sinapine esterase BnSCE3 in *Brassica napus* triggers global changes in seed metabolism. Published on January 19, 10.1104/pp.110.169821. *Plant Physiol*

Clough, S. J. und Bent, A. F. (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16:** 735-743

Cummins, I., Burnet, M., Edwards, R. (2001) Biochemical characterisation of esterases active in hydrolysing xenobiotics in wheat and competing weeds. *Physiol Plant* **113:** 477-485

D'Auria, J. C. (2006) Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD. *Curr Opin Plant Biol* **9:** 331–340

De Block, M., De Brouwer, D., Tenning, P. (1989) Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* Using *Agrobacterium tumefaciens* and the Expression of the *bar* and *neo* Genes in the Transgenic Plants. *Plant Physiol* **91:** 694-701

Devaiah, S. P., Roth, M. R., Baughman, E., Li, M., Tamura, P., *et al.* (2006) Quantitative profiling of polar glycerolipid species and the role of phospholipase Dα1 in defining the lipid species in Arabidopsis tissues. *Phytochemistry* **67:** 1907-1924

Dixon, R. A. (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature* **411:** 843-847

Dixon, R. A. und Paiva, N. L. (1995) Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell* **7:** 1085-1097

Dixon, R. A. und Steele, C. L. (1999) Flavonoids and isoflavonoids - a gold mine for metabolic engineering. *Trends Plant Sci* **4:** 394-400

Döhring, T., Köfferlein, M., Thiel, S., Seidlitz, H. K. (1996) Spectral shaping of artificial UV-B irradiation for vegetation stress research. *J Plant Physiol* **148:** 115-119

Drew, M. (2004) Canola protein concentrate as a feed ingredient for salmonid fish. *Cruz Suárez L. E., Ricque M., Nieto López M. G.,Villarreal D., Scholz U. Y.,González M. (eds) Advances en Nutrición Acuícola VII, Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Hermosillo, Sonora, Mexico*

Ellerström, E., Stålberg, K., Ezcurra, I., Rask, L. (1996) Functional dissection of a napin gene promoter: identification of promoter elements required for embryo and endosperm specific expression. *Plant Mol Biol* **32:** 1019-1027

Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., von Heijne, G. (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* **300:** 1005-1016

Erban, A., Schauer, N., Fernie, A. R., Kopka, J. (2007) Nonsupervised construction and application of mass spectral and retention time index libraries from time-of-flight gas chromatography-mass spectrometry metabolite profiles. *Methods Mol Biol* **358:** 19-38

Fahrney, D. und Gold, A. (1963) Sulfonyl fluorides as inhibitors of esterases. I. Rates of reaction with acetylcholinesterase, alpha-chymotrypsin and trypsin. *J Am Chem Soc* **85:** 997-1000

Fenwick, G. R. (1982) The assessment of a new protein source - rapeseed. *Proc Nutr Soc* **41:** 277-288

Field, B. und Osbourn, A. E. (2008) Metabolic diversification--independent assembly of operon-like gene clusters in different plants. *Science* **320:** 543-547

Font, R., Wittkop, B., Badani, A. G., del Rio-Celestino, M., Friedt, W., *et al.* (2005) The measurements of acid detergent fibre in rapeseed by visible and near-infrared spectroscopy. *Plant Breeding* **124:** 410-412

Franke, R., Humphreys, J. M., Hemm, M. R., Denault, J. W., Ruegger, M. O., *et al.* (2002) The Arabidopsis *REF8* gene encodes the 3-hydroxylase of phenylpropanoid metabolism. *Plant J* **30:** 33-45

Fraser, C. M., Rider, L. W., Chapple, C. (2005) An expression and bioinformatics analysis of the Arabidopsis serine carboxypeptidase-like gene family. *Plant Physiol* **138:** 1136-1148

Gierl, A. und Frey, M. (2001) Evolution of benzoxazinone biosynthesis and indole production in maize. *Planta* **213:** 493-498

Griffiths, D. W., Birch, A. N. E., Hillman, J. R. (1998) Antinutritional compounds in the *Brassicaceae.* Analysis, biosynthesis, chemistry and dietary effects. *J Hortic Sci Biotechnol* **73:** 1-18

Hahlbrock, K. (1972) Enzymology and regulation of flavonoid biosynthesis. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **353:** 129-131

Hahlbrock, K. und Scheel, D. (1989) Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **40:** 347-369

Han, X. und Gross, R. W. (2001) Quantitative analysis and molecular species fingerprinting of triacylglyceride molecular species directly from lipid extracts of biological samples by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* **295:** 88-100

Hartmann, T. (2004) Plant-derived secondary metabolites as defensive chemicals in herbivorous insects: a case study in chemical ecology. *Planta* **219:** 1-4

Hartmann, T. (2007) From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* **68:** 2831-2846

Hause, B., Meyer, K., Viitanen, P. V., Chapple, C., Strack, D. (2002) Immunolocalization of 1-*O*-sinapoylglucose:malate sinapoyltransferase in *Arabidopsis thaliana*. . *Planta* **215:** 26-32

Hausmann, L. und Töpfer, R. (1999) Entwicklung von Plasmid-Vektoren. *BioEngineering für Rapssorten nach Maß. Vorträge für Pflanzenzüchtung***:** 155-173

Hellens, R. P., Edwards, E. A., Leyland, N. R., Bean, S., Mullineaux, P. M. (2000) pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol* **42:** 819 – 832

Herrmann, K. M. (1995) The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism. *Plant Physiol* **107:** 7-12

Herrmann, K. M. und Weaver, L. M. (1999) The Shikimate Pathway. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50:** 473-503

Hong, J. K., Choi, H. W., Hwang, I. S., Kim, D. S., Kim, N. H., *et al.* (2008) Function of a novel GDSL-type pepper lipase gene, *CaGLIP1*, in disease susceptibility and abiotic stress tolerance. *Planta* **227:** 539-558

Hood, E. E., Gelvin, S. B., Melchers, S. L., Hoekema, A. (1993) New Agrobacterium helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Research* **2:** 208-2018

Hostel, W. (1981) The Biochemistry of Plants. *Academic Press, Inc., New York* **7:** 725–753

Huang, J., Bhinu, V. S., Li, X., Dallal Bashi, Z., Zhou, R., *et al.* (2009) Pleiotropic changes in Arabidopsis f5h and sct mutants revealed by large-scale gene expression and metabolite analysis. *Planta*

Huang, J., Rozwadowski, K., Bhinu, V. S., Schafer, U., Hannoufa, A. (2008) Manipulation of sinapine, choline and betaine accumulation in Arabidopsis seed: towards improving the nutritional value of the meal and enhancing the seedling performance under environmental stresses in oilseed crops. *Plant Physiol Biochem* **46:** 647-654

Hughes, J. und Hughes, M. A. (1994) Multiple secondary plant product UDP-glucose glucosyltransferase genes expressed in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cotyledons. *DNA Seq* **5:** 41-49

Humphreys, J. M. und Chapple, C. (2002) Rewriting the lignin roadmap. *Curr Opin Plant Biol* **5:** 224-229

Hurst, L. D., Pal, C., Lercher, M. J. (2004) The evolutionary dynamics of eukaryotic gene order. *Nat Rev Genet* **5:** 299-310

Hüsken, A., Baumert, A., Strack, D., Becker, H. C., Möllers, C., *et al.* (2005) Reduction of sinapate ester content in transgenic oilseed rape (*Brassica napus*) by dsRNAi-based suppression of *BnSGT1* gene expression. *Mol Breed* **16:** 127-138

Ismail, F., Vaisey-Genser, M., Fyfe, B. (1981) Bitterness and astringency of sinapine and its components. *J Food Sci* **46:** 1241-1244

James, T. N. (1994) The toxic oil syndrome. *Clin Cardiol* **17:** 463-470

Jiang, L. W., Abrams, S. R., Kermode, A. R. (1996) Vicilin and napin storage protein gene promoters are responsive to abscisic acid in developing transgenic tobacco seed but lose sensitivity following premature desiccation. *Plant Physiol* **110:** 1135-1144

Jones, P. und Vogt, T. (2001) Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta* **213:** 164-174

Junker, B. H., Klukas, C., Schreiber, F. (2006) VANTED: A system for advanced data analysis and visualization in the contextofbiological networks. *BMC Bioinformatics* **7:** 109

Kanehisa, M., Goto, S., Kawashima, S., Okuno, Y., Hattori, M. (2004) The KEGG resource for deciphering the genome. *Nucleic Acids Res* **32:** 277-280

Kapila, J., De Rycke, R., Van Montagu, M., Angenon, G. (1997) An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science* **122:** 101-108

Katavic, V., Agrawal, G. K., Hajduch, M., Harris, S. L., Thelen, J. J. (2006) Protein and lipid composition analysis of oil bodies from two *Brassica napus* cultivars. *Proteomics* **6:** 4586-4598

Kiba, T., Naitou, T., Koizumi, N., Yamashino, T., Sakakibara, H., *et al.* (2005) Combinatorial microarray analysis revealing *Arabidopsis* genes implicated in cytokinin responses through the His-Asp phosphorelay circuitry. *Plant Cell Physiol* **46:** 339-355

Knauf, V. C. und Facciotti, D. (1995) Genetic engineering of foods to reduce the risk of heart disease and cancer. *Adv Exp Med Biol* **369:** 221-228

Koncz, C. und Schell, J. (1986) The promoter of *TL-DNA* gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Gen Genet* **204:** 383-396

Kondou, Y., Nakazawa, M., Kawashima, M., *al., e.* (2008) RETARDED GROWTH OF EMBRYO1, a new basic helix-loop-helix protein, expresses in endosperm to control embryo growth. *Plant Physiol* **147:** 1924-1935

Kopka, J., Schauer, N., Krueger, S., Birkemeyer, C., Usadel, B., *et al.* (2005) GMD@CSB.DB: The Golm Metabolome Database. *Bioinformatics* **21:** 1635-1638

Kozlowska, H., Rotkiewicz, D. A., Zadernowski, R., Sosulski, F. W. (1983) Phenolic acids in rapeseed and mustard. *J Am Oil Chem Soc* **60:** 119-123

Kräling, K., Röbbelen, G., Thies, W. (1991) Genetic variation of the content of sinapoyl esters in seeds of rape, *B. napus Plant Breeding* **106:** 254-257

Kutchan, T. M. (1995) Alkaloid Biosynthesis - The Basis for Metabolic Engineering of Medicinal Plants. *Plant Cell* **7:** 1059-1070

Kwon, S. J., Jin, H. C., Lee, S., Nam, M. H., Chung, J. H., *et al.* (2009) GDSL lipase-like 1 regulates systemic resistance associated with ethylene signaling in *Arabidopsis. Plant J*

Landry, L. G., Chapple, C. C., Last, R. L. (1995) Arabidopsis mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. *Plant Physiol* **109:** 1159-1166

Lee, K.-A. und Cho, T.-J. (2003) Characterization of a salicylic acid- and pathogen-induced lipase-like gene in chinese cabbage. *j Biochem Mol Biol* **36:** 433-441

Lehfeldt, C., Shirley, A. M., Meyer, K., Ruegger, M. O., Cusumano, J. C., *et al.* (2000) Cloning of the SNG1 gene of Arabidopsis reveals a role for a serine carboxypeptidase-like protein as an acyltransferase in secondary metabolism. *Plant Cell* **12:** 1295-1306

Li, J., Ou-Lee, T. M., Raba, R., Amundson, R. G., Last, R. L. (1993) Arabidopsis Flavonoid Mutants Are Hypersensitive to UV-B Irradiation. *Plant Cell* **5:** 171-179

Li, X., Bergelson, J., Chapple, C. (2010) The ARABIDOPSIS Accession Pna-10 Is a Naturally Occurring *sng1* Deletion Mutant. *Mol Plant* **3:** 91-100

Lim, E. K., Li, Y., Parr, A., Jackson, R., Ashford, D. A., *et al.* (2001) Identification of Glucosyltransferase Genes Involved in Sinapate Metabolism and Lignin Synthesis in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **276:** 4344-4349

Ling, H. (2008) Sequence analysis of GDSL lipase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Pak J Biol Sci* **11:** 763-767

Ling, H., Zuo, K., Zhao, J., Qin, J., Qiu, C., *et al.* (2006) Isolation and Characterization of a Homologous to Lipase Gene from *Brassica napus*. *Russian Journal of Plant Physiology* **53:** 366-372

Linscheid, M., Wendisch, D., Strack, D. (1980) The structures of sinapic acid esters and their metabolism in cotyledons of *Raphanus sativus*. . *Z Naturforsch* **35c:** 907-914

Lorenzen, M., Racicot, V., Strack, D., Chapple, C. (1996) Sinapic acid ester metabolism in wild type and a sinapoylglucose-accumulating mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **112:** 1625-1630

Loutre, C., Dixon, D. P., Brazier, M., Slater, M., Cole, D. J., *et al.* (2003) Isolation of a glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana* active in the metabolism of the persistent pollutant 3,4-dichloroaniline. . *Plant J* **34:** 485-493

Luedemann, A., Strassburg, K., Erban, A., Kopka, J. (2008) TagFinder for the quantitative analysis of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)-based metabolite profiling experiments. *Bioinformatics* **24:** 732-737

Mackenzie, P. I., Owens, I. S., Burchell, B., Bock, K. W., Bairoch, A., *et al.* (1997) The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics* **7:** 255-269

Maenz, D. D., Newkirk, R. W., Classen, H. L., Thiessen, D. L., Drew, M. D., *et al.* (2003) The nutritional value of Rapeseed protein concentrate (MCN BioProducts Inc.-CanPro-IP65) for Rainbow Trout. *Proceedings of 11th International Rapeseed Congress, Copenhagen, Denmark*: 1234-1236

Markham, K. R. (1989) Flavones, Flavonols and their Glycosides. *Methods in Plant Biochemistry* **1:** 197-235

Matthäus, B. (1997) Antinutritive compounds in different oilseeds. *Fett/Lipid* **99:** 170-174

Mayfield, J. A., Fiebig, A., Johnstone, S. E., Preuss, D. (2001) Gene families from the *Arabidopsis thaliana* pollen coat proteome. *Science* **292:** 2482-2485

McBride, K. E. und Summerfelt, K. R. (1990) Improved binary vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol* **14:** 269–276

Meißner, D., Albert, A., Bottcher, C., Strack, D., Milkowski, C. (2008) The role of UDP-glucose:hydroxycinnamate glucosyltransferases in phenylpropanoid metabolism and the response to UV-B radiation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **228:** 663-674

Meyersmann, H., Morreel, K., Lapierre, C., Pollet, B., De Bruyn, A., *et al.* (2000) Modifications in lignin and accumulation of phenolic glycosides in poplar xylem upon downregulation of caffeoyl coenzyme A O-methyltransferase, an enzyme involved in lignin biosynthesis. . *J Biol Chem* **275:** 36899-36909

Mieth, G., Schwenke, K. D., Raab, B., Brückner, J. (1983) Rapeseed: Constituents and Protein Products Part I. Composition and Properties of Proteins and Glucosinolates. *Die Nahrung* **27:** 675-697

Milkowski, C., Baumert, A., Schmidt, D., Nehlin, L., Strack, D. (2004) Molecular regulation of sinapate ester metabolism in *Brassica napus*: expression of genes, properties of the encoded proteins and correlation of enzyme activities with metabolite accumulation. *Plant J* **38:** 80-92

Milkowski, C., Baumert, A., Strack, D. (2000a) Cloning and heterologous expression of a rape cDNA encoding UDP-glucose:sinapate glucosyltransferase. *Planta* **211:** 883-886

Milkowski, C., Baumert, A., Strack, D. (2000b) Identification of four *Arabidopsis* genes encoding hydroxycinnamate glucosyltransferases. *FEBS Lett* **486:** 183-184

Milkowski, C. und Strack, D. (2010) Sinapate esters in *brassicaceous* plants: biochemistry, molecular biology, evolution and metabolic engineering. *Planta* **232:** 19-35

Mittasch, J., Mikolajewski, S., Breuer, F., Strack, D., Milkowski, C. (2010) Genomic microstructure and differential expression of the genes encoding UDP-glucose:sinapate glucosyltransferase (UGT84A9) in oilseed rape (*Brassica napus*). *Theor Appl Genet* **120:** 1485-1500

Mock, H.-P. und Strack, D. (1993) Energetics of uridine 5′-diphosphoglucose:hydroxycinnamic acid acyl-glycosyltransferase reaction. *Phytochemistry* **32:** 575 – 597

Molgaard, A., Kauppinen, S., Larsen, S. (2000) Rhamnogalacturonan acetylesterase elucidates the structure and function of a new family of hydrolases. *Structure* **8:** 373-383

Muentz, K. (1989) Intracellular protein sorting and the formation of protein reserves in storage tissue cells of plant seeds. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* **185:** 315-335

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., *et al.* (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1:** 263-273

Naczk, M., Amarowicz, R., Sullivan, A., Shahidi, F. (1998) Current Research Developments on Polyphenolics of Rapeseed/Canola: a Review. *Food Chem* **62:** 489-502

Nair, R. B., Bastress, K. L., Ruegger, M. O., Denault, J. W., Chapple, C. (2004) The *Arabidopsis thaliana* REDUCED EPIDERMAL FLUORESCENCE1 gene encodes an aldehyde dehydrogenase involved in ferulic acid and sinapic acid biosynthesis. *Plant Cell* **16:** 544-554

Nair, R. B., Joy, R. W. t., Kurylo, E., Shi, X., Schnaider, J., *et al.* (2000) Identification of a CYP84 family of cytochrome P450-dependent mono-oxygenase genes in *Brassica napus* and perturbation of their expression for engineering sinapine reduction in the seeds. *Plant Physiol* **123:** 1623-1634

Naranjo, M. A., Forment, J., Roldan, M., Serrano, R., Vicente, O. (2006) Overexpression of *Arabidopsis thaliana* LTL1, a salt-induced gene encoding a GDSL-motif lipase, increases salt tolerance in yeast and transgenic plants. *Plant Cell Environ* **29:** 1890-1900

Niggeweg, R., Michael, A. J., Martin, C. (2004) Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. *Nat Biotechnol* **22:** 746-754

Noel, J. P., Austin, M. B., Bomati, E. K. (2005) Structure-function relationships in plant phenylpropanoid biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol* **8:** 249-253

Nurmann, G. und Strack, D. (1979) Sinapine esterase. Part I. Characterization of sinapine esterase from cotyledons of *Raphanus sativus*. *Z Naturforsch* **34c:** 715-720

Nurmann, G. und Strack, D. (1981) Formation of 1-sinapoylglucose from free sinapic acid and UDP-glucose by a cell-free system from *Raphanus sativus* seedlings. *Pflanzenphysiol* **102:** 11-17

Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., *et al.* (1992) The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng* **5:** 197-211

Oswald, M., Fischer, M., Dirninger, N., Karst, F. (2007) Monoterpenoid biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae. *FEMS Yeast Res* **7:** 413-421

Outchkourov, N. S., Peters, J., de Jong, J., Rademakers, W., Jongsma, M. A. (2003) The promoter-terminator of chrysanthemum rbcS1 directs very high expression levels in plants. *Planta* **216:** 1003-1012

Pearson, A. W., Butler, E. J., Fenwick, G. R. (1980) Rapeseed meal and egg taint: the role of sinapine. *J Sci Food Agric* **31:** 898-904

Poppenberger, B., Berthiller, F., Lucyshyn, D., Sieberer, T., Schuhmacher, R., *et al.* (2003) Detoxification of the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. . *J Biol Chem* **278:** 47905-47914

Purdy, L. H. (1979) *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution and impact. *Phytopathology* **69:** 875-880

Qi, X., Bakht, S., Leggett, M., Maxwell, C., Melton, R., *et al.* (2004) A gene cluster for secondary metabolism in oat: implications for the evolution of metabolic diversity in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101:** 8233-8238

Regenbrecht, J. und Strack, D. (1985) Distribution of 1-sinapoylglucose:choline sinapoyltransferase in *Brassicaceae*. *Phytochemistry* **24:** 407-410

Riemann, M., Gutjahr, C., Korte, A., Riemann, M., Danger, B., *et al.* (2007) GER1, a GDSL motif-encoding gene from rice is a novel early light- and jasmonate-induced gene. *Plant Biol (Stuttg)* **9:** 32-40

Rozwadowski, K. L., Khachatourians, G. G., Selvaraj, G. (1991) Choline oxidase, a catabolic enzyme in *Arthrobacter pascens*, facilitates adaptation to osmotic stress in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **173:** 472-478

Sachs, J. (1873) *Lehrbuch der Botanik. W. Engelmann, Leipzig*

Sakamoto, A. und Murata, N. (2000) Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in plants: current status and implications for enhancement of stress tolerance *J Exp Bot* **51:** 81-88

Sakamoto, A. und Murata, N. (2001) The use of bacterial choline oxidase, a glycinebetaine-synthesizing enzyme, to create stress-resistant transgenic plants. *Plant Physiol* **125:** 180-188

Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning - a Laboratory Manual. *2nd ed. Cold Spring. Harbor Laboratory Press, New York, USA*

Sandermann, H. (1992) Plant metabolism of xenobiotics. *Trends Biochem Sci* **17:** 82-84

Schauer, N., Steinhauser, D., Strelkov, S., Schomburg, D., Allison, G., *et al.* (2005) GC-MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. *FEBS Lett* **579:** 1332-1337

Schilmiller, A. L., Stout, J., Weng, J. K., Humphreys, J., Ruegger, M. O., *et al.* (2009) Mutations in the cinnamate 4-hydroxylase gene impact metabolism, growth and development in Arabidopsis. *Plant J* **60:** 771-782

Scholz, M., Gatzek, S., Sterling, A., Fiehn, O., Selbig, J. (2004) Metabolite fingerprinting: detecting biological features by independent component analysis. *Bioinformatics* **20:** 2447-2454

Schultz, O.-E. und Gmelin, R. (1953) Papierchromatographie senfölglucosidhaltiger Pflanzen neue Ergebnisse. VI. Mlitteilung über Senfölglucoside. *Z Naturforsch* **8b:** 151-156

Scinto, L. F., Daffner, K. R., Dressler, D., Ransil, B. I., Rentz, D., *et al.* (1994) A potential noninvasive neurobiological test for Alzheimer's disease. *Science* **266:** 1051-1054

Segel, I. H. (1975) Enzyme Kinetics. Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems. John Wiley & Sons, Inc. Wiley-Interscience, Toronto.

Shahidi, F. und Naczk, M. (1992) An overview of the phenolics of canola and rapeseed: chemical, sensory and nutritional significance. *J Am Oil Chem Soc* **69:** 917-924

Sharma, V. und Strack, D. (1985) Vacuolar localization of 1-sinapoylglucose:L-malate sinapoyltransferase in protoplasts from cotyledons of *Raphanus sativus. Planta* **163:** 563-568

Sheahan, J. J. (1996) Sinapate esters provide greater UV-B attenuattion than flavonoids in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *Am J Bot* **83:** 679-686

Shewry, P. R., Napier, J. A., Tatham, A. S. (1995) Seed storage proteins: Structures and biosynthesis. *Plant Cell* **7:** 945-956

Shimura, K., Okada, A., Okada, K., Jikumaru, Y., Ko, K. W., *et al.* (2007) Identification of a biosynthetic gene cluster in rice for momilactones. *J Biol Chem* **282:** 34013-34018

Shirley, A. M. und Chapple, C. (2003) Biochemical characterisation of sinapoylglucose:choline sinapoyltransferase, a serine carboxypeptidase-like protein that functions as an acyltransferase in plant secondary metabolism. *J Biol Chem* **278:** 19870-19877

Shirley, A. M., McMichael, C. M., Chapple, C. (2001) The *sng2* mutant of Arabidopsis is defective in the gene encoding the serine carboxypeptidase-like protein sinapoylglucose:choline sinapoyltransferase. *Plant J* **28:** 83-94

Sinlapadech, T., Stout, J., Ruegger, M. O., Deak, M., Chapple, C. (2007) The hyperfluorescent trichome phenotype of the *brt1* mutant of *Arabidopsis* is the result of a defect in a sinapic acid: UDPG glucosyltransferase. *Plant J* **49:** 655-668

Slominski, B. A., Simbaya, J., Campbell, J. D., Rakow, G., Guenter, W. (1999) Nutritive value for broilers of meals derived from newly developed varieties of yellow-seeded canola. *Anim Feed Sci Technol* **78:** 249-262

Stehle, F., Brandt, W., Stubbs, M. T., Milkowski, C., Strack, D. (2009) Sinapoyltransferases in the light of molecular evolution. *Phytochemistry* **70:** 1652-1662

Strack, D. (1977) Sinapic acid ester fluctuations in cotyledons of *Raphanus sativus*. . *Z Pflanzenphysiol* **84:** 139-145

Strack, D. (1980) Enzymatic synthesis of 1-sinapoylglucose by UDP-glucose:sinapic acid glycosyltransferase from cotelydons of *Raphanus sativus. Z Naturforsch* **35:** 204-208

Strack, D. (1981) Sinapine as a supply of choline for the biosynthesis of phosphatidylcholine in *Raphanus sativus* seedlings. *Z Naturforsch* **36c:** 215-221

Strack, D. (1982) Development of 1-*O*-sinapoyl-*ß*-D-glucose:L-malate-sinapoyltransferase activity in cotyledons of red radish (*Raphanus sativus* l. var. sativus). *Planta* **155:** 31-36

Strack, D., Knogge, W., Dahlbender, B. (1983) Enzymatic synthesis of sinapin from 1-*O*-sinapoyl-glucose and choline by a cell-free system from developing seeds of red radish (*Raphanus sativus* l. var. sativus). *Z Naturforsch* **38c:** 21-27

Strack, D., Pieroth, M., Scharf, H., Sharma, V. (1985) Tissue distribution of phenylpropanoid metabolism in cotyledons of *Raphanus sativus*. . *Planta* **164:** 507-511

Strack, D., Tkotz, N., Klug, M. (1978) Phenylpropanoid metabolism in cotyledons of *Raphanus sativus* and the effect of competitive in vivo inhibition of L-phenylalanine ammonia-lyase (PAL) by hydroxylamine derivatives. *Z Pflanzenphysiol* **89:** 343-353

Stuhlfelder, C., Lottspeich, F., Mueller, M. J. (2002) Purification and partial amino acid sequences of an esterase from tomato. *Phytochemistry* **60:** 233-240

Suzuki, S., Sakakibara, N., Li, L. G., Umezawa, T., Chiang, V. L. (2010) Profiling of phenylpropanoid monomers in developing xylem tissue of transgenic aspen (*Populus tremuloides*). *J Wood Sci* **56:** 71-76

Tautenhahn, R., Böttcher, C., Neumann, S. (2008) Highly sensitive feature detection for high resolution LC/MS. *BMC Bioinformatics* **9:** 504

Teissére, M., Borel, M., Caillol, B., Nari, J., Gardies, A. M., *et al.* (1995) Purification and characterization of a fatty acyl-ester hydrolase from post-germinated sunflower seeds. *Biochim Biophys Acta* **1255:** 105-112

Thiel, S., Döhring, T., Köfferlein, M., Kosak, A., Martin, P., *et al.* (1996) A Phytotron for Plant Stress Research: How Far Can Artificial Lighting Compare to Natural Sunlight? *J Plant Physiol* **148:** 456-463

Tkotz, N. und Strack, D. (1980) Enzymatic synthesis of sinapoyl-L-malate from 1-sinapoylglucose and L-malate by a protein preparation from *Raphanus sativus* cotyledons. *Z Naturforsch* **35c:** 835-837

Tzagoloff, A. (1963a) Metabolism of Sinapine in Mustard Plants. I. Degradation of Sinapine into Sinapic Acid & Choline. *Plant Physiol* **38:** 202-206

Tzagoloff, A. (1963b) Metabolism of Sinapine in Mustard Plants. II. Purification & Some Properties of Sinapine Esterase. *Plant Physiol* **38:** 207-213

Tzen, J. T. C., Cao, Y.-z., Laurent, P., Ratnayake, C., Huang, H. C. (1993) Lipids, proteins, and structure of seed oil bodies from diverse species. *Plant Physiol* **101:** 267-276

U, N. (1935) Genomic analysis of Brassica with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Jpn J Bot* **7:** 389-452

Upton, C. und Buckley, J. T. (1995) A new family of lipolytic enzymes? *Trends Biochem Sci* **20:** 178-179

Velasco, L. und Möllers, C. (1998) Nondestructive assessment of sinapic acid esters in *Brassica* species: II. Evaluation of germplasm and identification of phenotypes with reduced levels. *Crop Sci* **38:** 1650-1654

Vicient, C. M. und Delseny, M. (1999) Isolation of total RNA from *Arabidopsis thaliana* seeds. *Anal Biochem* **268:** 412-413

Vítecek, J., Petrlová, J., Petrek, j., Adam, V., Havel, L., *et al.* (2007) Application of fluorimetric analysis of plant esterases to study Application of fluorimetric analysis of plant esterases to study. *Biol Plant* **51:** 551-555

Vogt, T. (2010) Phenylpropanoid biosynthesis. *Mol Plant* **3:** 2-20

Wang, S., Oomah, B. D., McGregor, D. I., Downey, R. K. (1998) Genetic and seasonal variation in the sinapine content of seed from *Brassica* and *Sinapis* species. *Can J Plant Sci* **78:** 395-400

Wang, X. (2001) Plant phospholipases. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52:** 211-231

Weier, D., Mittasch, J., Strack, D., Milkowski, C. (2008) The genes *BnSCT1* and *BnSCT2* from *Brassica napus* encoding the final enzyme of sinapine biosynthesis: molecular characterization and suppression. *Planta* **227:** 375-385

Welti, R., Li, W., Li, M., Sang, Y., Biesiada, H., *et al.* (2002) Profiling membrane lipids in plant stress responses: Role of phospholipase Dα in freezing-induced lipid changes in Arabidopsis. *J Biol Chem* **277:** 31994-32002

Weng, J. K., Akiyama, T., Bonawitz, N. D., Li, X., Ralph, J., *et al.* (2010) Convergent evolution of syringyl lignin biosynthesis via distinct pathways in the lycophyte *Selaginella* and flowering plants. *Plant Cell* **22:** 1033-1045

Willats, W. G. T., Orfila, C., Limberg, G., Buchholt, H. C., Van Alebeek, G.-J. W. M., *et al.* (2001) Modulation of the degree and pattern of methylesterification of pectic homogalacturonan in plant cell walls. *J Biol Chem* **276:** 19404-19413

Winkel, B. S. (2004) Metabolic channeling in plants. *Annu Rev Plant Biol* **55:** 85-107

Wolfram, K., Schmidt, J., Wray, V., Milkowski, C., Schliemann, W., *et al.* (2010) Profiling of phenylpropanoids in transgenic low-sinapine oilseed rape (*Brassica napus*). *Phytochemistry* **71:** 1076-1084

Wong, S. und Wolfe, K. H. (2005) Birth of a metabolic gene cluster in yeast by adaptive gene relocation. *Nat Genet* **37:** 777-782

Yi, G., Sze, S. H., Thon, M. R. (2007) Identifying clusters of functionally related genes in genomes. *Bioinformatics* **23:** 1053-1060

Yuan, J. S., Tiller, K. H., Al-Ahmad, H., Stewart, N. R., Stewart Jr, C. N. (2008) Plants to power: bioenergy to fuel the future. *Trends Plant Sci* **13:** 421-429

Zeisel, S. H. (2000) Choline: an essential nutrient for humans. *Nutrition* **16:** 669-671

Zhao, J. (2007) Nutraceuticals, nutritional therapy, phytonutrients, and phytotherapy for improvement of human health: a perspective on plant biotechnology application. *Recent Pat Biotechnol* **1:** 75-97

Zum Felde, T., Baumert, A., Strack, D., Becker, H. C., Möllers, C. (2007) Genetic variation for sinapate ester content in winter rapeseed (*Brassica napus* L.) and development of NIRS calibration equations. *Plant Breeding* **126:** 291-296

Zum Felde, T., Becker, H. C., Möllers, C. (2006) Genotype x Environment interactions, heritability and trait correlations of sinapate ester content in winter rapeseed (*Brassica napus* L.). *Crop Sci* **46:** 2195-2199

7. Anhang

Tabelle A1: Verwendete Oligonukleotide. Zusammenstellung der Nukleotidsequenzen (5´- 3´) der verwendeten Oligonukleotide mit den entsprechenden Schmelztemperaturen (T_A).

Bezeichnung	Sequenz (5´- 3´)	T_A
GSP1-R1	CTCCAACTCCACAACAAGCAGCCAAAG	67°C
GSP1-R2	GCCATCTTCTGGTGTGCGGCTTC	66°C
GSP1-R3	CCGTTGAGTATGCCATGAGCCATCTTCTG	68°C
GSP1-R4	GCAGCGTCAAGGCAGGACCAGTTG	68°C
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGC	59°C
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	66°C
gwGSP1	CGATGATGAGGCGGCCGTCAGAGTTAC	72°C
gwGSP2	TCAGCGATGGAATCACCGAAGCTGATG	70°C
gwGSP3	GTTCTGACGAGGCGACGATATTGGTGTAG	70°C
AP1	GTAATACGACTCACTATAGGGC	59°C
AP2	ACTATAGGGCACGCGTGGT	65°C
BnSCEall_F	ATGGCTTCTTCACTAAAGAAGCTTATC	62°C
BnSCEall_R	TCAACTACCGAAAGAAGATTCGTTATC	61°C
BnSCEprogus_F	ACTGAAGCTTACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTC	73°C
BnSCEprogus_R	GCAGGATCCGGGAAGATACGAGTCGTGTCTCCGTTGCAAAATC	73°C
BnSCEnap_F	ACTGCCCGGGGAAAATGGCTTCTTCACTAAAGAAGCTTATC	75°C
BnSCEnap_R	GCAGGATCCTCAACTACCGAAAGAAGATTCGTTATC	71°C
BnSCErub_F	ACTGGGATCCGAAAATGGCTTCTTCACTAAAGAAGCTTATC	63°C
BnSCErub_R	GCAGCGGCCGCTCAACTACCGAAAGAAGATTCGTTATC	63°C
631rub_F	ACTGTCTAGAGAAAATGGCTTCTTCACTGGAGAAGCTTATTTC	67°C
631rub_R	GCAGCGGCCGCTTAACTGCTGAAAGAATACTCTTTATCCACTGATTC	66°C
632rub_F	ACTGTCTAGAGAAAATGACGACGACTCTCCTCATGG	64°C
632rub_R	GCAGCGGCCGCTTATCCACTGAAATCATAAGAGCCAAGG	65°C
633rub_F	ACTGTCTAGAGAAAATGGCTTCTTCACTGAAGAAGCTTATC	65°C
633rub_R	GCAGCGGCCGCTTATGTATCCACTGTACCAGAGCCAAG	65°C
634rub_F	ACTGTCTAGAGAAAATGGCTTCTTCACTGAAGAAGCTTATCTC	66°C
634rub_R	GCAGCGGCCGCTTATGTATCCACTGTACCAGAGCCAAGG	67°C
SCE1-1F F	AAYTAYGCYGAYTAYTACAAC	53°C
SCE1-2F	AAYTAYGCRGAYTAYTACAAC	53°C
SCE1-3F	AAYTAYGCYGAYTAYTACAAT	51°C
SCE1-4F	AAYTAYGCRGAYTAYTACAAT	51°C
SCE1-5F	AAYTAYGCYGAYTAYTATAAC	51°C
SCE1-6F	AAYTAYGCRGAYTAYTATAAC	49°C
SCE1-7F	AAYTAYGCYGAYTAYTATAAT	49°C
SCE1-8F	AAYTAYGCRGAYTAYTATAAT	52°C
SCE2-1F F	GGYAAYGAYTAYAAYTACC	52°C
SCE2-2F	GGRAAYGAYTAYAAYTACC	52°C
SCE2-3F	GGYAAYGAYTAYAAYTATCC	52°C
SCE2-4F	GGRAAYGAYTAYAAYTATCC	61°C
SCE4-1F F	TAYCARGARCCRACRAARTACGG	61°C
SCE4-2F	TAYCARGARCCYACYAARTACGG	61°C
SCE4-3F	TAYCARGARCCRACYAARTACGG	61°C
SCE4-4F	TAYCARGARCCYACRAARTACGG	60°C
SCE4-5F	TAYCARGARCCRACRAARTATGG	60°C
SCE4-6F	TAYCARGARCCYACYAARTATGG	60°C
SCE4-7F	TAYCARGARCCRACYAARTATGG	60°C
SCE4-8F	TAYCARGARCCYACRAARTATGG	60°C
RT-Homerace	CTATCTCGGTCTAATTTTTTTTTTTTTT	56°C
NM631spez_F	TGTTAACCACCTTCCTCAATCC	59°C
NM631spez_R	GTGAGATACGCGGGATAGCAT	60°C
NM632spez_F	AACGTGAGCTTCAATCAAGG	55°C

NM632spez_R	GATATGCCGTGGAACATCCTATTG	61°C
NM633spez_F	GATGTCGGCGCTTTACATCTATC	61°C
NM633spez_R	GATGATCAAATCCTGTAGTTTGGTTTC	61°C
NM634spez_F	CCTAACTTATGCGCCTCGTC	60°C
NM634spez_R	CGTTGAGCAATGGGTAACAAC	58°C
ubi-RT-fw	ACTTCACTTGGTGCTCAGGC	60°C
ubi-RT-rev	CCTTGACGTTGTCAATGGTG	58°C
Lip2RT_for	CAGTTGGATGTAGCGCCGCGTATC	60°C
Lip2RT_rev	CTTCTGGTGTGCGGCTTCGGTTATATG	62°C
ubi_for	AAGCCAAGATCCAGGACAAAG	58°C
ubi_rev	CGAGCCAAAGCCATCAAAGAC	57°C
LBa1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	68°C
640_LP-5UTR	GTCTATGTGTATCCCATGCATAAC	61°C
640_RP-5UTR	GGAAGAAGCTTTCGCCATAAGG	63°C
640_LP3	GATTCCATCGCCGACACCGGAAATTATC	69°C
650_LP2	GGAGTTGTATAGCGACCATTG	60°C
650_RP2	CAGCTTCGGTGATTCCATTG	61°C
660_LP1	GGTGTTCAGCTTGACATCTTC	61°C
660_RP2	ATCCTGCCGTACAAGCAATC	62°C
660_LP2	GCCGTCTCATCATCGACTTC	62°C
660_RP3	CAGGACCAGTCGAAAGCAGGTGATG	69°C
670_LP2-Pro	GGCACCGCGGACAAGATATTGTTAATCG	69°C
670_RP2-Pro	GGTGTCTGCGATGGAATCACCAAAG	68°C

Tabelle A2: Dokumentation der Versuchsbedingungen bei dem durchgeführten UV-B-Stressexperiment.

Versuch Nr.: V386		Von: 05 – 10 – 2009	Bis: 21 – 10– 2009	Date: 05 – 10 – 2009
Ansprechpartner -in (Tel.):	Clauß, Wolfram (IPB-Halle) Albert (4636)		L-Buch EK13neu S. 135 L.-Buch Albert S. 95	
Sinapinstoffwechsel bei Rapskeimlingen: Sinapoylmalat unter Einfluss von UV-B-Strahlung				
EK 13				

Scheibenbelegung / Akklimatisierung		**Scheibenbelegung / Behandlung**	
Fensterglas 8 mm	Sanalux/ +UV-Plexiglas	Fensterglas 8 mm	Sanalux/ +UV-Plexiglas
Fensterglas 8 mm	Sanalux/ +UV-Plexiglas	Fensterglas 8 mm	Sanalux/ +UV-Plexiglas
Tür		**Tür**	

Lichtstufe	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
HQI	**1, 2**					
HQI Filter	**6**					
HAL	**1, 3**					
HAL UW						
Blau	**1**					
UVB	**1 – 4**					

Lichtprogramm: 13_v386.txt (ANAVIS-Memory-Nr. 86)		
Klima	**Max**	**Min**
Temperatur	**24°C**	**24 °C**
Feuchte	**70 %**	**70 %**
Plattformdaten: PAR: (µmol/(m²*s)) // UVA: (W/m²) // UVB: (MED/h)		
700 // 20.2 // 4.5		
Datenfiles: N:\Physik\EK13_neu\2009\V386		
*.spe	gew*.txt	

MS-Daten der identifizierten sekundären Verbindungen sowie deren chemische Strukturen:

Tabelle A3: Massenspektrometriedaten der annotierten sekundären Samenkomponenten.

No.	Compound name	al*	Citation	Elemental composition	ret. time [s]	Quasi-molecular ion			Observed fragment ions upon CID (precursor ion marked in bold)
						Type	calculated *m/z*	measured *m/z*** median ± sd×10^3	
1	benzoylcholine	1	[1]	$C_{12}H_{18}NO_2^+$	125	$[M]^+$	208.1332	208.1321 ± 1.4	**208**, 149, 105, 77
2	feruloylcholine (FC)	1	[1]	$C_{15}H_{22}NO_4^+$	133	$[M]^+$	280.1543	280.1530 ± 1.6	**280**, 221, 206, 177, 149, 145, 117
3	5-hydroxy-FC	2	[1]	$C_{15}H_{22}NO_5^+$	109	$[M]^+$	296.1493	296.1486 ± 2.1	**296**, 237, 222, 193, 161, 133
4	sinapoylcholine (SC)	1	[1]	$C_{16}H_{24}NO_5^+$	135	$[M]^+$	310.1646	310.1656 ± 1.8	**310**, 251, 207, 175, 147
5	FC(4-*O*-8')G	1	[1]	$C_{25}H_{34}NO_8^+$	143/146	$[M]^+$	476.2279	476.2294 ± 2.9	**476**, 417, 221, 206, 177, 149, 145
6	FC(4-*O*-8')S	2	[1]	$C_{26}H_{36}NO_9^+$	141/146	$[M]^+$	506.2385	506.2402 ± 3.0	**506**, 447, 221, 206, 177, 149, 145
7	SC(4-*O*-8')G	2	[1]	$C_{26}H_{36}NO_9^+$	171/186	$[M]^+$	506.2385	506.2399 ± 3.0	**506**, 447, 251, 207, 175, 147
8	SC(4-*O*-8')S	2	[1]	$C_{27}H_{38}NO_{10}^+$	168/183	$[M]^+$	536.2490	536.2507 ± 3.4	**536**, 477, 251, 207, 175, 147
9	FC(5-8)G	1	[1]	$C_{25}H_{32}NO_7^+$	215	$[M]^+$	458.2173	458.2187 ± 3.2	**458**, 399, 381, 369
10	2-*O*-sinapoylmalate	1	[2]	$C_{15}H_{16}O_9$	193	$[M+Na]^+$	363.0687	363.0686 ± 2.2	**341**, 207, 175, 147, 119 **339**, 223, 208, 179, 164, 149, 133, 115
11	hydroxybenzoate *O*-hexoside	2	unknown	$C_{13}H_{16}O_8$	92	$[M+Na]^+$	323.0737	323.0726 ± 2.3	**301**, 283, 163, 145, 139, 121 **299**, 239, 209, 179, 151, 137
12	caffeate di-*O*-hexoside	2	unknown	$C_{21}H_{28}O_{14}$	97	$[M+Na]^+$	527.1371	527.1398 ± 3.5	**505**, 325, 235, 181, 163, 145, 127 **503**, 443, 383, 365, 341, 323, 281, 221, 203, 179, 161
13	cyclic spermidine conjugate	2	[2]	$C_{27}H_{33}N_3O_6$	180/186	$[M+H]^+$	496.2442	496.2455 ± 3.0	**496**, 479, 478, 425, 408, 351, 325, 283, 268, 232, 216, 191, 175, 149, 121, 112
14	UC#1 (choline ester)	3	unknown	$C_{18}H_{34}NO_4^+$	177	$[M]^+$	328.2482	328.2481 ± 1.8	**328**, 269, 251, 225, 207, 193, 179, 163, 135, 121
15	UC#2 (choline ester)	3	unknown	$C_{25}H_{31}N_2O_6^+$	192	$[M]^+$	455.2177	455.2179 ± 2.9	**455**, 396, 298, 263, 251, 219, 204, 167, 146
16	UC#3 (phenolic choline ester)	3	unknown	$C_{26}H_{36}NO_8^+$	175	$[M]^+$	490.2435	490.2441 ± 3.7	**490**, 431, 221, 206, 177, 145
17	UC#4 (sulfated)	4	unknown	$C_{24}H_{22}N_2O_{12}S$	145	$[M+Na\text{-}SO_3]^+$	505.1218	505.1236 ± 3.8	**483**, 465, 336, 318, 300, 282, 264, 254, 246, 192, 174, 146 **561**, 505, 448, 432, 368, 292, 270, 262, 232, 210, 190, 172, 146, 144, 136

18	UC#5 (sulfated)	4	unknown	$C_{24}H_{22}N_2O_{11}S$	181	$[M+Na\text{-}SO_3]^+$	489.1268	489.1307 ± 3.9	**467**, 449, 336, 318, 300, 282, 264, 254, 246, 192, 174, 146 **545**, 448, 432, 368, 292, 270, 262, 232, 190, 176, 172, 146, 144
19	syringoylcholine (SyC)	1	unknown	$C_{14}H_{22}NO_5^+$	89	$[M]^+$	284.1492	284.1484 ± 1.1	**284**, 225, 181, 153, 138
20	vanilloylcholine 4-*O*-hexoside	2	[1]	$C_{19}H_{30}NO_9^+$	64	$[M]^+$	416.1915	416.1924 ± 1.9	**416**, 357, 254, 195, 180, 151
21	SyC 4-*O*-hexoside	2	[1]	$C_{20}H_{32}NO_{10}^+$	73	$[M]^+$	446.2021	446.2030 ± 2.1	**446**, 284, 225, 181, 153, 138
22	SyC(4-*O*-8´)G	2	[1]	$C_{24}H_{34}NO_9^+$	134/148	$[M]^+$	480.2228	480.2239 ± 2.5	**480**, 421, 225, 181
23	caffeoylcholine 4-*O*-hexoside	2	unknown	$C_{20}H_{30}NO_9^+$	83/94	$[M]^+$	428.1915	428.1925 ± 1.9	**428**, 369, 266, 207, 163
24	FC 4-*O*-hexoside	2	unknown	$C_{21}H_{32}NO_9^+$	90/105	$[M]^+$	442.2072	442.2082 ± 2.3	**442**, 383, 280, 221
25	SC 4-*O*-glucoside	1	[1, 3]	$C_{22}H_{34}NO_{10}^+$	96/104	$[M]^+$	472.2177	472.2202 ± 3.4	**472**, 413, 310, 251, 207, 175
26	SC 4-*O*-dihexoside	2	unknown	$C_{28}H_{44}NO_{15}^+$	90/99	$[M]^+$	634.2705	634.2724 ± 3.2	**634**, 310, 251
27	SC 4-*O*-(hexoside-pentoside)	2	unknown	$C_{27}H_{42}NO_{14}^+$	101	$[M]^+$	604.2600	604.2617 ± 2.9	**604**, 310, 251, 207
28	FC(4-*O*-8´)G 4-*O´*-hexoside	2	[1]	$C_{31}H_{44}NO_{13}^+$	111/124	$[M]^+$	638.2807	638.2822 ± 2.2	**638**, 579, 221, 206, 177
29	SC(4-*O*-8´)G 4-*O´*-hexoside	2	[1]	$C_{32}H_{46}NO_{14}^+$	128/140	$[M]^+$	668.2913	668.2922 ± 3.1	**668**, 609, 251, 207
30	SC(4-*O*-8´)S 4-*O´*-hexoside	2	[1]	$C_{33}H_{48}NO_{15}^+$	133/143	$[M]^+$	698.3019	698.3039 ± 3.1	**698**, 639, 251, 207
31	FC(5-8)G 4-*O´*-hexoside	1	[1]	$C_{31}H_{42}NO_{12}^+$	153	$[M]^+$	620.2702	620.2717 ± 2.9	**620**, 561, 543, 531, 399, 381, 369
32	sinapate 4-*O*-glucoside	2	[3]	$C_{17}H_{22}O_{10}$	118	$[M+Na]^+$	409.1105	409.1109 ± 1.9	**387**, 225, 207, 192, 175, 147 **385**, 265, 223, 208, 179
33	Methylsinapate	2	unknown	$C_{12}H_{14}O_5$	314	$[M+Na]^+$	261.0733	261.0735 ± 0.9	**239**, 207, 192, 175, 147, 119
34	ferulate 4-*O*-hexoside	2	unknown	$C_{16}H_{20}O_9$	110	$[M+Na]^+$	379.1000	379.0974 ± 3.1	**379**, 217, 185 **355**, 193, 178, 149, 134
35	syringate 4-*O*-glucoside	1	[3]	$C_{15}H_{20}O_{10}$	94	$[M+Na]^+$	383.0949	383.0942 ± 3.3	**383**, 221, 185 **359**, 197, 182, 153, 138
36	kaempferol 3-*O*-sophoroside	1	[2]	$C_{27}H_{30}O_{16}$	169	$[M+Na]^+$	633.1426	633.1451 ± 3.0	**611**, 449, 287
37	kaempferol 3-O-sinapoylsophoroside	1	[2]	$C_{38}H_{40}O_{20}$	185	$[M+Na]^+$	839.2001	839.2044 ± 7.4	**817**, 531, 449, 369, 351, 287, 225, 207
38	UCE#6 (phenolic choline ester)	3	unknown	$C_{30}H_{44}NO_{13}^+$	128	$[M]^+$	626.2897	626.2823 ± 3.0	**626**, 567, 195, 151

39	UCE#7 (phenolic choline ester)	3	unknown	$C_{15}H_{26}NO_4^+$	175	$[M]^+$	284.1856	284.1848 ± 1.1	**284**, 225, 207, 181, 179, 163, 152, 151, 137, 135
40	UCE#8 (phenolic choline ester)	3	unknown	$C_{17}H_{28}NO_4^+$	229	$[M]^+$	310.2013	310.2012 ± 1.2	**310**, 251, 233, 223, 207, 205, 195, 189, 177, 161, 133, 105, 73
41	UCE#9 (phenolic choline ester)	3	unknown	$C_{26}H_{42}NO_{12}^+$	188	$[M]^+$	560.2702	560.2715 ± 2.4	**560**, 501, 409, 381, 325, 281, 263, 253, 251, 233, 205, 189, 177, 161, 133
42	UCE#10 (phenolic choline ester)	3	unknown	$C_{22}H_{34}NO_{11}^+$	97	$[M]^+$	488.2126	488.2140 ± 2.4	**488**, 326, 310, 267, 251, 203, 181
43	2-*O*-feruloylmalate	2	unknown	$C_{14}H_{14}O_8$	191	$[M+Na]^+$	333.0581	333.0571 ± 2.2	**311**, 177, 149, 145 **309**, 193, 178, 149, 134, 133
44	methylsinapate 4-*O*-hexoside	2	unknown	$C_{18}H_{24}O_{10}$	200	$[M+Na]^+$	423.1262	423.1261 ± 3.6	**423**, 261, 185
45	sinapate 4-*O*-pentoside	2	unknown	$C_{16}H_{20}O_9$	131	$[M+Na]^+$	379.1000	379.1005 ± 3.1	**379**, 247, 155 **355**, 223, 208, 179, 164, 149
46	sinapate-cysteine	2	unknown	$C_{14}H_{19}NO_7S$	90	$[M+H]^+$	346.0955	346.0952 ± 2.7	**346**, 225, 183,155, 149, 122
47	sinapate-glutathione	2	unknown	$C_{21}H_{29}N_3O_{11}S$	101	$[M+H]^+$	532.1596	532.1596 ± 4.7	**532**, 308, 291, 290, 233, 225, 183, 179, 162
48	*N*-sinapoyl-*S*-methylcysteine sulfoxide	2	unknown	$C_{15}H_{19}NO_7S$	128	$[M+H]^+$	358.0955	358.0964 ± 2.8	**358**, 296, 207, 175, 152, 147, 88
49	UC#11	4	unknown	$C_{19}H_{32}O_9$	187	$[M+Na]^+$	427.1939	427.1938 ± 3.7	**427**, 265, 247, 229, 185
50	UC#12	4	unknown	$C_{12}H_{11}NO_3$	218/242	$[M+Na]^+$	240.0631	240.0629 ± 1.6	**218**, 200, 182, 172, 158, 144, 130

*annotation level; **N=27; citation, [1] C. Böttcher, E. von Roepenack-Lahaye, J. Schmidt, S. Clemens and D. Scheel. *J. Mass. Spectrom.* **2009**, *44*, 466-467; [2] A. Baumert, C. Milkowski, J. Schmidt, M. Nimtz, V. Wray and D. Strack. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 1334-1345; [3] K. Wolfram, J. Schmidt, V. Wray, C. Milkowski, W. Schliemann and D. Strack. *Phytochemistry* **2010**, *71*, 1076-1084; [unknown] not identified in *B. napus*.

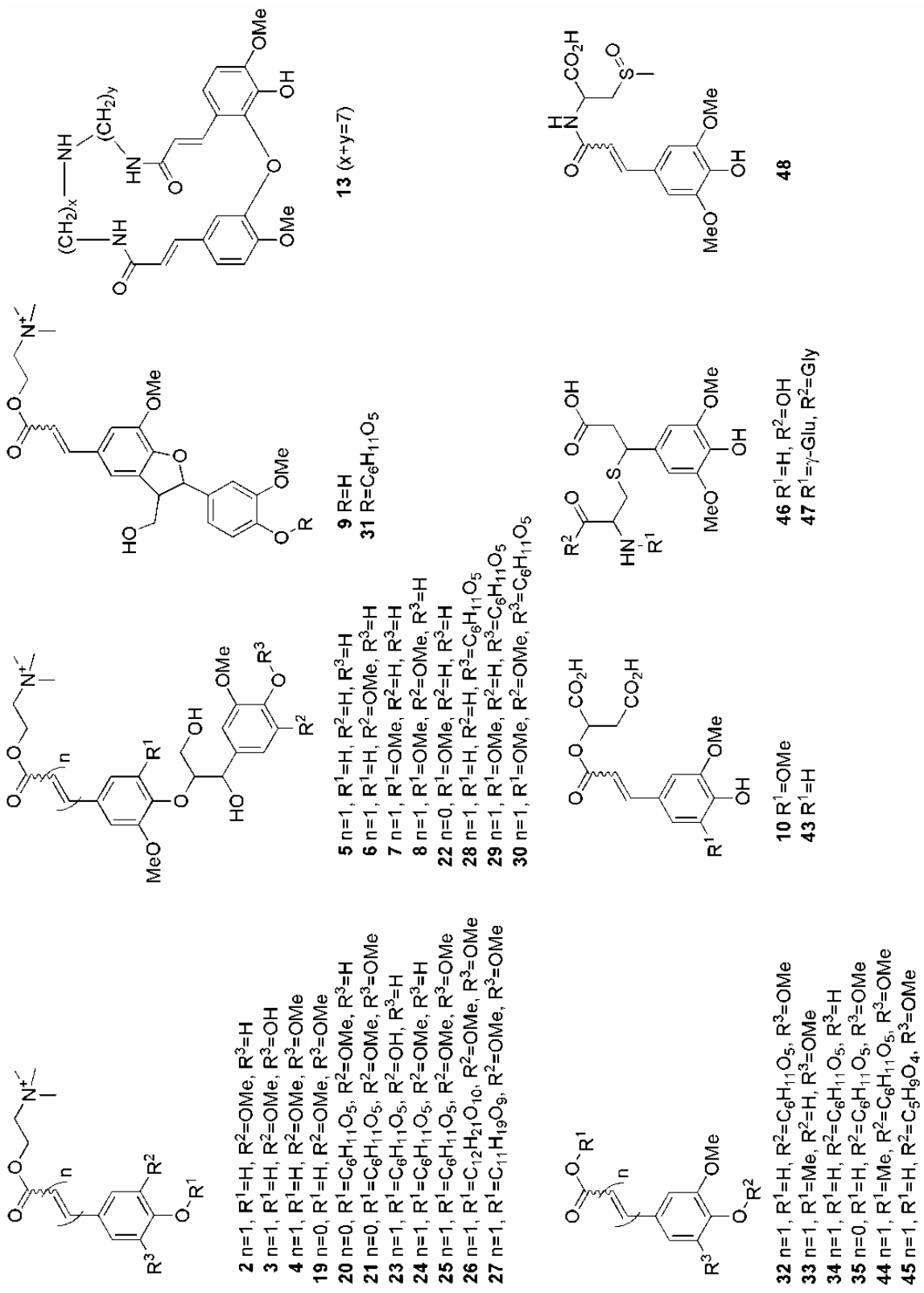


Abbildung A1: Strukturen der identifizierten Samenkomponenten mittels Massenspektrometrie.

Hydroxybenzoat *O*-Hexosid (11). UPLC/ESI(+)-CID-MS (QStar Pulsar i) of *m/z* 301 $[M+H]^+$, DP1 = 30 V, CE = 25 eV; *m/z* (rel. int. (%)) = 301.094 (12, $C_{13}H_{17}O_8^+$), 283.079 (3, $C_{13}H_{15}O_7^+$), 163.061 (2, $C_6H_{11}O_5^+$), 145.046 (4, $C_6H_9O_4^+$), 139.039 (100, $C_7H_7O_3^+$), 121.031 (3, $C_7H_5O_2^+$). UPLC/ESI(-)-CID-MS (micrOTOF-Q) of *m/z* 299 $[M-H]^-$, ISCID = 0 V, CE = 17 eV; *m/z* (rel. int. (%)) = 299.074 (82, $C_{13}H_{15}O_8^-$). 239.055 (69, $C_{11}H_{11}O_6^-$), 209.044 (7, $C_{10}H_9O_5^-$), 179.033 (77, $C_9H_7O_4^-$), 151.037 (12, $C_8H_7O_3^-$), 137.023 (100, $C_7H_5O_3^-$).

Caffeat di-*O*-Hexosid (12). UPLC/ESI(+)-CID-MS (QStar Pulsar i) of *m/z* 505 $[M+H]^+$, DP1 = 40 V, CE = 25 eV; *m/z* (rel. int. (%)) = 325.088 (1, $C_{15}H_{17}O_8^+$), 235.057 (10, $C_{12}H_{11}O_5^+$), 181.051 (100, $C_9H_9O_4^+$), 163.043 (35, $C_9H_7O_3^+$, $C_6H_{11}O_5^+$), 145.051 (7, $C_6H_9O_4^+$), 127.040 (2, $C_6H_7O_3^+$). UPLC/ESI(-)-CID-MS (micrOTOF-Q) of *m/z* 503 $[M-H]^-$, ISCID = 0 V, CE = 17 eV; *m/z* (rel. int. (%)) = 503.138 (82, $C_{21}H_{27}O_{14}^-$), 443.116 (1, $C_{19}H_{23}O_{12}^-$), 383.095 (1, $C_{17}H_{19}O_{10}^-$), 365.082 (1, $C_{17}H_{17}O_9^-$), 341.085 (100, $C_{15}H_{17}O_9^-$), 323.073 (11, $C_{15}H_{15}O_8^-$), 281.064 (1, $C_{13}H_{13}O_7^-$), 221.044 (1, $C_{11}H_9O_5^-$), 203.036 (1, $C_{11}H_7O_4^-$), 179.034 (7, $C_9H_7O_4^-$), 161.023 (3, $C_9H_5O_3^-$).

UC#1 (14). UPLC/ESI(+)-CID-MS (micrOTOF-Q) of *m/z* 328 $[M]^+$, ISCID = 0 V, CE = 17 eV; *m/z* (rel. int. (%)) = 328.245 (80, $C_{18}H_{34}NO_4^+$), 269.173 (10, $C_{15}H_{25}O_4^+$), 251.162 (100, $C_{15}H_{23}O_3^+$), 225.145 (2, $C_{13}H_{21}O_3^+$), 207.136 (14, $C_{13}H_{19}O_2^+$), 193.122 (3, $C_{12}H_{17}O_2^+$), 179.141 (5, $C_{12}H_{19}O^+$), 163.146 (15, $C_{12}H_{19}^+$), 135.115 (20, $C_{10}H_{15}^+$).

UC #2 (15). UPLC/ESI(+)-CID-MS (micrOTOF-Q) of *m/z* 455 $[M]^+$, ISCID = 0 V, CE = 10 eV; *m/z* (rel. int. (%)) = 455.215 (100, $C_{25}H_{31}N_2O_6^+$), 396.142 (55, $C_{22}H_{22}NO_6^+$). UPLC/ESI(+)-CID-MS of *m/z* 455 $[M]^+$, ISCID = 0 V, CE = 25 eV; *m/z* (rel. int. (%)) = 396.141 (100, $C_{22}H_{22}NO_6^+$), 298.105 (83, $C_{17}H_{16}NO_4^+$), 263.089 (39, $C_{14}H_{15}O_5^+$), 251.089 (64, $C_{13}H_{15}O_5^+$), 219.062 (39, $C_{12}H_{11}O_4^+$), 204.064 (44, $C_{11}H_{10}NO_3^+$), 167.069 (9, $C_9H_{11}O_3^+$), 146.059 (18, , $C_9H_8NO^+$).

UC#3 (16). UPLC/ESI(+)-CID-MS (micrOTOF-Q) of *m/z* 490 $[M]^+$, ISCID = 0 V, CE = 17 eV; *m/z* (rel. int. (%)) = 490.242 (11, $C_{26}H_{36}NO_8^+$), 431.169 (18, $C_{23}H_{27}O_8^+$), 221.080 (100, $C_{12}H_{13}O_4^+$). UPLC/ESI(+)-CID-MS of *m/z* 490 $[M]^+$, ISCID = 0 V, CE = 25 eV; *m/z* (rel. int. (%)) = 221.080 (100, $C_{12}H_{13}O_4^+$), 206.057 (2, $C_{11}H_{10}O_4^{+\bullet}$), 177.055 (5, $C_{10}H_9O_3^+$), 145.028 (4, $C_9H_5O_2^+$).

UC#4 (17). UPLC/ESI(+)-CID-MS (micrOTOF-Q) of *m/z* 483 $[M+H\text{-}SO_3]^+$, ISCID = 0 V, CE = 10 eV; *m/z* (rel. int. (%)) = 483.137 (17, $C_{24}H_{23}N_2O_9^+$), 465.127 (4, $C_{24}H_{21}N_2O_8^+$), 336.104 (96, $C_{16}H_{18}NO_7^+$), 318.093 (100, $C_{16}H_{16}NO_6^+$), 300.083 (27, $C_{16}H_{14}NO_5^+$), 282.073 (5, $C_{16}H_{12}NO_4^+$), 264.084 (11, $C_{13}H_{14}NO_5^+$), 254.078 (2, $C_{15}H_{12}NO_3^+$), 246.073 (3, $C_{13}H_{12}NO_4^+$), 192.064 (58, $C_{10}H_{10}NO_3^+$), 174.055 (21, $C_{10}H_8NO_2^+$), 146.059 (9, $C_9H_8NO^+$). UPLC/ESI(-)-CID-MS (micrOTOF-Q) of *m/z* 561 $[M-H]^-$, ISCID = 0 V, CE = 25 eV; *m/z* (rel. int. (%)) = 561.080 (100, $C_{24}H_{21}N_2O_{12}S^-$), 505.056 (2, $C_{21}H_{17}N_2O_{11}S^-$), 448.034 (10, $C_{19}H_{14}NO_{10}S^-$), 432.057 (14, $C_{16}H_{18}NO_{11}S^-$), 368.075 (3, $C_{19}H_{14}NO_7^-$), 292.081 (26, $C_{14}H_{14}NO_6^-$), 270.006 (2, $C_{10}H_8NO_6S^-$), 262.070 (4, $C_{13}H_{12}NO_5^-$), 232.061 (7, $C_{12}H_{10}NO_4^-$), 210.007 (2, $C_5H_8NO_6S^-$), 190.050 (54, $C_{10}H_8NO_3^-$), 172.039 (2, $C_{10}H_6NO_2^-$), 146.058 (7, $C_9H_8NO^-$), 144.043 (2, $C_9H_6NO^-$), 135.970 (6, $C_2H_2NO_4S^-$).

UC#5 (18). UPLC/ESI(+)-CID-MS (micrOTOF-Q) of *m/z* 467 $[M+H\text{-}SO_3]^+$, ISCID = 0 V, CE = 10 eV; *m/z* (rel. int. (%)) = 467.131 (10, $C_{24}H_{23}N_2O_8^+$), 449.131 (1, $C_{24}H_{21}N_2O_7^+$), 336.104 (78, $C_{16}H_{18}NO_7^+$), 318.093 (100, $C_{16}H_{16}NO_6^+$), 300.083 (29, $C_{16}H_{14}NO_5^+$), 282.072 (7, $C_{16}H_{12}NO_4^+$), 264.083 (12, $C_{13}H_{14}NO_5^+$), 254.077 (5, $C_{15}H_{12}NO_3^+$), 246.073 (5, $C_{13}H_{12}NO_4^+$), 192.064 (65, $C_{10}H_{10}NO_3^+$), 174.053 (31, $C_{10}H_8NO_2^+$), 146.059 (12, $C_9H_8NO^+$). UPLC/ESI(-)-CID-MS (micrOTOF-Q) of *m/z* 545 $[M-H]^-$, ISCID = 0 V, CE = 25 eV; *m/z* (rel. int. (%)) = 545.086 (100, $C_{24}H_{21}N_2O_{11}S^-$), 448.035 (8, $C_{19}H_{14}NO_{10}S^-$), 432.057 (12, $C_{16}H_{18}NO_{11}S^-$), 368.077 (2, $C_{19}H_{14}NO_7^-$), 292.081 (22, $C_{14}H_{14}NO_6^-$), 270.006 (2, $C_{10}H_8NO_6S^-$), 262.070 (5, $C_{13}H_{12}NO_5^-$), 232.061 (10, $C_{12}H_{10}NO_4^-$), 190.050 (79, $C_{10}H_8NO_3^-$), 176.002 (2, $C_5H_6NO_4S$-), 172.040 (2, $C_{10}H_6NO_2^-$), 146.060 (12, $C_9H_8NO^-$), 144.043 (4, $C_9H_6NO^-$).

Syringoylcholin (19). UPLC/ESI(+)-CID-MS (QStar Pulsar i) of *m/z* 284 $[M]^+$, DP1 = 50 V, CE = 25 eV; *m/z* (rel. int. (%)) = 284.146 (2, $C_{14}H_{22}NO_5^+$), 225.076 (100, $C_{11}H_{13}O_5^+$), 181.051 (9, $C_9H_9O_4^+$). UPLC/ESI(+)-CID-MS (QStar Pulsar i) of *m/z* 284 $[M]^+$, DP1 = 50 V, CE = 40 eV; *m/z* (rel. int. (%)) = 225.073 (31, $C_{11}H_{13}O_5^+$), 181.050 (100, $C_9H_9O_4^+$), 153.055 (11, $C_8H_9O_3^+$), 138.032 (5, $C_7H_6O_3^{\bullet+}$).

Caffeoylcholin 4-*O*-Hexosid (23). UPLC/ESI(+)-CID-MS (QStar Pulsar i) of *m/z* 428 $[M]^+$, DP1 = 50 V, CE = 25 eV; *m/z* (rel. int. (%)) = 428.192 (100, $C_{20}H_{30}NO_9^+$), 369.120 (76, $C_{17}H_{21}NO_9^+$), 266.144 (2), 207.065 (76), 163.042 (1).

Feruloylcholin (FC) 4-*O*-Hexosid (24). UPLC/ESI(+)-CID-MS (QStar Pulsar i) of *m/z* 442 $[M]^+$, DP1 = 50 V, CE = 25 eV; *m/z* (rel. int. (%)) = 442.207 (81, $C_{21}H_{32}NO_9^+$), 383.131 (4, $C_{18}H_{23}O_9^+$), 280.156 (3, $C_{15}H_{22}NO_4^+$), 221.081 (100, $C_{12}H_{13}O_4^+$).

Sinapoylcholin (SC) 4-*O*-Dihexosid (26). UPLC/ESI(+)-CID-MS (QStar Pulsar i) of *m/z* 634 $[M]^+$, DP1 = 50 V, CE = 40 eV; *m/z* (rel. int. (%)) =634.275 (18, $C_{28}H_{44}NO_{15}^+$), 310.167 (4, $C_{16}H_{24}NO_5^+$), 251.091 (100, $C_{13}H_{15}O_5^+$).

Sinapoylcholin (SC) 4-*O*-(Hexosid-Pentosid) (27). UPLC/ESI(+)-CID-MS (QStar Pulsar i) of *m/z* 604 $[M]^+$, DP1 = 50 V, CE = 40 eV; *m/z* (rel. int. (%)) =604.263 (16, $C_{27}H_{42}NO_{14}^+$), 310.164 (8, $C_{16}H_{24}NO_5^+$), 251.091 (100, $C_{13}H_{15}O_5^+$), 207.065 (1, $C_{11}H_{11}O_4^+$).

Sinapat 4-*O´*-Glucosid (32). UPLC/ESI(-)-CID-MS (micrOTOF-Q) of *m/z* 385 $[M-H]^-$, ISCID = 0 V, CE = 10 eV; *m/z* (rel. int. (%)) = 385.112 (27, $C_{17}H_{21}O_{10}^-$), 265.067 (2, $C_{13}H_{13}O_6^-$), 223.060 (100, $C_{11}H_{11}O_5^-$), 208.040 (1, $C_{10}H_8O_5^{\bullet-}$), 179.071 (1, $C_{10}H_{11}O_3^-$). Komponente 32 kann eindeutig von dem 1-*O*-sinapoyl-β-D-glucopyranose-Standard durch die Retentionszeit (t_r = 134 s) und das negative Ionen-CID-Massenspektrum unterschieden werden [UPLC/ESI(-)-CID-MS (micrOTOF-Q) of *m/z* 385 $[M-H]^-$, ISCID = 0 V, CE = 10 eV; *m/z* (rel. int. (%)) = 385.112 (100, $C_{17}H_{21}O_{10}^-$), 325.090 (5, $C_{15}H_{17}O_8^-$), 295.084 (2, $C_{14}H_{15}O_7^-$), 265.068 (8, $C_{13}H_{13}O_6^-$), 247.058 (30, $C_{13}H_{11}O_5^-$), 223.060 (39, $C_{11}H_{11}O_5^-$), 205.050 (43, $C_{11}H_9O_4^-$)].

Methylsinapat (33). UPLC/ESI(+)-CID-MS (micrOTOF-Q) of *m/z* 239 $[M+H]^+$, ISCID = 0 V, CE = 10 eV; *m/z* (rel. int. (%)) = 239.092 (1, $C_{12}H_{15}O_5^+$), 207.064 (100, $C_{11}H_{11}O_4^+$), 192.041 (5, $C_{10}H_8O_4^{\bullet+}$), 175.038 (82, $C_{10}H_7O_3^+$), 147.044 (23, $C_9H_7O_2^+$), 119.048 (5, $C_8H_7O^+$).

Ferulat 4-*O´*-Hexosid (34). UPLC/ESI(+)-CID-MS (QStar Pulsar i) of *m/z* 379 $[M+Na]^+$, DP1 = 50 V, CE = 25 eV; *m/z* (rel. int. (%)) = 379.097 (100, $C_{16}H_{20}O_9Na^+$), 217.046 (7, $C_{10}H_{10}O_4Na^+$), 185.040 (3, $C_6H_{10}O_5Na^+$). UPLC/ESI(-)-CID-MS (micrOTOF-Q) of *m/z* 355 $[M-H]^-$, ISCID = 0 V, CE = 17 eV; *m/z* (rel. int. (%)) = 355.103 (2, $C_{16}H_{19}O_9^-$), 193.049 (100, $C_{10}H_9O_4^-$), 178.026 (20, $C_9H_6O_4^{-\bullet}$), 149.058 (12, $C_9H_9O_2^-$), 134.036 (11, $C_8H_6O_2^{-\bullet}$).

Syringat 4-*O´*-Glucosid (35). UPLC/ESI(+)-CID-MS (QStar Pulsar i) of *m/z* 383 $[M+Na]^+$, DP1 = 50 V, CE = 25 eV; *m/z* (rel. int. (%)) = 383.095 (100, $C_{16}H_{20}O_9Na^+$), 221.043 (17, $C_{10}H_{10}O_4Na^+$), 185.042 (21, $C_6H_{10}O_5Na^+$). UPLC/ESI(-)-CID-MS (micrOTOF-Q) of *m/z* 359 $[M-H]^-$, ISCID = 0 V, CE = 17 eV; *m/z* (rel. int. (%)) = 359.099 (33, $C_{15}H_{19}O_{10}^-$), 197.045 (100, $C_9H_9O_5^-$), 182.020 (15, $C_8H_6O_5^{-\bullet}$), 153.055 (20, $C_8H_9O_3^-$), 138.031 (14, $C_7H_6O_3^{-\bullet}$).

Kaempferol 3-*O*-Sophorosid (36). UPLC/ESI(+)-CID-MS (micrOTOF-Q) of *m/z* 611 $[M+H]^+$, ISCID = 0 V, CE = 10 eV; *m/z* (rel. int. (%)) = 611.161 (2, $C_{27}H_{31}O_{16}^+$), 449.105 (20, $C_{21}H_{21}O_{11}^+$, $[M+H-Hex]^+$), 287.055 (100, $C_{15}H_{11}O_6^+$, $[M+H-2Hex]^+$). UPLC/ESI(+)-CID-MS (micrOTOF-Q) of *m/z* 287 $[M+H-2C_6H_{10}O_5]^+$, ISCID = 0 V, CE = 25 eV; *m/z* (rel. int. (%)) = 287. 055 (100, $C_{15}H_{11}O_6^+$), 269.044 (3, $C_{15}H_9O_5^+$), 258.052 (18, $C_{14}H_{10}O_5^{\bullet+}$), 241.047 (11, $C_{14}H_9O_4^+$), 231.065 (9, $C_{13}H_{11}O_4^+$), 229.050 (7, $C_{13}H_9O_4^+$), 213.054 (20, $C_{13}H_9O_3^+$), 185.060 (5, $C_{12}H_9O_2^+$), 165.017 (13, $C_8H_5O_4^+$), 153.016 (34, $C_7H_5O_4^+$), 137.022 (5, $C_7H_5O_3^+$), 121.027 (7, $C_7H_5O_2^+$). Das pseudo-MS^3 Spektrum von *m/z* 287 ist dem $[M+H]^+$ Spektrum vom Kaempferolstandard ähnlich.

Kaempferol 3-*O*-Sinapoylsophorosid (37). UPLC/ESI(+)-CID-MS (QStar Pulsar i) of *m/z* 817 $[M+H]^+$, DP1 = 50 V, CE = 25 eV; *m/z* (rel. int. (%)) = 817.220 (2, $C_{38}H_{41}O_{20}^+$, $[M+H]^+$), 531.167 (1, $C_{23}H_{31}O_{14}^+$, [M+H-Kaempferol]$^+$), 449.103 (3, $C_{21}H_{21}O_{11}^+$, [M+H-SinapoylHex]$^+$), 369.115 (100, $C_{17}H_{21}O_9^+$, [SinapoylHex]), 351.104 (11, $C_{17}H_{19}O_8^+$, [SinapoylHex-H_2O]), 287.053 (21, $C_{15}H_{11}O_6^+$, [Kaempferol+H]$^+$), 225.077 (1, $C_{11}H_{13}O_5^+$, [Sinapate+H]$^+$), 207.063 (17, $C_{11}H_{11}O_4^+$, [Sinapoyl]$^+$). Das pseudo-MS^3 Spektrum von *m/z* 287 ist dem $[M+H]^+$ Spektrum vom Kaempferolstandard ähnlich.

UC#6 (38). UPLC/ESI(+)-CID-MS (micrOTOF-Q) of *m/z* 626 $[M]^+$, ISCID = 0 V, CE = 25 eV; *m/z* (rel. int. (%)) = 626.278 (15, $C_{30}H_{44}NO_{13}^+$), 567.207 (16, $C_{27}H_{35}O_{13}^+$), 195.066 (100, $C_{10}H_{11}O_4^+$), 151.040 (2, $C_8H_7O_3^+$).

UC#7 (39). UPLC/ESI(+)-CID-MS (QStar Pulsar i) of *m/z* 284 $[M]^+$, DP1 = 50 V, CE = 25 eV; *m/z* (rel. int. (%)) = 284.183 (10, $C_{15}H_{26}NO_4^+$), 225.110 (100, $C_{12}H_{17}O_4^+$), 207.104 (4, $C_{12}H_{15}O_3^+$), 181.089 (2, $C_{10}H_{13}O_3^+$), 179.109 (5, $C_{11}H_{15}O_2^+$), 163.078 (5, $C_{10}H_{11}O_2^+$), 152.084 (7, $C_9H_{12}O_2^{\bullet+}$), 151.077 (2, $C_9H_{11}O_2^+$), 137.060 (3, $C_8H_9O_2^+$), 135.081 (11, $C_9H_{11}O^+$).

UC#8 (40). UPLC/ESI(+)-CID-MS (QStar Pulsar i) of *m/z* 310 $[M]^+$, DP1 = 50 V, CE = 25 eV; *m/z* (rel. int. (%)) = 310.201 (14, $C_{17}H_{28}NO_4^+$), 251.127 (100, $C_{14}H_{19}O_4^+$), 233.117 (9, $C_{14}H_{17}O_3^+$), 223.126 (5, $C_{13}H_{19}O_3^+$), 207.102 (6,

$C_{12}H_{15}O_3^+$), 205.123 (5, $C_{13}H_{17}O_2^+$), 195.101 (3, $C_{11}H_{15}O_3^+$), 189.093 (11, $C_{11}H_{13}O_2^+$), 177.092 (17, $C_{11}H_{13}O_2^+$), 161.095 (34, $C_{11}H_{13}O^+$), 133.101 (12, $C_{10}H_{13}^+$), 105.072 (4, $C_8H_9^+$), 73.028 (10, $C_3H_5O_2^+$).

UC#9 (41). UPLC/ESI(+)-CID-MS (micrOTOF-Q) of *m/z* 560 $[M]^+$, ISCID = 0 V, CE = 25 eV; *m/z* (rel. int. (%)) = 560.270 (64, $C_{26}H_{42}NO_{12}^+$), 501.196 (100, $C_{23}H_{33}O_{12}^+$), 409.150 (9, $C_{20}H_{25}O_9^+$), 381.154 (14, $C_{19}H_{25}O_8^+$), 325.165 (57, $C_{17}H_{25}O_6^+$), 281.139 (16, $C_{15}H_{21}O_5^+$), 263.128 (26, $C_{15}H_{19}O_4^+$), 253.144 (10, $C_{14}H_{21}O_4^+$), 251.128 (8, , $C_{14}H_{21}O_4^+$), 233.118 (46, $C_{14}H_{17}O_3^+$), 205.123 (14, $C_{13}H_{17}O_2^+$), 189.091 (10, $C_{12}H_{13}O_2^+$), 177.092 (11, $C_{11}H_{13}O_2^+$), 161.097 (20, $C_{11}H_{13}O^+$), 133.102 (5, $C_{10}H_{13}^+$).

UC#10 (42). UPLC/ESI(+)-CID-MS (QStar Pulsar i) of *m/z* 488 $[M]^+$, DP1 = 50 V, CE = 40 eV; *m/z* (rel. int. (%)) = 488.211 (6, $C_{22}H_{34}NO_{11}^+$), 326.160 (34, $C_{16}H_{24}NO_6^+$), 310.170 (4, $C_{16}H_{24}NO_5^+$), 267.082 (65, $C_{13}H_{15}O_6^+$), 251.092 (3, $C_{13}H_{15}O_5^+$), 203.100 (9), 181.049 (100, $C_9H_9O_4^+$).

2-*O*-Feruloylmalat (43). UPLC/ESI(-)-CID-MS (micrOTOF-Q) of *m/z* 309 $[M-H]^-$, ISCID = 0 V, CE = 17 eV; *m/z* (rel. int. (%)) = 309.059 (5, $C_{14}H_{13}O_8^-$), 193.049 (100, $C_{10}H_9O_4^-$), 178.026 (2, $C_9H_6O_4^{\bullet-}$), 149.059 (4, $C_9H_9O_2^-$), 134.036 (18, $C_8H_6O_2^{\bullet-}$), 133.012 (9, $C_4H_5O_5^-$).

Methylsinapat 4-*O*-Hexosid (44). UPLC/ESI(+)-CID-MS (QStar Pulsar i) of *m/z* 423 $[M+Na]^+$, DP1 = 50 V, CE = 25 eV; *m/z* (rel. int. (%)) = 423.124 (100, $C_{18}H_{24}O_{10}Na^+$), 261.071 (15, $C_{12}H_{14}O_5Na^+$), 185.042 (4, $C_6H_{10}O_5Na^+$).

Sinapat 4-*O*-Pentosid (45). UPLC/ESI(+)-CID-MS (QStar Pulsar i) of *m/z* 379 $[M+Na]^+$, DP1 = 50 V, CE = 25 eV; *m/z* (rel. int. (%)) = 379.098 (71, $C_{16}H_{20}O_9Na^+$), 247.056 (100, $C_{11}H_{12}O_5Na^+$), 155.028 (7, $C_5H_8O_4Na^+$). UPLC/ESI(-)-CID-MS (micrOTOF-Q) of *m/z* 355 $[M-H]^-$, ISCID = 0 V, CE = 17 eV; *m/z* (rel. int. (%)) = 355.101 (16, $C_{16}H_{19}O_9^-$), 223.060 (100, $C_{11}H_{11}O_5^-$), 208.036 (18, $C_{10}H_8O_5^{-\bullet}$), 179.070 (42, $C_{10}H_{11}O_3^-$), 164.047 (32, $C_9H_8O_3^{-\bullet}$), 149.022 (4, $C_8H_5O_3^-$).

Sinapat-Cysteinkonjugat (46). UPLC/ESI(+)-CID-MS (QStar Pulsar i) of *m/z* 346 $[M+H]^+$, DP1 = 50 V, CE = 25 eV; *m/z* (rel. int. (%)) = 225.076 (100, $C_{11}H_{13}O_5^+$), 183.067 (50, $C_9H_{11}O_4^+$), 155.070 (5, $C_8H_{11}O_3^+$), 149.059 (2, $C_9H_9O_2^+$), 122.027 (10, $C_3H_8NO_2S^+$).

Sinapat-Gutathionkonjugat (47). UPLC/ESI(+)-CID-MS (QStar Pulsar i) of *m/z* 532 $[M+H]^+$, DP1 = 50 V, CE = 25 eV; *m/z* (rel. int. (%)) = 532.160 (8, $C_{21}H_{30}N_3O_{11}S^+$), 308.091 (100, $C_{10}H_{18}N_3O_6S^+$), 291.061 (2, $C_{10}H_{15}N_2O_6S^+$), 290.078 (1, $C_{10}H_{16}N_3O_5S^+$), 245.061 (1, $C_9H_{13}N_2O_4S^+$), 233.055 (9, $C_8H_{13}N_2O_4S^+$), 225.074 (46, $C_{11}H_{13}O_5^+$), 183.063 (3, $C_9H_{11}O_4^+$), 179.048 (35, $C_5H_{11}N_2O_3S^+$), 162.022 (2, $C_5H_8NO_3S^+$).

***N*-Sinapoyl-*S*-Methylcysteinsulfoxid (48).** UPLC/ESI(+)-CID-MS (QStar Pulsar i) of *m/z* 358 $[M+H]^+$, DP1 = 50 V, CE = 25 eV; *m/z* (rel. int. (%)) = 294.101 (2, $C_{14}H_{16}NO_6^+$), 207.063 (100, $C_{11}H_{11}O_4^+$), 175.037 (17, $C_{10}H_7O_3^+$), 152.035 (1, $C_4H_{10}NO_3S^+$), 147.044 (3, $C_9H_7O_2^+$), 88.037 (1, $C_3H_6NO_2^+$).

UC#11 (49). UPLC/ESI(+)-CID-MS QStar Pulsar i) of *m/z* 427 $[M+Na]^+$, DP1 = 50 V, CE = 25 eV; *m/z* (rel. int. (%)) = 427.193 (100, $C_{19}H_{32}O_9Na^+$), 265.138 (62, $C_{13}H_{22}O_4Na^+$), 247.129 (6, $C_{13}H_{20}O_3Na^+$), 229.117 (3, $C_{13}H_{18}O_2Na^+$), 185.041 (4, $C_6H_{10}O_5Na^+$).

UC#12 (50). UPLC/ESI(+)-CID-MS (micrOTOF-Q) of *m/z* 218 $[M+H]^+$, ISCID = 0 V, CE = 10 eV; *m/z* (rel. int. (%)) = 218.080 (88, $C_{12}H_{12}NO_3^+$), 200.070 (11, $C_{12}H_{10}NO_2^+$), 182.058 (8, $C_{12}H_8NO^+$), 172.074 (100, $C_{11}H_{10}NO^+$), 158.057 (13, $C_{10}H_8NO^+$), 144.079 (34, $C_{10}H_{10}N^+$), 130.063 (5, $C_9H_8N^+$). Das zweite Isomer zeigt ein ähnliches CID-MS Spektrum.

Tabelle A4: Standardmischung (in 30% wässrigem Methanol v/v) als interne Kontrolle der LC/MS-Versuche (m/z; positiver Ionenmodus).

Standard	Quantifiziertes Ion
Kinetin (10 µM)	216.09 $[M+H]^+$
Rutin (10 µM)	303.05 $[M+H-C12H20O9]^+$
anisinic acid (10 µM)	135.04 $[M+H-H2O]^+$
phlorizine (10 µM)	459.12 $[M+Na]^+$
N-(3-indolylacetyl-L-valine (10 µM)	297.12 $[M+Na]^+$
3-indolyl acetonitrile (20 µM)	130.07 $[M+H-HCN]^+$
Biochanin A (5 µM)	285.08 $[M+H]^+$

Danksagung

Für die Überlassung dieses interessanten Themas, die stets freundliche und hilfreiche Betreuung und die zahlreichen Anregungen bedanke ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dieter Strack.

Ein großes Dankeschön geht an Herrn Dr. Carsten Milkowski und Herrn Dr. Alfred Baumert, die in den unterschiedlichen Phasen durch ihre Betreuung entscheidend zum Gelingen beigetragen und wichtige Voraussetzungen für diese Arbeit geschaffen haben.

Herrn Dr. Christoph Böttcher, Frau Dr. Edda von Roepenack-Lahaye und Domenika Thieme danke ich für die fruchtbare Zusammenarbeit, die gemeinschaftliche Durchführung des *Metabolite Profilings* der Sekundärmetabolite und für die vielen anregenden Diskussionen.

Frau Dr. Bettina Hause danke ich für die Unterstützung bei den mikroskopischen Arbeiten.

Bei Herrn Dr. Frank Syrowotka und Herrn Dr. Gerd Hause möchte ich mich für die Unterstützung bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Samen bedanken.

Herrn Dr. Andreas Albert danke ich für die Zusammenarbeit und Hilfe bei der Durchführung der UV-Experimente.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. Wolfgang Friedt und Herrn Benjamin Wittkop möchte ich mich für die Hilfestellung bei der Durchführung der NIRS-Analysen bedanken.

Herrn Dr. Joachim Kopka und Herrn Alexander Erban danke ich für die Durchführung des *metabolite profilings* der Primärmetabolite und die Hilfestellung bei der Datenauswertung und -diskussion.

Bei Frau Prof. Dr. Ruth Welti, Frau Mary R. Roth, Frau Pamela Tamura und Herrn Danny Vu bedanke ich mich herzlich für die Durchführung des Lipidanalysen im Kansas Lipidomics Research Center, der Hilfestellung bei der Datenauswertung und -diskussion und für die herzliche Atmosphäre, mit der Ihr mich aufgenommen habt. Thank you!

Ich danke der Arbeitsgruppe Sekundärstoffwechsel für die freundliche, hilfsbereite und angenehme Atmosphäre, die dazu beigetragen hat, dass ich mich hier sehr wohl gefühlt habe.

Danke an Karina Wolfram, Anja Henning und Dr. Andre Frolov für die Hilfe bei der Durchführung HPLC-basierter Versuche.

Besonderer Dank gilt Dr. Felix Stehle, Claudia Horn, Sylvia Vetter, Dr. Diana Weier, Dr. Heike Paetzold, Dr. Dirk Meißner, Dr. Christoph Böttcher, Dr. Juliane Mittasch, Christin

Fellenberg und Sandra Lischewski für die ständige Diskussionsbereitschaft wissenschaftlicher und privater Themen. Danke, dass Ihr immer ein offenes Ohr für mich hattet und habt und ich mich immer auf Euch verlassen konnte. Danke für Eure tatkräftige Unterstützung!

Ich danke allen Mitgliedern des Leibniz-Instituts für Pflanzenbiochemie für das schöne Arbeitsumfeld und die hilfreiche Unterstützung, beispielsweise bei der Pflanzenanzucht (Herr Philipp Plato und Frau Petra Jansen), der Erstellung von Präsentationen, Postern und Abbildungen (Frau Christine Kaufmann), bei verschiedenen Fotoarbeiten (Frau Annett Kohlberg), der Literatursuche (Frau Andrea Piskol) und Hilfe bei diversen IT-Problemchen (Herr Holger Bartz).

Lieben Dank an Kay Schaubach für die ständige Unterstützung und Motivation in der Endphase meiner Promotion, sowie für die Hilfe bei der Erstellung dieser Arbeit. Danke, dass Du an mich glaubst!

Carsten, Felix, Christoph und Prof. Strack danke ich für die Korrekturarbeiten mit denen Sie dieser Arbeit den finalen Schliff verpasst haben.

Ein besonders herzliches Dankeschön richte ich an meine Familie, besonders an meine Eltern, Christina und Hans-Joachim Clauß, die immer an mich glauben, mich unterstützen und mir Kraft gegeben haben.

Ich möchte mich des Weiteren bei allen bedanken, die mich auf meinem Weg begleiteten, zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und hier nicht namentlich erwähnt sind!

Für die Finanzierung der Arbeit danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Leibniz-Institut für Pflanzenbiochmie Halle.

DANKE SCHÖN!

Veröffentlichungen und Tagungsbeitrage

Veröffentlichungen

2011 - Clauss, K., von Roepenack-Lahaye, E., Böttcher, C., Roth, M. R., Welti, R., Erban, A., Kopka, J., Scheel, D., Milkowski, C., Strack, D. Overexpression of sinapine esterase BnSCE3 in *Brassica napus* triggers global changes in seed metabolism. (Published on January 19, *Plant Physiol*, 2011; 10.1104/pp.110.169821)

2008 - Ay, N., Clauss, K., Barth, O., Humbeck, K. Identification and characterization of novel senescence-associated genes from barley (*Hordeum vulgare*) primary leaves. *Plant Biol (Stuttg)* 10 Suppl 1: 121-135

2008 - Clauss, K., Baumert, A., Nimtz, M., Milkowski, C., Strack, D. Role of a GDSL lipase-like protein as sinapine esterase in *Brassicaceae*. *Plant J* 53**:** 802-813

Tagungsbeiträge

29.8. - 2.9.2010: **5. EPSO Konferenz "Plants for life"** (Kittilä, Finnland), Poster: "Metabolic Engineering of Oilseed Rape", Clauss, K., Baumert, A., von Roepenack-Lahaye, E., Böttcher, C., Milkowski, C., Strack, D.

25.3. - 26.3.2010: **Tagung des Leibniz-Instituts für Pflanzenbiochemie** (Wittenberg, Deutschland), Vortrag: „Sinapine esterase from *Brassica napus*", Clauss, K., von Roepenack-Lahaye, E., Böttcher, C., Milkowski, C., Strack, D.

6.9. - 11.9.2009: **Tagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft** (Leipzig, Deutschland), Poster: „Implications of sinapine esterase overexpression in seeds of Arabidopsis and oilseed rape", Clauss, K., Baumert, A., von Roepenack-Lahaye, E., Böttcher, C., Milkowski, C., Strack, D.

18.9. - 19.9.2008: **6. Kurt-Mothes-Doktorandenworkshop** (Jena, Deutschland), Vortrag: "Identification of sinapine esterase enables reduction of sinapine in Arabidopsis and oil-seed rape", Clauss, K., Baumert, A., Milkowski, C., Strack, D.

22. - 26.6.2008: **4. EPSO Konferenz "Plants for life"** (Toulon, Frankreich), Poster: „Role of a GDSL lipase-like protein as sinapine esterase in Brassicaceae", Clauss, K., Baumert, A., Milkowski, C., Strack, D.

2.9. - 6.9.2007: **Tagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft** (Hamburg, Deutschland), Poster: "Hydrolysis of Sinapine is catalyzed by a GDSL-Lipase like Enzyme", Clauss, K., Baumert, A., Milkowski, C., Strack, D.

6.6. - 8.6.2007: **PSSC - Plant Science Student Conference** (Halle/Saale, Deutschland), Poster: "The Sinapine Esterase from *Brassica napus* is a Lipase-like Enzyme", Clauss, K., Baumert, A., Milkowski, C., Strack, D.

29.5. - 2.6.2006: **2. IPK Studenten Konferenz** (Gatersleben, Deutschland), Vortrag: "The Sinapine Esterase (SCE) - the Missing Link of Sinapine Metabolism", Clauss, K., Baumert, A., Milkowski, C., Strack, D.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name Kathleen Clauß

Anschrift Ernst-Moritz-Arndt-Straße 3, 06114 Halle (Saale)

Geburtsdatum 21. August 1978

Geburtsort Eisenhüttenstadt

Wissenschaftlicher Werdegang

02.2005 - 09.2010 Promotion in der Pflanzenbiochmie
Leibniz-Institut für Pflanzenbiochmie, Halle (Saale).
Identifizierung und Charakterisierung der Sinapinesterase aus *B. napus*

11.2004 - 12.2004 Projektmitarbeit
Biozentrum der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
Mikroskopische Analysen: „Zellbiologie pflanzlicher Systeme“

09.2004 - 10.2004 Projektmitarbeit
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
SFB: Epigenetische Kontrolle von Seneszenzmechanismen in *A. thaliana*

08.2004 Diplomarbeit in der Pflanzenphysiologie
Institut für Pflanzen- und Zellphysiologie, Halle (Saale).
Expressions- und Lokalisationsstudien des seneszenzassoziierten ADP-Ribosylierungsfaktors 1 aus *H. vulgare*

10.1998 - 08.2004 Studium Diplom-Biologie
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
Vertiefung: Pflanzenphysiologie, Genetik, Biochemie, Immunologie

08.1995 - 06.1998 Allgemeine Hochschulreife
„Albert-Schweitzer“-Gymnasium, Eisenhüttenstadt

Praxis und Projekte

09.2000 - 11.2003 Studentische Hilfskraft
Intersport Sportpoint Handels GmbH, Halle (Saale)

06.1997 Praktikum
Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Halle (Saale)

Eidesstattliche Erklärung

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

Diese Arbeit wurde in keiner anderen Einrichtung zur Begutachtung eingereicht.

Halle (Saale), den 23.2.2012

(Kathleen Clauß)