

Metabolitenanalyse von transgenen *Brassica napus* Linien mit erniedrigtem Sinapinsäureester-Gehalt

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 Karina Hettwer, geb. Wolfram

geb. am 24.11.1981 in Bad Salzungen

Gutachter:

1. Prof. Dr. D. Strack
2. Prof. Dr. W. Sippl
3. PD Dr. J. Kopka

verteidigt am 29.06.2012 in Halle (Saale)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abbildungsverzeichnis	vi
Tabellenverzeichnis	ix
Abkürzungsverzeichnis	xiii
1 Einleitung.....	1
1.1 Der Phenylpropan-Metabolismus in Brassicaceen.....	1
1.2 Akkumulation der Sinapinsäureester und Enzymaktivitäten.....	3
1.3 Raps als Kulturpflanze	6
1.4 Absenkung der Sinapinsäureester in <i>B. napus</i>	7
1.5 Die Analyse des pflanzlichen Metaboloms	9
1.5.1 Massenspektrometrie-basierte Methoden.....	12
1.5.1.1 Flüssig-Chromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie.....	12
1.5.1.2 Gas-Chromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie	14
1.6 Zielstellung der Arbeit	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Material	17
2.1.1 Pflanzen.....	17
2.1.2 Chemikalien	17
2.1.3 Geräte.....	18
2.2 Kultivierung	19
2.3 Extraktionsmethoden für pflanzliche Metabolite	20
2.3.1 Extraktion von Sekundärmetaboliten	20
2.3.1.1 Extraktionsmethoden für HPLC- und UPLC-basierte Analysen.....	20
2.3.1.2 Extraktionsmethoden für MS-basierte Analysen	21
2.3.2 Isolierung von Zellwand-gebundenen Phenolen	22
2.3.3 Extraktion von Primärmetaboliten	23
2.3.3.1 Extraktionsmethode für die ungerichtete Analyse	23
2.3.3.2 Extraktionsmethode für die zielgerichtete Analyse	24

2.4	Chromatographie	25
2.4.1	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC).....	25
2.4.1.1	Methodik für die Analyse von Sinapinsäureestern und Flavonoiden	25
2.4.2	Ultrahochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (RP-UPLC)	26
2.4.2.1	Methodik für die Quantifizierung von Sinapinsäureestern	26
2.5	Massenspektrometrie.....	27
2.5.1	Methodik für die ungerichtete Analyse von Sekundärmetaboliten mittels RP-UPLC-ESI-QqTOF-MS	27
2.5.2	Methodik für die zielgerichtete Analyse von Sekundärmetaboliten mittels RP-UPLC-ESI-QqLIT-MS/MS.....	28
2.5.3	Methodik für die zielgerichtete Analyse von Zellwand-gebundenen Phenolen sowie HCA- und HBA-Äquivalenten mittels RP-UPLC-ESI- QqLIT-MS/MS.....	30
2.5.4	Methodik für die ungerichtete Analyse von Primärmetaboliten mittels GC- EI-MS.....	31
2.5.5	Methodik für die zielgerichtete Analyse von Primärmetaboliten mittels GC-EI-MS	32
2.6	UVB-Stress-Applikation.....	33
2.7	Cholinquantifizierung.....	33
2.8	NIRS-Analysen	34
2.9	Chemometrische Analyse	34
2.9.1	Statistische Analysen für <i>UGT84A9i</i> -Pflanzenmaterial	34
2.9.2	Statistische Analyse für <i>UGT84A9i/BnSCTi</i> -Pflanzenmaterial.....	36
2.9.3	Statistische Analyse für <i>UGT84A9i/BnSCE3OE</i> -Pflanzenmaterial	36
3	Ergebnisse.....	38
3.1	Veränderungen des Metabolitenprofils durch samenspezifische Suppression von <i>UGT84A9</i>	38
3.1.1	Veränderungen während der Samenentwicklung	39
3.1.1.1	Konzentrationsänderung von Sinapoylmalat, Sinapoylglucose und Sinapin während der Samenentwicklung	39

3.1.1.2	Sinapin- und Gesamt-Sinapinsäureester-Gehalt in reifen Samen...	40
3.1.1.3	Analyse von Sekundärmetaboliten während der Samenentwicklung	41
3.1.1.4	Analyse von Primärmetaboliten während der Samenentwicklung...	48
3.1.1.5	Konzentrationsänderung von Cholin in reifen Rapssamen	49
3.1.1.6	Analyse von Zellwand-gebundenen Phenolen von reifen Rapssamen	50
3.1.1.7	Analyse von Hydroxyzimtsäure- und Hydroxybenzoesäure- Äquivalenten von reifen Rapssamen.....	51
3.1.1.8	Analyse wichtiger agronomischer Merkmale von reifen Rapssamen	52
3.1.2	Veränderungen während der Keimlingsentwicklung	54
3.1.2.1	Konzentrationsänderung von Sinapoylmalat, Sinapoylglucose und Sinapin während der Keimlingsentwicklung	54
3.1.2.2	Analyse von Sekundärmetaboliten	55
3.1.3	Auswirkungen des veränderten Metabolitenprofils auf die UVB- Stressantwort von Keimpflanzen	58
3.2	Veränderungen des Metabolitenprofils durch samenspezifische Co- Suppression von <i>UGT84A9</i> und <i>BnSCT</i>	65
3.2.1	Veränderungen während der Samenentwicklung	65
3.2.1.1	Konzentrationsänderung von Sinapoylmalat, Sinapoylglucose und Sinapin während der Samenentwicklung	65
3.2.1.2	Sinapin und Gesamt-Sinapinsäureester-Gehalt in reifen Samen	66
3.2.1.3	Analyse von Sekundärmetaboliten während der Samenentwicklung	67
3.2.1.4	Analyse von Primärmetaboliten während der Samenentwicklung...	70
3.2.1.5	Konzentrationsänderung von Cholin in reifen Rapssamen	71
3.2.1.6	Analyse von Zellwand-gebundenen Phenolen von reifen Rapssamen	71
3.2.1.7	Analyse von Hydroxyzimtsäure- und Hydroxybenzoesäure- Äquivalenten von reifen Rapssamen.....	72

3.2.1.8	Analyse wichtiger agronomischer Merkmale von reifen Rapssamen ..	73
3.2.2	Veränderungen während der Keimlingsentwicklung	74
3.2.2.1	Konzentrationsänderung von Sinapoylmalat, Sinapoylglucose und Sinapin während der Keimlingsentwicklung	74
3.3	Veränderungen des Metabolitenprofils durch kombinierte samenspezifische Suppression von <i>UGT84A9</i> und Überexpression von <i>BnSCE3</i>	75
3.3.1	Veränderungen in reifen Samen	75
3.3.1.1	Sinapin- und Gesamt-Sinapinsäureester-Gehalt.....	75
3.3.1.2	Analyse von Sekundärmetaboliten.....	76
3.3.1.3	Analyse von Zellwand-gebundenen Phenolen	81
3.3.1.4	Analyse von Hydroxyzimtsäure- und Hydroxybenzoesäure-Äquivalenten	82
3.3.1.5	Analyse von Primärmetaboliten.....	83
3.3.2	Veränderungen während der Keimlingsentwicklung	85
3.3.2.1	Konzentrationsänderung von Sinapoylmalat, Sinapoylglucose und Sinapin während der Keimlingsentwicklung	85
4	Diskussion	87
4.1	Absenkung von Sinapin und weiteren Sinapinsäureestern in reifen Niedrig-Sinapin-Rapssamen	87
4.2	Metabolische Veränderungen in reifen Niedrig-Sinapin-Rapssamen	90
4.2.1	Veränderungen von Sekundärmetaboliten	90
4.2.2	Veränderung von Hydroxyzimtsäure- und Hydroxybenzoesäure-Äquivalenten	94
4.2.3	Veränderung von Zellwand-gebundenen Phenolen.....	95
4.2.4	Veränderung des Cholingehaltes.....	96
4.2.5	Veränderung von Primärmetaboliten	97
4.3	Samenspezifische Suppression der Sinapinsäureester	100
4.4	Einfluss der UVB-Exposition auf die Keimlingsentwicklung von <i>UGT84A9</i>	104

5	Weiterführende Arbeiten	107
6	Zusammenfassung	108
	Literaturverzeichnis	I
	Anhang	XIV
A.	Quantifizierung von Sinapin und Gesamt-Sinapinsäureestern	XIV
B.	Analyse von Zellwand-gebundenen Phenolen	XVI
C.	Analyse von HCA- und HBA-Äquivalenten	XVII
D.	Cholinquantifizierung	XVIII
E.	Quantifizierung von Glucose, Fructose und Saccharose	XVIII
	a. Ergebnisse für <i>UGT84A9i</i>	XVIII
	b. Ergebnisse für <i>UGT84A9i/BnSCTi</i>	XIX
F.	Analyse von Sekundärmetaboliten für <i>UGT84A9i</i>-Pflanzen	XX
G.	Veränderungen in reifen Rapssamen	XXVII
	a. Grafische Übersicht für <i>UGT84A9i</i>	XXVII
	b. Grafische Übersicht für <i>UGT84A9i/BnSCTi</i>	XXVIII
	c. Grafische Übersicht für <i>UGT84A9i/BnSCE3OE</i>	XXIX
H.	Annotierte Metabolite	XXX
	a. Sekundärmetabolite	XXX
	b. Zellwand-gebundene Phenole sowie HCA- und HBA-Äquivalente	L
	c. Primärmetabolite	LI
I.	Anzahl analysierter Pflanzen und Messwiederholungen	LIII
	Danksagung	LVI
	Publikationen und Tagungsbeiträge	LVII
	Lebenslauf	LIX
	Eidesstattliche Versicherung	LX

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1. Phenylpropan-Metabolismus in Arabidopsis und Raps (modifiziert nach Milkowski und Strack 2010).....	2
Abbildung 1-2. Samenentwicklung bei Raps (<i>B. napus</i>).....	4
Abbildung 1-3. Metabolitakkumulation und Enzym-Aktivitäten in Samen und Keimlingen (Keimblätter) von Raps (<i>B. napus</i>) (Milkowski et al. 2004; modifiziert).....	5
Abbildung 1-4. Transkript-Abundanzen der Gene <i>BnSGT1</i> (<i>UGT84A9</i>) und <i>BnSCT</i> in Samen und Keimlingen von <i>B. napus</i> (Milkowski et al. 2004; modifiziert).....	5
Abbildung 3-1: Samenentwicklungsstadien A (2 WAF), B (3 WAF), C (5 WAF) und D (7 WAF).....	39
Abbildung 3-2. Konzentration von Sinapoylmalat, Sinapoylglucose und Sinapin während der Samenentwicklung für Wildtyp und <i>UGT84A9i</i>	40
Abbildung 3-3: Konzentration von Sinapin, restlichen Sinapinsäureestern (restl. SE) und Gesamt-Sinapinsäureestern (Gesamt-SE) für reife Wildtyp- und <i>UGT84A9i</i> -Samen.....	41
Abbildung 3-4: Hierarchische Clusteranalyse der quantifizierten Metabolite von Wildtyp- und <i>UGT84A9i</i> -Samen der Entwicklungsstadien A - D.	46
Abbildung 3-5: Konzentration von Sinapin und freiem Cholin für reife Wildtyp- und <i>UGT84A9i</i> -Samen.....	50
Abbildung 3-6: Konzentration von Sinapoylmalat, Sinapoylglucose und Sinapin während der Keimlingsentwicklung in Wildtyp und <i>UGT84A9i</i>	54
Abbildung 3-7: Hierarchische Clusteranalyse der quantifizierten Metabolite von Wildtyp- und <i>UGT84A9i</i> -Samen bzw. Keimlingen (Keimblättern; 2, 4, 7, 10, 14 DAS).....	56
Abbildung 3-8: Acht (links) und elf (rechts) Tage alte Wildtyp- und <i>UGT84A9i</i> -Keimlinge des UVB-Expositionsexperimentes..	59
Abbildung 3-9: 16 Tage alte Wildtyp- und <i>UGT84A9i</i> -Keimlinge des UVB-Expositionsexperimentes..	59
Abbildung 3-10: Akkumulation von Sinapoylmalat, Sinapoylglucose und Sinapin in reifen Samen bzw. 4, 8, 11 und 16 Tage alten Keimblättern von <i>UGT84A9i</i> - und Wildtyp-Pflanzen ohne erhöhte UVB-Exposition.	60

Abbildung 3-11: Akkumulation von Sinapoylmalat, Sinapoylglucose und Sinapin in reifen Samen bzw. 4, 8, 11 und 16 Tage alten Keimblättern für UVB-exponierte Wildtyp- und <i>UGT84A9i</i> -Pflanzen.	60
Abbildung 3-12: HPLC-Elutionsprofile methanolischer Extrakte von vier und acht Tage alten Wildtyp- und <i>UGT84A9i</i> -Keimblättern.	62
Abbildung 3-13: HPLC-Elutionsprofil methanolischer Extrakte von elf und 16 Tage alten Wildtyp- und <i>UGT84A9i</i> -Keimblättern.....	63
Abbildung 3-14: Relative Quantifizierung von Kämpferol- und Quercetin-Derivaten während der Keimlingsentwicklung für Wildtyp und <i>UGT84A9i</i>	64
Abbildung 3-15. Konzentration von Sinapoylmalat, Sinapoylglucose und Sinapin während der Samenentwicklung (Stadium A, B, C, D) für Wildtyp und <i>UGT84A9i/BnSCTi</i>	66
Abbildung 3-16: Konzentration von Sinapin, restlichen Sinapinsäureestern (restl. SE) und Gesamt-Sinapinsäureestern (Gesamt-SE) für reife Wildtyp- und <i>UGT84A9i/BnSCTi</i> -Samen.....	66
Abbildung 3-17: Konzentration von Sinapin und freiem Cholin für reifen Wildtyp- und <i>UGT84A9i/BnSCTi</i> -Samen.....	71
Abbildung 3-18: Konzentration von Sinapoylmalat, Sinapoylglucose und Sinapin während der Keimlingsentwicklung in Wildtyp und <i>UGT84A9i/BnSCTi</i>	74
Abbildung 3-19: Konzentration von Sinapin, restlichen Sinapinsäureestern (restl. SE) und Gesamt-Sinapinsäureestern (Gesamt SE) für reife Samen der Linien Wildtyp Drakkar, Wildtyp Lisora, <i>UGT84A9i</i> , <i>BnSCE3OE</i> und <i>UGT84A9i/BnSCE3OE</i> . .	76
Abbildung 3-20: Akkumulation von Sinapoylmalat, Sinapoylglucose und Sinapin in reifen Samen bzw. 4, 8, 12, 16 und 20 Tage alten Keimblättern der Linien <i>UGT84A9i/BnSCE3OE</i> , <i>BnSCE3OE</i> , <i>UGT84A9i</i> , Wildtyp Lisora und Wildtyp Drakkar.....	86
Abbildung 6-1: Konzentration von Glucose und Fructose in <i>UGT84A9i</i> - und Wildtyp-Samen der Entwicklungsstadien A, B, C und D.	XVIII
Abbildung 6-2: Konzentration von Saccharose in <i>UGT84A9i</i> - und Wildtyp-Samen der Entwicklungsstadien A, B, C und D.....	XVIII
Abbildung 6-3: Konzentration von Glucose und Fructose in <i>UGT84A9i/BnSCTi</i> - und Wildtyp-Samen der Entwicklungsstadien A, B, C und D.....	XIX

Abbildung 6-4: Konzentration von Saccharose in <i>UGT84A9i/BnSCTi</i> - und Wildtyp-Samen der Entwicklungsstadien A, B, C und D.	XIX
Abbildung 6-5: Metabolische Veränderungen in reifen <i>UGT84A9i</i> -Samen.....	XXVII
Abbildung 6-6: Metabolische Veränderungen in reifen <i>UGT84A9i/BnSCTi</i> -Samen..	XXVIII
Abbildung 6-7: Metabolische Veränderungen in reifen <i>UGT84A9i/BnSCE3OE</i> - Samen.....	XXIX
Abbildung 6-8. Strukturen der analysierten Sekundärmetabolite Teil 1.....	XLIV
Abbildung 6-9. Strukturen der analysierten Sekundärmetabolite Teil 2.....	XLV
Abbildung 6-10. Strukturen der analysierten Sekundärmetabolite Teil 3.....	XLVI
Abbildung 6-11. Strukturen der analysierten Sekundärmetabolite Teil 4.....	XLVII

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Gradient für die RP-HPLC-Trennung von Phenylpropanderivaten für die Analyse von Sinapinsäureestern und Flavonoiden.	25
Tabelle 2-2: Gradient für die RP-UPLC-Trennung von Phenylpropanderivaten für die Quantifizierung von Sinapinsäureestern.....	26
Tabelle 2-3: Gradient für die RP-UPLC-Trennung von Phenylpropanderivaten für die ungerichtete Analyse von Sekundärmetaboliten.	27
Tabelle 2-4: Gradient für die RP-UPLC-Trennung von Phenylpropanderivaten für die zielgerichtete Analyse von Sekundärmetaboliten.....	28
Tabelle 2-5: Gradient der chromatographischen Trennung von Zellwand-gebundenen Phenolen.	30
Tabelle 2-6: Temperaturgradient für GC-MS Analyse von Primärmetaboliten.	31
Tabelle 3-1: Anzahl differenzieller Metabolite in den Samenentwicklungsstadien A – D für den Vergleich Wildtyp – <i>UGT84A9i</i>	42
Tabelle 3-2: Metabolite mit verändertem Gehalt in Samen von <i>UGT84A9i</i> für die Samenentwicklungsstadien C und D.....	44
Tabelle 3-3: Ergebnis der Analyse von Primärmetaboliten in Stadium C und D in <i>UGT84A9i</i> -Samen im Vergleich zum Wildtyp.....	49
Tabelle 3-4: Ergebnisse der Analyse von Zellwand-gebundenen Phenolen in reifen <i>UGT84A9i</i> - und Wildtyp-Samen.	51
Tabelle 3-5: Ergebnisse der Analyse von HCAs, HBAs und abgeleiteten Alkoholen und Aldehyden in verseiften methanolischen Extrakten von reifen Wildtyp- und <i>UGT84A9i</i> -Samen.....	52
Tabelle 3-6: Ergebnisse der NIRS Analysen wichtiger agronomischer Merkmale für Wildtyp und <i>UGT84A9i</i> -Rapssamen.	53
Tabelle 3-7: Anzahl differenzieller Metabolite während der Keimlingsentwicklung von <i>UGT84A9i</i> im Vergleich zum Wildtyp.	55
Tabelle 3-8: Anzahl differenzieller Metabolite in den Samenentwicklungsstadien A – D für den Vergleich Wildtyp – <i>UGT84A9i/BnSCTi</i>	67
Tabelle 3-9: Metabolite mit verändertem Gehalt in Samen von <i>UGT84A9i/BnSCTi</i> für die Samenentwicklungsstadien C und D.....	68

Tabelle 3-10: Ergebnis der Analyse von Primärmetaboliten der Entwicklungsstadien C und D für den Vergleich <i>UGT84A9i/BnSCTi</i> – Wildtyp.	70
Tabelle 3-11: Ergebnisse der Analyse von Zellwand-gebundenen Phenolen in reifen <i>UGT84A9i/BnSCTi</i> - und Wildtyp-Samen.....	71
Tabelle 3-12: Ergebnisse der Analyse von HCAs, HBAs und abgeleiteten Alkoholen und Aldehyden in verseiften methanolischen Extrakten von reifen Wildtyp- und <i>UGT84A9i/BnSCTi</i> -Samen.....	72
Tabelle 3-13: Ergebnisse der NIRS Analysen wichtiger agronomischer Merkmale für Wildtyp und <i>UGT84A9i/BnSCTi</i>	73
Tabelle 3-14: Statistisch signifikant veränderte Metabolite in reifen Samen der Linien <i>BnSCE3OE</i> , <i>UGT84A9i</i> sowie <i>UGT84A9i/BnSCE3OE</i> im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp.....	77
Tabelle 3-15: Statistisch signifikant veränderte Metabolite in reifen Samen der Linien <i>UGT84A9i</i> sowie <i>UGT84A9i/BnSCE3OE</i> im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp.	79
Tabelle 3-16: Statistisch signifikant veränderte Metabolite in reifen Samen der Linien <i>BnSCE3OE</i> sowie <i>UGT84A9i/BnSCE3OE</i> im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp..	80
Tabelle 3-17: Statistisch signifikant veränderte Metabolite in reifen Samen der Linien <i>BnSCE3OE</i> sowie <i>UGT84A9i</i> im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp.....	80
Tabelle 3-18: Ergebnisse der Analyse von Zellwand-gebundenen Phenolen in reifen Samen der Linien <i>BnSCE3OE</i> , <i>UGT84A9i</i> sowie <i>UGT84A9i/BnSCE3OE</i> im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp.	81
Tabelle 3-19: Ergebnisse der Analyse von HCAs, HBAs und zugehörigen Alkoholen und Aldehyden in verseiften methanolischen Extrakten von reifen Samen der Linien <i>BnSCE3OE</i> , <i>UGT84A9i</i> sowie <i>UGT84A9i/BnSCE3OE</i> im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp.....	83
Tabelle 3-20: Ergebnis der Analyse von Primärmetaboliten für reife Samen der Linien <i>BnSCE3OE</i> , <i>UGT84A9i</i> sowie <i>UGT84A9i/BnSCE3OE</i> im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp.....	84
Tabelle 4-1 Verbleibender Gehalt (%) von Sinapin, restl. Sinapinsäureestern (SE) und Gesamt-Sinapinsäureestern (Gesamt-SE) für reife Samen der Linien <i>UGT84A9i/BnSCTi</i> , <i>UGT84A9i</i> , <i>BnSCE3OE</i> und <i>UGT84A9i/BnSCE3OE</i> im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp.	87

Tabelle 4-2 Metabolite mit erniedrigtem Gehalt in reifen Samen der Linien <i>UGT84A9i/BnSCTi</i> , <i>UGT84A9i</i> , <i>BnSCE3OE</i> und <i>UGT84A9i/BnSCE3OE</i> im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp.	92
Tabelle 4-3 Metabolite mit erhöhtem Gehalt in reifen Samen der Linien <i>UGT84A9i/BnSCTi</i> , <i>UGT84A9i</i> , <i>BnSCE3OE</i> und <i>UGT84A9i/BnSCE3OE</i> im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp.	94
Tabelle 6-1: Ergebnisse der Quantifizierung von Sinapin und Gesamt-Sinapinsäureestern (Gesamt-SE) für reife Wildtyp- und <i>UGT84A9i</i> -Samen. ...	XIV
Tabelle 6-2: Ergebnisse der Quantifizierung von Sinapin und Gesamt-Sinapinsäureestern für reife Wildtyp und <i>UGT84A9i/BnSCTi</i> -Samen.....	XIV
Tabelle 6-3: Ergebnisse der Quantifizierung von Sinapin und Gesamt-Sinapinsäureestern für reife Samen der Linien <i>UGT84A9i</i> , <i>BnSCE3OE</i> , <i>UGT84A9i/BnSCE3OE</i> sowie den Wildtyp (Drakkar, Lisora)	XV
Tabelle 6-4: Ergebnisse der Analyse von Zellwand-gebundenen Phenolen in reifen <i>UGT84A9i</i> - und Wildtyp-Samen.....	XVI
Tabelle 6-5: Ergebnisse der Analyse von Zellwand-gebundenen Phenolen in reifen <i>UGT84A9i/BnSCTi</i> - und Wildtyp-Samen.....	XVI
Tabelle 6-6: Ergebnisse der Analyse von Hydroxymitsäure- und Hydroxybenzoesäure-Äquivalenten in Wildtyp- und <i>UGT84A9i</i> -Samen.....	XVII
Tabelle 6-7: Ergebnisse der Analyse von Hydroxymitsäure- und Hydroxybenzoesäure-Äquivalenten in Wildtyp- und <i>UGT84A9i/BnSCTi</i> -Samen.. ..	XVII
Tabelle 6-8: Cholinquantifizierung für reife Wildtyp- und <i>UGT84A9i</i> -Samen.....	XVIII
Tabelle 6-9: Cholinquantifizierung für reife Wildtyp- und <i>UGT84A9i/BnSCTi</i> -Samen.	XVIII
Tabelle 6-10: Ergebnisse der Analyse von Sekundärmetabolite für <i>UGT84A9i</i> -Samen im Vergleich zum Wildtyp für die Samenentwicklungsstadien A, B, C und D. ...	XX
Tabelle 6-11: Ergebnisse der Analyse von Sekundärmetabolite für <i>UGT84A9i</i> -Samen bzw. 2, 4, 7, 10 und 14 Tage alte Keimblätter im Vergleich zum Wildtyp.	XXIV
Tabelle 6-12. Zusammenstellung der mittels LC-ESI-QqTOF-MS detektierten und annotierten Sekundärmetaboliten in der ungerichteten Metabolitenanalyse von Rapssamen (<i>B. napus</i>) während der Entwicklung.....	XXX

Tabelle 6-13. Zusammenstellung der Sekundärmetabolite, die in die zielgerichtete Analyse integriert wurden.....	XLVIII
Tabelle 6-14: Zusammenstellung der analysierten Metabolite hinsichtlich Zellwandgebundener Phenole sowie HCA- und HBA-Äquivalenten.....	L
Tabelle 6-15: Zusammenstellung der detektierten Primärmetabolite in der ungerichteten Metabolitenanalyse mittels GC-EI-MS während der Samenentwicklung von <i>B. napus</i> für die Linien <i>UGT84A9i</i> und <i>UGT84A9i/BnSCTi</i> sowie des entsprechenden Wildtyps.....	LI
Tabelle 6-16: Übersicht zur Anzahl analysierter Pflanzen und Messwiederholungen für jeden analysierten Metabolit der beiden Kultivierungen (K1 und K2) für die zwei untersuchten <i>UGT84A9i</i> Rapslinien und den Wildtyp.....	LIII

Abkürzungsverzeichnis

ADF	Säure-Detergenz-Faser (Acid Detergent Fibre)
ADL	Säure-Detergenz-Lignin (Acid Detergent Lignin)
APCI	Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (Atmospheric Pressure Chemical Ionization)
APPI	Photoionisation bei Atmosphärendruck (Atmospheric Pressure Photoionization)
bidest.	bidestilliert
Bn	<i>Brassica napus</i>
BnSCE	<i>Brassica napus</i> Sinapin-Esterase
<i>BnSCE3OE</i>	Rapspflanzen, die <i>BnSCE3</i> überexprimieren
BnSCT	<i>Brassica napus</i> 1-O-Sinapoyl- β -D-glucose:Cholin-O-Sinapoyltransferase
BnSGT1	<i>Brassica napus</i> UDP-Glucose:Sinapat-Glucosyltransferase
UGT84A9	
<i>brt</i>	<i>bright trichomes</i>
C18:1	Ölsäure
C18:3	Linolensäure
C22:1	Erucasäure
C3H	Cumaroylshikimat/chinat-3-Hydroxylase
C4H	Cinnamat-4-Hydroxylase
CAD	Cinnamoylalkohol-Dehydrogenase
CCoAOMT	Kaffeoyl-CoA-O-Methyltransferase
CCR	Cinnamoyl-CoA Reduktase
CE	Kapillarelektrophorese (Capillary Electrophoresis)
CE (eV)	Kollisionsenergie (Collision Energy)
CI	Chemische Ionisierung (Chemical Ionisation)
CID	stoßinduzierte Dissoziation (Collision Induced Dissociation)
COMT	5-Hydroxykoniferylaldehyd-O-Methyltransferase
cv.	Kultivar
CZE	Kapillarzonenelektrophorese
d	Tag
Da	Dalton
DAS	Tage nach Aussaat (Days After Sowing)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic Acid)
dest.	destilliert
dsRNAi	Doppelstrang-Ribonukleinsäure-Interferenz
EI	Elektronenstoß-Ionisierung (Electron Impact)
EMS	"Enhanced" MS
EPI	"Enhanced" Produktionenscan
ESI	Elektrospray-Ionisierung (Electrospray Ionization)
eV	Eletronenvolt
F5H	Ferulat-5-Hydroxylase
<i>fah</i>	<i>ferulate hydroxylase</i>

FC	Feruloylcholin
FT-ICR	Fourier-Transform-Ionen-Zyklotron-Resonanz (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance)
FW	Frischgewicht
G	Guaiacyl-Rest
GC	Gaschromatographie
Glc	Glucose
GMD	Golm Metabolome Database
GSL	Glucosinolat
HBA	Hydroxybenzoesäuren (Hydroxybenzoic Acids)
HCA	Hydroxizimtsäuren (Hydroxycinnamic Acids)
HCT	Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat/Chinat- Hydroxycinnamoyltransferase
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IDA	Information-Dependent-Acquisition
IR	Infrarot
ISCID	Stoßaktivierung innerhalb der Ionenquelle (In-Source Collision-Induced Dissociation)
K (1-2)	Kämpferol-Derivat (1-2)
k. V.	keine Veränderung
LC	Flüssigchromatographie
Lit	Literatur
LIT	lineare Ionenfalle (Linear Ion Trap)
M	molar
m/z	Masse zu Ladungs-Verhältnis
MALDI	Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization
MEKC	Mizellare elektrokinetische Chromatographie
MOA	Methoxyaminhydrochlorid
MRM	Multiple Reaction Monitoring
mRNA	Messenger-RNA
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MSTFA	<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -trimethylsilyltrifluoracetamid
n. d.	nicht detektiert
NDF	Neutrale-Detergenz-Faser (Neutral Detergent Fibre)
NIRS	Nahinfrarotspektroskopie
NIST	National Institute of Standards and Technology
nM	nanomolar
NMR	Kernmagnetresonanz (Nuclear Magnetic Resonance)
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PAL	Phenylalanin-Ammoniumlyase
PAR	Photosynthetisch wirksame Strahlung (Photosynthetically Active Radiation)
ppm	Teile pro Millionen (Parts Per Million)
Q (1-7)	Quercetin-Derivat (1-7)

QqLit	Quadrupol-Linear-Ionenfalle
QqQ	Triple-Quadrupol
QqTOF	Quadrupol-Time-of-Flight
<i>ref</i>	reduced epidermal fluorescence
RI	Retentionsindex
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic Acid)
RNAi	Ribonukleinsäure-Interferenz
rpm	Umdrehungen pro Minute
RP	Umkehrphase (Reversed Phase)
Rt	Retentionszeit
S	Syringyl-Rest
SALDH/CALDH	Sinapaldehyd/Koniferylaldehyd-Dehydrogenase
SE	Sinapinsäureester
SC	Sinapoylcholin (Sinapin)
SCE	Sinapin-Esterase
SCT	1-O-Sinapoyl- β -D-glucose:Cholin-O-Sinapoyltransferase
SGT	UDP-Glucose:Sinapat-Glucosyltransferase
SIM	Selected Ion Monitoring
sin	Sinapinsäure (Sinapoyl-Rest)
SinGlc	1-O-Sinapoylglucose
SinMal	2-O-Sinapoyl-S-malat
SMT	1-O-Sinapoyl- β -D-glucose: S-Malat-O-Sinapoyltransferase
<i>sng</i>	<i>sinapoylglucose accumulator</i>
soph	Sophorose
SRM	Selected-Reaction-Monitoring
TFA	Trifluoressigsäure (Trifluoroacetic Acid)
TOF	Flugzeit (Time-of-flight)
UDP	Uridindiphosphat
<i>UGT84A9i</i>	Rapspflanzen, die mittels dsRNAi <i>UGT84A9</i> supprimieren
<i>UGT84A9i/BnSCTi</i>	Rapspflanzen, die mittels dsRNAi <i>UGT84A9</i> und <i>BnSCT</i> supprimieren
<i>UGT84A9i/BnSCE3OE</i>	Rapspflanzen, die mittels dsRNAi <i>UGT84A9</i> supprimieren und <i>BnSCE3</i> überexprimieren
UK	unbekannte Komponente (Unknown)
UPLC	Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie
UVA	UV-Licht; Wellenlängenbereich von 315 nm bis 400 nm
UVB	UV-Licht; Wellenlängenbereich von 280 nm bis 315 nm
v/v	Volumen pro Volumen
VC	Vanilloylcholin
VIS	Wellenlängenbereich von 380 nm bis 780 nm (Visible)
WAF	Wochen nach Blühbeginn (Weeks After Flowering)
wäss.	wässrig
Wt	Wildtyp
Wt (D)	Wildtyp cv. Drakkar
Wt (L)	Wildtyp cv. Lisora

g	Einheit der Erdbeschleunigung
1,2,2-Tri-Sin-Gent	1,2,2'-Tri-O-sinapoylgentiobiose
1,2-Di-Sin-Gent	1,2-Di-O-sinapoylgentiobiose
1,2-Di-Sin-Glc	1,2-Di-O-sinapoylglucose
3D	3-dimensional
4CL	4-Cumarat:CoA-Ligase

1 Einleitung

1.1 Der Phenylpropan-Metabolismus in Brassicaceen

Der Ausgangspunkt des Phenylpropan-Metabolismus (Abbildung 1-1) ist die aromatische Aminosäure Phenylalanin. Sie ist neben Tryptophan und Tyrosin eines der Endprodukte des Shikimat-Weges, der in Plastiden lokalisiert ist (Ehltig et al., 2006; Schmid et al., 1995). Die ersten drei Schritte des so genannten generellen Phenylpropan-Stoffwechsels werden durch die Enzyme PAL, C4H und 4CL katalysiert und liefern, ausgehend von L-Phenylalanin über *trans*-Zimtsäure, die Verbindung 4-Cumaroyl-CoA. Dieser energiereiche Thioester ist der Ausgangspunkt für verschiedene Verzweigungen des Phenylpropan-Metabolismus, die zur Biosynthese einer Vielzahl von Verbindungen führen, wie z. B. den Flavonoiden, Lignin und den löslichen Hydroxyzimtsäureestern, von denen die Sinapinsäureester vorwiegend in Brassicaceen akkumulieren (Barz et al., 1985; Vogt 2010).

Der zu den Sinapinsäureestern führende Stoffwechselweg soll im Folgenden näher betrachtet werden. 4-Cumaroyl-CoA wird artspezifisch durch das Enzym HCT zu 4-Cumaroylshikimisäure bzw. 4-Cumaroylchinasäure umgesetzt (Hoffmann et al., 2003). Der Shikimisäure- bzw. Chinasäureester ist das Substrat für die *meta*-Hydroxlierung durch das Enzym C3H, die zu Kaffeoylshikimisäure bzw. -chinasäure führt (Schoch et al., 2001; Franke et al., 2002). Im nächsten Schritt wird durch die katalytische Aktivität des Enzyms HCT der Kaffeoylrest aus der Shikimisäure- bzw. Chinasäureester auf Coenzym-A übertragen. Die resultierende Verbindung Kaffeoyl-CoA wird durch Methylierung (CCoAOMT) zu Feruloyl-CoA und anschließende Reduktion (durch die CCR) zu Koniferylaldehyd umgewandelt (Lacombe et al., 1997). Dieser Aldehyd wird durch sukzessive Hydroxylierung (F5H) und *O*-Methylierung (COMT) an der C5-Position zu Sinapylaldehyd umgesetzt (Meyer et al., 1996; Humphreys et al., 1999). Die aromatischen Aldehyde können zu Alkoholen reduziert werden, die als Monolignole in die Lignin-Biosynthese eingehen (Humphreys et al., 2002). Andererseits bilden Sinapylaldehyd und Koniferylaldehyd die Substrate für eine bifunktionale Aldehyd-Dehydrogenase (SALDH/CALDH), welche die Aldehyde zu den entsprechenden Hydroxyzimtsäuren Sinapinsäure und Ferulasäure oxidiert (Nair et al., 2004).

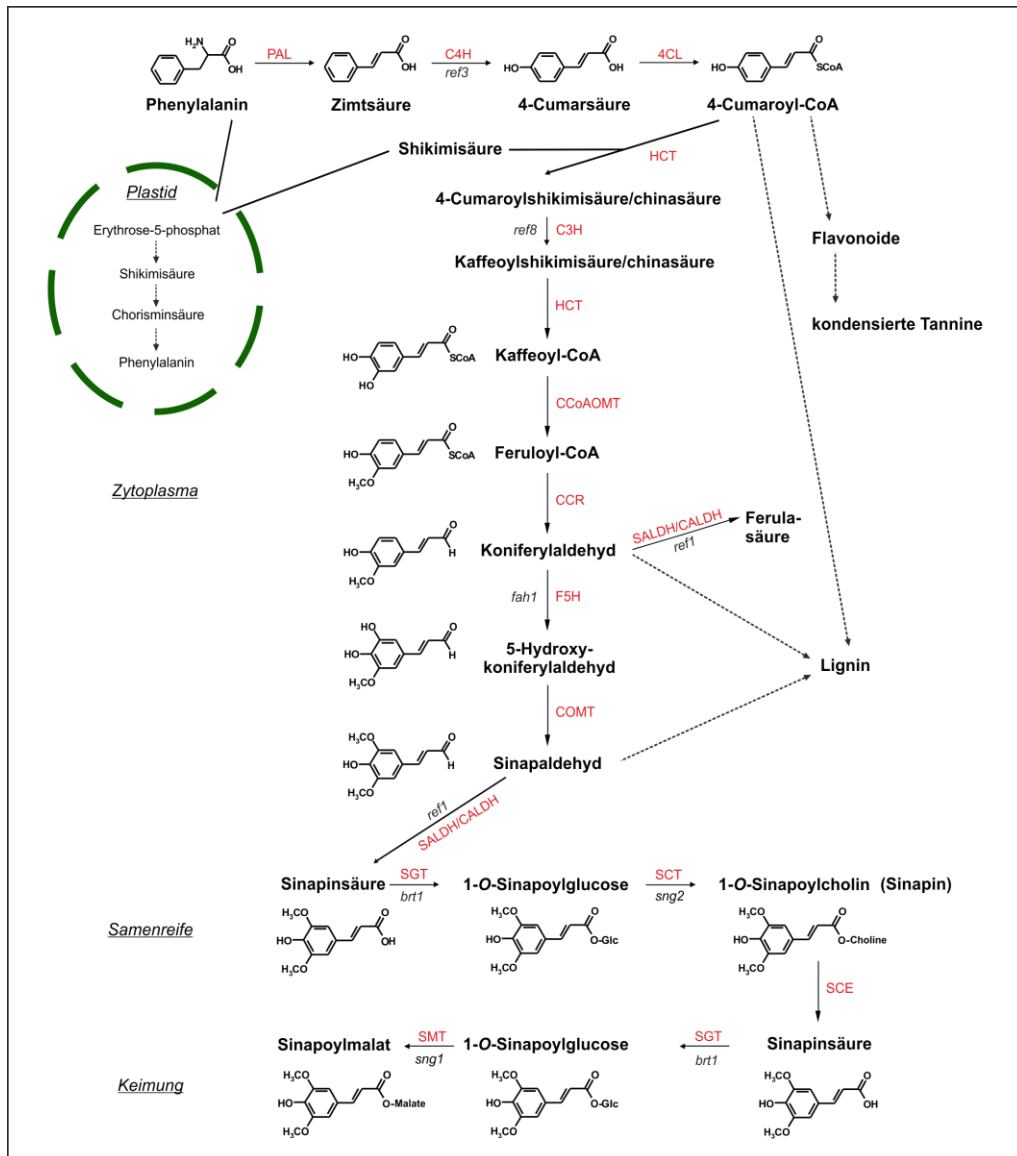


Abbildung 1-1. Phenylpropan-Metabolismus in *Arabidopsis* und Raps (modifiziert nach Milkowski und Strack 2010). Hervorgehoben ist die Biosynthese der Sinapinsäureester. Durchgezogene Pfeile repräsentieren einzelne enzymatische Reaktionen. Gestrichelte Pfeile repräsentieren Stoffwechselwege aus mehreren aufeinander folgenden enzymatischen Reaktionen. Durchgezogene Linien veranschaulichen den Transport von Metaboliten aus den Plastiden ins Zytoplasma. Enzymbezeichnungen sind rot hervorgehoben: **PAL**, Phenylalanin-Ammoniumlyase (EC 4.3.1.5); **C4H**, Cinnamat-4-Hydroxylase (EC 1.14.13.11); **4CL**, 4-Cumarat:CoA-Ligase (EC 6.2.1.12); **HCT**, Hydroxycinnamoyl-CoA:Shikimat/Chinat-Hydroxycinnamoyltransferase (EC 2.3.1.133/99); **C3H**, Cumaroylshikimat/chinat-3-Hydroxylase (EC 1.14.13.36); **CCoAOMT**, Kaffeoyle-CoA-O-Methyltransferase (EC 2.1.1.104); **CCR**, Cinnamoyl-CoA-Reduktase (EC 1.2.1.44); **F5H**, Ferulat-5-Hydroxylase (Monooxygenase, EC 1.14.13); **COMT**, 5-Hydroxykoniferinaldehyd-O-Methyltransferase (EC 2.1.1.68); **SALDH/CALDH**, Sinapaldehyd/Koniferinaldehyd-Dehydrogenase (EC 1.2.1.68); **SGT**, UDP-Glucose:Sinapat-Glucosyltransferase (EC 2.4.1.120); **SCT**, 1-O-Sinapoylglucose:Cholin-Sinapoyltransferase (EC 2.3.1.91); **SCE**, Sinapin-Esterase (EC 3.1.1.49); **SMT**, 1-O-Sinapoylglucose:S-Malat-Sinapoyltransferase (EC 2.3.1.92). Mutanten-Allele aus *Arabidopsis thaliana* sind kursiv hervorgehoben: *ref* – *reduced epidermal fluorescence*; *brt* – *bright trichomes*; *sng* – *sinapoylglucose accumulator*; *fah* – *ferulate hydroxylase*.

Sinapinsäure (*E*-3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure) ist in Pflanzen kaum als freie Säure enthalten, sondern wird zu verschiedenen Konjugaten, meist zu *O*-Estern oder Amiden, umgesetzt. In Brassicaceen bildet die Veresterung von Sinapinsäure mit Glucose die Eingangsreaktion in einen ausgeprägten Sinapinsäureester-Metabolismus. Durch eine Glucosyltransferase (UDP-Glucose:Sinapoyl-Glucosyltransferase; SGT) wird der Glucoserest aus UDP-Glucose auf die Carboxylgruppe der Sinapinsäure übertragen (Nurmann et al., 1980; Milkowski et al., 2000). Der resultierende β -Acetalester 1-*O*-Sinapoyl- β -D-glucose (Sinapoylglucose) dient im Stoffwechsel von Brassicaceen als Acyldonor für verschiedene Umesterungsreaktionen, durch die eine Vielfalt von Sinapinsäureestern synthetisiert wird. Im Samen von Brassicaceen akkumuliert der Sinapinsäureester Sinapoylcholin (Sinapin) als phenolische Hauptkomponente als Resultat einer durch das Enzym SCT (1-*O*-Sinapoyl- β -D-glucose:Cholin-Sinapoyltransferase) katalysierten Biosynthese (Strack et al., 1983; Shirley et al., 2001).

Während der Keimung des Samens wird Sinapin durch eine Sinapinesterase (SCE; Sinapoylcholin-Esterase) hydrolysiert (Strack et al., 1980; Clauß et al., 2008). Die dabei freigesetzte Sinapinsäure wird in der sich entwickelnden Keimpflanze durch eine induzierte SGT-Aktivität zu Sinapoylglucose verestert und anschließend durch das Enzym SMT (1-*O*-Sinapoyl- β -D-glucose:*S*-Malat-Sinapoyltransferase) zu Sinapoyl-*S*-Malat (Sinapoylmalat) konvertiert (Lorenzen et al., 1996). Sinapoylmalat akkumuliert in den Vakuolen der Mesophyll- und Epidermiszellen der Blätter und dient dort als UV-Schutz (Li et al., 1993; Landry et al., 1995; Sheahan 1996).

1.2 Akkumulation der Sinapinsäureester und Enzymaktivitäten

Die Samenentwicklung in höheren Pflanzen lässt sich in drei wesentliche Phasen einteilen: Embryogenese, Samenreife und Austrocknung. Während der Embryogenese erfolgt die Ausgestaltung des embryonalen Bauplans. Das Trockengewicht und die Zellgröße des Embryos sind gering. Die zweite Phase (Samenreife) ist gekennzeichnet durch eine rapide Zunahme des Volumens und Gewichtes des Samens, ausgelöst durch die Akkumulation von Reservestoffen wie Speicherproteinen und Speicherlipiden. Die dritte Phase (Austrocknung) ist durch graduelle Reduktion des Wassergehaltes und damit durch Abnahme des Frischgewichtes gekennzeichnet. In dieser Phase kommt es zur Ausprägung der Austrocknungstoleranz. Die Entwicklung, Anzahl und Qualität der Samen ist unter anderem abhängig von Umweltfaktoren wie zum Beispiel Temperatur, Wasser-, Nährstoff- und Lichtangebot.

Mikroskopisch lässt sich die Samenentwicklung von Raps (*B. napus*) in sieben morphologisch definierte Stadien untergliedern (Abbildung 1-2) (Milkowski et al., 2004)). Stadium A – C umfasst die Embryogenese, Stadium D – E die Samenreife und Stadium F – G die Austrocknung.



Abbildung 1-2. Samenentwicklung bei Raps (*B. napus*). **A:** Kugel-, Herz-, und Torpedostadium; **B:** frühes Keimblattstadium; **C:** mittleres Keimblattstadium, Keimblätter nehmen an Größe zu; **D:** spätes Keimblattstadium, der grüne Embryo hat die maximale Größe erreicht, die Samenschale ist weich; **E:** der Embryo ist voll entwickelt und noch grün, die Austrocknung beginnt und die Samenschale ist hart; **F:** die Samenschale ist braun und der Embryo ist gelb; **G:** die Samenschale ist schwarz und die Samen sind dormant.

Bisherige Untersuchungen zur Abundanz der Sinapinsäureester sowie zur Aktivität der am Sinapinsäureester-Metabolismus beteiligten Enzyme weisen auf eine entwicklungsspezifische Regulation in Samen und Keimlingen von Raps hin (Milkowski et al., 2004). In Abbildung 1-3 A ist die Akkumulation von Sinapin, Sinapoylglucose und Sinapoylmalat für 7 Stadien der Samenentwicklung (vgl. Abbildung 1-2) und für 6 Stadien der Keimlingsentwicklung illustriert. Zu Beginn der Samenentwicklung (Stadium A) wurde ausschließlich Sinapoylglucose in geringen Mengen detektiert. In Stadium B konnte neben Sinapoylglucose erstmals Sinapin nachgewiesen werden. Eine starke Zunahme von Sinapin und Sinapoylglucose wurde nach Eintritt in Stadium D beobachtet. Der maximale Gehalt an Sinapin und Sinapoylglucose wurde in reifen Samen (Stadium G) festgestellt. Während der Keimung kommt es zu einer rapiden Abnahme von Sinapin, begleitet durch einen starken Anstieg von Sinapoylmalat. Dies ist auf die Induktion des Enzyms SCE während der Keimung zurückzuführen, das Sinapin hydrolytisch spaltet, sowie auf die anschließende Konjugation der freigesetzten Sinapinsäure mit S-Malat über die Zwischenverbindung Sinapoylglucose als aktivierten Acyldonor. Vier Tage nach der Keimung ist Sinapin in den Keimblättern kaum noch zu detektieren, nach sechs Tagen ist die Sinapinkonzentration unter das Detektionslimit der analytischen HPLC gesunken. Der Gehalt an Sinapoylmalat erreicht zehn Tage nach der Keimung ein gleich bleibendes Niveau.

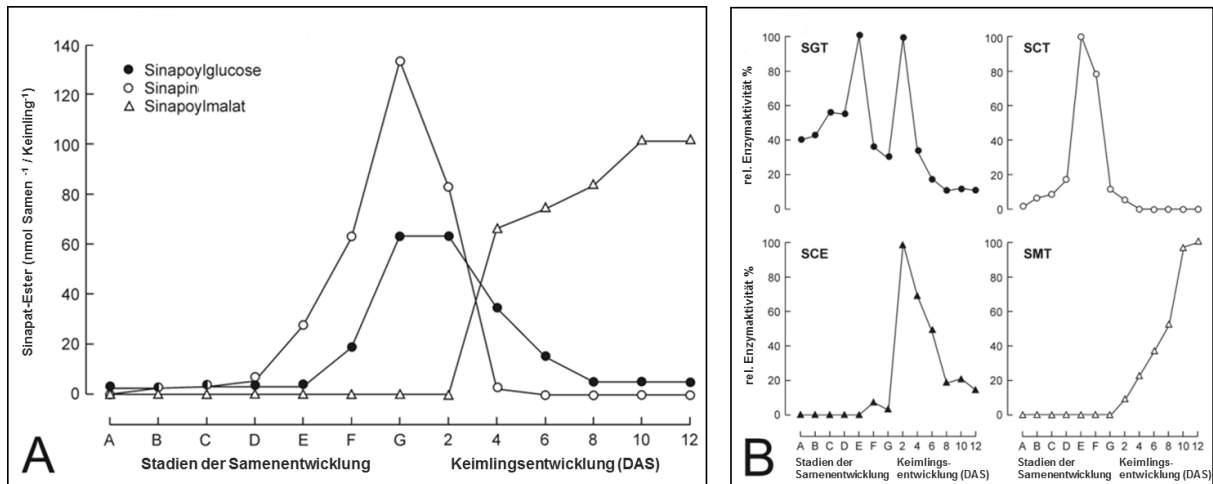


Abbildung 1-3. Metabolitakkumulation und Enzym-Aktivitäten in Samen und Keimlingen (Keimblätter) von Raps (*B. napus*) (Milkowski et al. 2004; modifiziert). **(A)** Akkumulation der Metabolite Sinapoylglucose, Sinapin und Sinapoylmalat während der Samen- und Keimlingsentwicklung. **(B)** Aktivitäten der Enzyme SGT, SCT, SCE und SMT.

Abbildung 1-3 B zeigt die Aktivitäten der Enzyme SGT, SCT, SCE und SMT während der Samenentwicklung und Keimung in *B. napus*. Die Aktivität dieser Enzyme korreliert mit der Akkumulation der entsprechenden Sinapinsäureester. Die höchsten Aktivitäten von SGT und SCT sind während der Samenentwicklung in Stadium E (grüner, voll entwickelter Embryo) zu finden. Die SGT hat ein zweites Aktivitäts-Maximum in den Kotyledonen zwei Tage alter Keimpflanzen. Wie zu erwarten, wird die SCE-Aktivität unmittelbar nach der Samenkeimung induziert und erreicht ihr Maximum in zwei Tage alten Keimblättern, dass zu einer raschen Verminderung von Sinapin führt. Die Aktivität der SMT nimmt während der Keimung kontinuierlich zu und erreicht nach zehn Tagen ein gleich bleibendes Niveau.

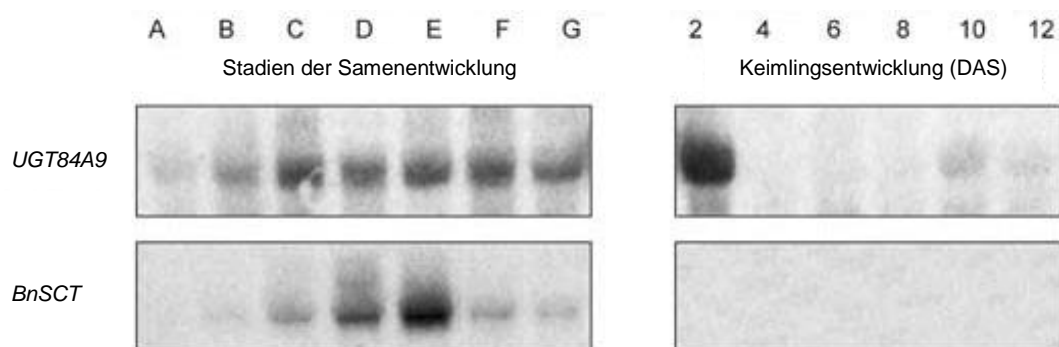


Abbildung 1-4. Transkript-Abundanzen der Gene *BnSGT1* (*UGT84A9*) und *BnSCT* in Samen und Keimlingen von *B. napus* (Milkowski et al. 2004; modifiziert).

Abbildung 1-4 zeigt die Transkript-Abundanzen für die Gene *BnSGT1* (*UGT84A9*) und *BnSCT* während der Samenentwicklung und Keimung. Während der Embryogenese steigt die Transkript-Abundanz von *BnSGT1* an und bleibt danach

relativ konstant. Zwei Tage nach der Keimung erfolgt eine weitere transiente Induktion der *BnSGT1*-Transkripte, die jedoch bereits im vier Tage alten Keimling nicht mehr zu detektieren sind. Die Transkripte für das Enzym *BnSCT* werden samenspezifisch gebildet, ihre Abundanz steigt rasch von Stadium C nach E und ist danach kaum noch zu detektieren. Die Aktivität der Enzyme SGT und SCE korreliert gut mit der Transkript-Akkumulation der entsprechenden Gene *BnSGT1* (*UGT84A9*) und *BnSCT*.

1.3 Raps als Kulturpflanze

Raps ist weltweit gesehen eine der drei wichtigsten Ölpflanzen und deckt zwischen 10 % und 13 % des menschlichen Ölbedarfs aus Pflanzen (<http://www.gmo-safety.eu>, Hajduch et al., 2006). Die Verwendung von Rapssamen zur Produktion von Speiseöl sowie als Rapsmehl in der Tierproduktion wurde durch die Entwicklung so genannter „Doppel-Null“ (00)-Linien ermöglicht. Diese Linien haben einen sehr geringen Gehalt an Erucasäure (weniger als 2 % des Gesamt-Ölgehaltes) und Glucosinolaten (weniger als 25 µmol pro Gramm Saat). Erucasäure führte bei Ratten zur Lipidose, einer vermehrten Speicherung von Fetten im Herzmuskelgewebe. Daraus kann eine Herzinsuffizienz resultieren (Kramer et al., 1992). Die Abbauprodukte von Glucosinolaten, die Senföle, sind im Pressrückstand (Rapsmehl) zu finden und verursachen Verdauungsstörungen. Durch Selektion und Kreuzung von Raps-Linien mit niedrigen Gehalten an Erucasäure und Glucosinolaten konnten die ersten Doppel-Null-Sorten erzeugt werden (Downey et al., 1990).

Reife Rapssamen enthalten etwa 50 % Öl (w/w) und 25 % Proteine (w/w). Nach der Extraktion des Öls enthält das resultierende Rapsmehl etwa 40 % Proteine (Fenwick 1982). Die Proteinfraction ist reich an essenziellen, insbesondere schwefelhaltigen Aminosäuren, B-Vitaminen und Mineralien und deshalb wertvoll als Nahrungs- und Futtermittel (Ohlson 1978; Nesi et al., 2008). Die uneingeschränkte Verwendung von Rapsmehl als Futtermittel sowie ein möglicher Einsatz in der Nahrungsmittelindustrie sind jedoch auch in Doppel-Null-Linien aufgrund antinutritiver Komponenten wie Faserstoffe und Proanthocyanidine in der Samenschale und Sinapinsäureester im Embryo nicht möglich (Kozłowska et al., 1990; Shahidi et al., 1992; Bell 1993). Dabei ist Sinapoylcholin (Sinapin) die im Rapssamen vorherrschende phenolische Verbindung und erreicht bis zu 2 % des Samen-Trockengewichtes (Fenwick 1982; Shahidi et al., 1992; Naczek et al., 1998). Es wird vermutet, dass Sinapinsäureester während der Ölgewinnung Komplexe mit Proteinen bilden und dadurch die Verdaubarkeit des Rapsmeihls beeinträchtigen (Naczek et al., 1998). Weiterhin haben sie eine adstringierende Wirkung.

Die Nutzbarkeit von Rapsmehl als Proteinquelle ist entscheidend von der Reduktion der antinutritiven Komponenten abhängig. Durch herkömmliche Züchtung ist es gelungen, gelbsamige Rapslinien zu erzeugen, die im Vergleich zu schwarzschaligen Sorten einen verminderten Gehalt an Faserstoffen und Proanthocyanidinen enthalten (Rahman, 2001). Eine Verminderung der Konzentration von antinutritiven Sinapinsäureester ist durch konventionelle Züchtung jedoch noch nicht gelungen. Allerdings konnte auf biotechnologischem Weg eine signifikante Absenkung des Gehalts an Sinapinsäureestern erreicht werden.

1.4 Absenkung der Sinapinsäureester in *B. napus*

Die Identifizierung der Gene für den Sinapinsäureesterstoffwechsel bildete die entscheidende Voraussetzung für experimentelle Strategien zur Absenkung des Gehalts an Sinapinsäureestern durch „metabolic engineering“. Bisher wurden transgene Raps-Linien erzeugt, die über dsRNA*-*vermittelte Suppression der Biosynthese die Akkumulation der Sinapinsäureester im Samen unterdrücken sollte. Ein anderer experimenteller Ansatz war auf die induzierte Hydrolyse des Sinapins während der Samenreife gerichtet. Für die verschiedenen transgenen Strategien wurde eine unterschiedliche Effizienz beschrieben.

Die samenspezifische Suppression der Gene für Enzyme des generellen Phenylpropanstoffwechsels (BnC3H, BnC4H, BnCOMT) in *B. napus* führte nicht zu der gewünschten Erniedrigung des Sinapin-Gehaltes (Bhinu et al., 2009). Darüber hinaus zeigten die Analysen der Arabidopsis-Mutanten *ref8* (C3H) (Franke et al., 2002; Franke et al., 2002) und *ref3* (C4H) (Schillmiller et al., 2009), dass konstitutive Veränderungen im generellen Phenylpropanstoffwechsel zu unerwünschten Effekten wie Pollensterilität, Zwergwuchs, erhöhter Anfälligkeit gegenüber Pilzbefall und Veränderungen im Lignin führen kann. Deswegen eignet sich diese Strategie nicht für die Absenkung von Sinapinsäureestern in *B. napus*.

Mit einem antisense-Ansatz wurde das Enzym BnF5H samenspezifisch supprimiert (Nair et al., 2000). Das Ergebnis war eine Reduktion des Sinapin-Gehaltes auf maximal 40 % im Vergleich zum Wildtyp. Die Arabidopsis-Mutante *sin1* (*fah1*; Chapple et al., 1992), die eine Mutation in der F5H hat und in reifen Samen eine Sinapinreduktion auf 5 % des Wildtypgehalts aufweist, zeigt während der Keimungs- und Wachstumsphase unter Einwirkung von UV-Strahlung erhebliche morphologische und physiologische Schäden (Landry et al., 1995). Dies ist auf die Abwesenheit von Sinapoylmalat als UV-Schutz zurückzuführen (Li et al., 1993; Sheahan 1996). Aufgrund dieser Erkenntnisse sollte die Suppression der BnF5H in *B. napus* streng samenspezifisch erfolgen.

Die Suppression der BnSCT ergab eine signifikante Absenkung des Sinapin-Gehaltes, die jedoch durch die Akkumulation von Sinapoylglucose ausgeglichen wurde (Weier et al., 2008; Bhinu et al., 2009). Die Arabidopsis-Mutante *sng2* (Shirley et al., 2001), die eine Mutation im Gen für die SCT trägt, zeigt die gleichen Ergebnisse. Da Sinapoylglucose ähnlich antinutritiv wirkt wie Sinapin, eignet sich diese Strategie nicht zur Verbesserung der Schrotqualität von *B. napus*. Die kombinierte samenspezifische Suppression der Gene für die BnF5H und BnSCT senkte den Sinapin-Gehalt in Samen auf 10 – 40 % des Wildtyp-Niveaus und den Gesamt-Sinapinsäureester-Gehalt durchschnittlich auf 25 % (Bhinu et al., 2009).

Eine andere Möglichkeit zur Reduktion des Sinapinsäureester-Gehaltes ist das Silencing des *REF1*-Gens. *REF1* codiert für eine bifunktionale Cinnamaldehyd-Dehydrogenase (SALDH/CALDH), welche Sinapaldehyd und Koniferylaldehyd in Sinapinsäure und Ferulasäure konvertiert. Silencing von *REF1* führt zu einer signifikanten Abnahme des Sinapinsäureester-Gehaltes. Die entsprechende Arabidopsis-Mutante *ref1* (Nair et al., 2004) zeigt eine Absenkung des Sinapin-Gehaltes in reifen Samen auf ca. 25 % des Wildtyp-Niveaus. Die Analyse von Zellwand-gebundenen Phenolen ergab eine Konzentrationsabnahme der Zellwand-assoziierten Ferulasäure auf 50 % des Wildtyp-Gehalts. Die Mutante zeigte keine Unterschiede in der Morphologie im Vergleich zum Wildtyp.

Eine weitere Strategie zur Reduktion antinutritiver Sinapinsäureester ist die samenspezifische dsRNAi-vermittelte Suppression des Enzyms BnSGT1 (UGT84A9) (Hüsken et al., 2005). Im Folgenden wird die Bezeichnung *UGT84A9i* für diese Pflanzen bzw. deren Samen verwendet. Die erzeugten transgenen Pflanzen wurden bis zur vierten transgenen Generation (T4) vermehrt und jede Generation hinsichtlich des Sinapin- und Gesamt-Sinapinsäureester-Gehaltes in reifen Samen analysiert (Hüsken et al., 2005). In der T4-Generation wurde eine maximale Absenkung des Sinapin-Gehaltes auf 45 % des Wildtyp-Niveaus beobachtet. Der Gesamt-Sinapinsäureester-Gehalt ist hingegen auf 31 % reduziert. Die Arabidopsis-Mutante *brt1* (Sinlapadech et al., 2007) trägt eine Null-Mutation im Gen für die SGT (UGT84A2). Sowohl in Blättern als auch in reifen Samen dieser Mutante wurde eine Verringerung des Sinapinsäureester-Gehaltes auf lediglich 60-70 % des Wildtyp-Niveaus festgestellt. Die Analyse von isogenen Arabidopsis-*ugt84a2*-Null-Mutanten (Meißner et al., 2008) bestätigte die moderate Absenkung des Gesamt-Sinapinsäureester-Gehaltes. Eine mögliche Ursache für die ineffiziente Unterdrückung der Sinapinsäureester-Akkumulation in den *ugt84a2*-Mutanten von Arabidopsis ist das Vorhandensein funktionell redundanter Glucosyltransferasen (Meißner et al., 2008).

Als bisher erfolgreichste Strategie zur Absenkung des Sinapinsäureester-Gehalts wurde die samenspezifische Expression einer Sinapinesterase (SCE) beschrieben. Dadurch konnten sowohl in der Modell-Pflanze *Arabidopsis* als auch in *B. napus* nahezu Sinapin-freie Linien erzeugt werden (Clauß et al., 2008; Clauß et al., 2011).

1.5 Die Analyse des pflanzlichen Metaboloms

Metabolite sind die Endprodukte der Genexpression und ihre Konzentrationen spiegeln die Antwort eines biologischen Systems auf genetische oder umweltbedingte Veränderungen wider. Sie nehmen eine zentrale Rolle im komplexen Zusammenspiel zwischen Genen, Transkripten und Proteinen ein, indem sie z.B. die Regulation der Genexpression beeinflussen und somit ihre eigene Biosynthese steuern.

Das Metabolom einer Zelle, eines Gewebes oder Organismus bezeichnet alle darin vorkommenden Metabolite sowie deren quantitative Informationen. Zur Analyse des Metaboloms werden verschiedene Strategien verfolgt, die im Folgenden kurz erläutert werden. Hierbei ist zu beachten, dass die unterschiedlichen Ansätze üblicherweise eine Momentaufnahme des Metaboloms liefern.

Unter der englischen Bezeichnung „Metabolite Target Analysis“ wird die gerichtete Analyse von einzelnen Metaboliten verstanden. Dabei werden beispielsweise nur die Metabolite einzelner enzymatischer Reaktionen betrachtet. Eine Erweiterung dieser Strategie ist das „Metabolite Profiling“. Bei dieser Vorgehensweise werden die Metabolite eines ausgewählten biochemischen Stoffwechselweges analysiert. Der Begriff „Metabolomics“ beschreibt die gesamtheitliche Analyse des Metaboloms einer biologischen Probe oder eines Organismus und stellt somit die umfassendste Analyse-Strategie dar. Eine weitere Methodik beschreibt der Begriff „Metabolic Fingerprinting“. Hier besteht das Ziel nicht in der umfassenden Identifizierung einzelner Metabolite, sondern in der Klassifizierung von Proben durch schnelle, globale Analyse des biologischen Materials (Fiehn 2002; Hall et al., 2002).

Eine große Herausforderung bei der Analyse des Metaboloms ist die chemische Vielseitigkeit und biologische Varianz der Metabolite. Eine gleichzeitige Analyse aller Metabolite einer biologischen Probe ist auf Grund der hohen Komplexität zurzeit nicht realisierbar. Um die Analyse pflanzlicher Metabolite zu vereinfachen, werden unterschiedliche technologische Plattformen genutzt. Die Auswahl eines geeigneten Analysesystems hängt von der biologischen Fragestellung ab und sollte in diesem Zusammenhang den besten Kompromiss aus Selektivität, Sensitivität und Analysegeschwindigkeit darstellen (Sumner et al., 2003).

Zwei-dimensionale Dünnschichtchromatographie wurde zum Beispiel für die Analyse der 70 abundantesten ^{14}C -markierten Glucose-Verbindungen in *E. coli* bei verschiedenen Kulturbedingungen eingesetzt (Tweeddale et al., 1998). Diese Technik hat allerdings eine sehr geringe Auflösung und ist schwierig auf komplexe Proben übertragbar.

Spektroskopische Methoden im Infrarot- (IR) und UV/VIS-Bereich kommen ebenfalls zum Einsatz. So wurde Fourier-Transform-IR-Spektroskopie zur Unterscheidung von Hefe-Mutanten vom Wildtyp genutzt (Oliver et al., 1998). UV/VIS-Detektion findet z.B. Anwendung in Kombination mit Flüssigchromatographie (HPLC-UV/VIS) oder Kapillarelektrophorese (CE/UV). Einsatz fand HPLC-UV/VIS zum Beispiel bei der Analyse von Isoprenoiden (Fraser et al., 2000; Schliemann et al., 2008) oder Phenylpropanderivaten (Baumert et al. 2001). CE-UV wurde eingesetzt für die Quantifizierung von Primärmetaboliten aus Blättern von Reispflanzen (Sato et al., 2004) oder zur Analyse von Flavonoiden in Zwiebeln (*Allium cepa* L.) (Caridi et al. 2007).

Die Trennung von Substanzen durch Kapillarelektrophorese basiert auf der unterschiedlichen Geschwindigkeit von Ionen in einem elektrischen Feld. Demzufolge werden bei der konventionellen Kapillarzonenelektrophorese (CZE) ausschließlich ionische Verbindungen aufgetrennt. Die Anwendung der mizellaren elektrokinetischen Chromatographie (MEKC) ermöglicht auch die Analyse ungeladener Analyten, wobei diese Technik nur von wenigen Anwendern genutzt wird. Die UV-Detektion erfolgt bei der MEKC direkt in der Trennkapillare durch ein am kathodischen Ende der Kapillare eingebranntes Detektionsfenster. Für die optische Detektion steht somit nur die mittlere Weite des Kapillardurchmessers als durchleuchtete Schichtdicke zur Verfügung. Dadurch liegt die Sensitivität dieser Technik maximal in den aus der HPLC-UV gängigen Bereichen. Auch die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wird durch die geringe Schichtdicke für die UV-Detektion negativ beeinflusst.

Das Trennprinzip der HPLC basiert auf den Wechselwirkungen zwischen den Probenbestandteilen und der stationären und mobilen Phase. Die HPLC-UV/VIS-Technik liefert bei guter Basislinientrennung eine akkurate, präzise und zerstörungsfreie qualitative und quantitative Analyse. Die UV/VIS-Detektion in Verbindung mit HPLC eignet sich besonders um bestimmte Klassen von Verbindungen anhand ihrer spezifischen Absorptionsspektren zu identifizieren und zu quantifizieren. So konnten beispielsweise Kämpferol- und Quercetin-Derivate in Blättern von *Arabidopsis thaliana* aufgrund ihrer charakteristischen Absorptionsspektren anhand von HPLC-UV/VIS-Analysen diskriminiert werden

(Meißner et al. 2008). Bei komplexen Proben kann allerdings durch Koelution von Metaboliten das UV/VIS-Spektrum verändert werden und demzufolge die Interpretation der Messdaten erschweren. Häufig ist bei der Analyse von komplexen Proben nicht ausschließlich die Substanzklasse von Bedeutung, sondern vielmehr der Metabolit an sich. Insbesondere bei Vorhandensein von Strukturisomeren mit ähnlichen UV/VIS-Spektren genügt die spektrophotometrische Detektion zur Analyse der Probenbestandteile nicht aus, weil sie nur sehr wenige Informationen zur Struktur einer unbekanntes Verbindung liefert. Um strukturelle Informationen eines Moleküls zu erhalten sind Techniken wie Kernmagnetresonanz-Spektroskopie (NMR-Spektroskopie) oder Massenspektrometrie notwendig.

NMR wurde z. B. zur Analyse von Phenylpropanderivaten aus Rübsen-Blättern (*Brassica rapa*) (Liang et al., 2006) oder *Arabidopsis thaliana* (Hendrawati et al., 2006) verwendet. Weitere Anwendungen beschreiben (Schripsema 2010) oder (Ward et al., 2007). Vorteilhaft ist die schnelle, akkurate und zerstörungsfreie Messung von Analyten in überwiegend flüssiger Phase ohne eine aufwändige Probenvorbereitung und ohne vorgeschaltete chromatographische Auftrennung, weshalb sich diese Technik insbesondere für die Strukturaufklärung von Substanzen eignet. Nachteil der NMR bezüglich der quantitativen Analyse pflanzlicher Metabolite ist eine relativ geringe Sensitivität und ein kleiner dynamischer Messbereich (Want et al., 2005). Das führt dazu, dass überwiegend Metabolite mit einer hohen Abundanz detektiert werden.

Die Massenspektrometrie stellt eine sensitive und selektive Technik für die Untersuchung pflanzlicher Metabolite dar und ist die heute am häufigsten eingesetzte Methode zur Analyse des Metaboloms (Want et al., 2005; Hall 2006; Saito et al., 2010). Die Massenspektrometrie-basierte Analyse erreicht im Vergleich zur HPLC-UV/VIS und zur NMR eine viel höhere analytische Auflösung, welche die Anzahl der Substanzen beschreibt, die in einem analytischen Lauf annotiert werden können. Der Vorteil gegenüber NMR ist weiterhin eine höhere Sensitivität und dadurch geringere Detektions- und Quantifizierungsgrenzen (Want et al., 2005). Durch Nutzung der LC-NMR Technik kann zwar die analytische Auflösung gesteigert werden, allerdings ist die Sensitivität nicht vergleichbar mit Massenspektrometrie-basierten Methoden. Die NMR ist jedoch die Methode der Wahl zur Strukturaufklärung von isolierten Metaboliten. Ein weiterer Vorteil der Massenspektrometrie-basierten Analyse gegenüber HPLC-UV/VIS besteht in der strukturellen Information, die das Massenspektrum liefert. Somit erhöht sich durch die Anwendung der Massenspektrometrie im Vergleich zur NMR und HPLC-UV/VIS das Spektrum der zugänglichen Metabolite erheblich.

1.5.1 Massenspektrometrie-basierte Methoden

Vor der massenspektrometrischen Analyse kann die biologische Probe durch ein geeignetes Trennverfahren wie CE (Sato et al., 2004), LC (Hanhineva et al., 2008) oder GC (Lytovchenko et al., 2009) aufgetrennt oder direkt in die Ionenquelle injiziert werden (Goodacre et al., 2003; Allwood et al., 2006). Besonders bei schwierigen biologischen Proben ist eine Auftrennung komplexer Stoffgemische vor der massenspektrometrischen Analyse von Vorteil. Die Unterscheidung isobarer Substanzen kann durch ein vorgeschaltetes Trennverfahren möglich sein. Falls dies nicht möglich oder ausreichend ist, können beispielsweise MS/MS Analysen zur Diskriminierung eingesetzt werden.

Weiterhin besteht die Möglichkeit der on-line- und off-line-Kopplung zwischen dem vorgeschalteten Trennsystem und dem Massenspektrometer. Bei der on-line-Kopplung wird das Eluat des vorgeschalteten Trennverfahrens direkt über ein Interface in die Ionenquelle des Massenspektrometers überführt. Die off-line-Kopplung trennt diese Schritte voneinander. So ist es z. B. möglich eine offline-Kopplung von CE und MS zu realisieren, indem die Fraktionen der CE-Trennung direkt auf MALDI-Trägern gesammelt und nachfolgend mittels MS analysiert werden (Walker et al. 1995). Üblicherweise wird jedoch die on-line-Kopplung bei CE-, GC- und LC-MS Verfahren verwendet.

CE/MS wurde z. B. zur Unterscheidung von Wildtyp und Mutanten bei *E. coli* eingesetzt (Timischl et al., 2008). Die Schwierigkeit der CE/MS besteht in der Verwendung geringer Volumina, die die Verwendung eines Zusatzflusses an Puffern erfordert, um die Überführung der Analyten in die Gasphase und die Ionisierung zu realisieren. Auch die in der CE verwendeten Puffersysteme, wie beispielsweise Borat- oder Phosphatpuffer, erschweren die MS-Kopplung. Die Anwendung der Kapillarelektrophorese in Kombination mit der Massenspektrometrie zur Analyse pflanzlicher Metabolite findet nur eingeschränkt Verwendung. Die am häufigsten verwendeten chromatographischen Trennmethode in Verbindung mit MS sind LC und GC, auf die im Folgenden detailliert eingegangen wird.

1.5.1.1 Flüssig-Chromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie

Die chromatographische Trennung der biologischen Probe kann mit Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) oder Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (UPLC) erfolgen. Die UPLC nutzt die Vorteile, die sich aus der Verwendung kleiner Partikel (< 2 µm) unter erhöhtem Arbeitsdruck ergeben.

Das resultiert in der verbesserten Selektivität und Effizienz der chromatographischen Trennung, die zu höherer Empfindlichkeit und kürzeren Analysezeiten führt (MacNair et al., 1997; Cintron et al., 2002).

Die gängigsten Ionisierungstechniken bei der LC/MS Analyse sind die Elektrospray-Ionisierung (ESI), die chemische Ionisierung unter Atmosphärendruck (APCI) und die Photo-Ionisierung unter Atmosphärendruck (APPI). Dabei ist jedoch die Elektrospray-Ionisierung die am häufigsten verwendete Technik (von Roepenack-Lahaye et al., 2004; Rischer et al., 2006; De Vos et al., 2007; Hanhineva et al., 2008; Böttcher et al., 2008). ESI eignet sich gut um eine Vielzahl von Metaboliten zu ionisieren und findet Anwendung bei der Analyse von Proteinen und Metaboliten. Die APCI eignet sich für die Ionisierung von gering bis mäßig polaren Metaboliten wie z. B. Fettsäuren (Byrdwell 2001) und Carotinoiden (Dachtler et al., 2001; Schweiggert et al., 2005). Häufig können unpolare Substanzen mit APCI nur unzureichend ionisiert werden, so dass als alternative Ionisierungstechnik APPI eingesetzt wird (Raffaelli et al., 2003; Cai et al., 2006). APPI findet allerdings wenig Anwendung bei der Analyse pflanzlicher Metabolite. Eingesetzt wurde diese Technik aber beispielsweise zur Analyse von Olivenöl zu Zwecken der Qualitätskontrolle (Gomez-Ariza et al. 2006).

Bei der Analyse des Metaboloms kommen zwei grundlegende Konzepte zur Anwendung. Dies sind einerseits der zielgerichtete Ansatz (targeted approach) und andererseits der ungerichtete Ansatz (non-targeted approach) (Fiehn 2001). Bei der zielgerichteten Analyse wird eine Gruppe von strukturell ähnlichen Metaboliten oder die einem ausgewählten biochemischen Stoffwechselweg zugehörigen Metabolite quantitativ analysiert. Bei dieser Methodik stehen vorher ausgewählte Metabolite im Fokus der Analyse. Das „non-targeted“-Profiling ist eine zum „targeted“-Profiling komplementäre Strategie. Die ungerichtete Analyse hat zum Ziel alle potenziell messbaren und relevanten Metabolite einer biologischen Probe zu quantifizieren. Die Motivation für diesen Ansatz ergibt sich aus der Fragestellung, welche umfassenden Veränderungen im Metabolom z. B. durch genetische Modifikationen eines Organismus verursacht werden. Nur durch eine ganzheitliche Analyse besteht die Möglichkeit das biologische System vollständig zu charakterisieren.

Die am häufigsten verwendeten und leistungsstärksten Massenanalysatoren für das „non-targeted“-Profiling sind FT-ICR-, Orbitrap- und QqTOF-Massenanalysatoren (Giavalisco et al., 2008; Allwood et al., 2010). Sie zeichnen sich durch eine hohe Massengenauigkeit (5 ppm oder besser) aus sowie einer hohen Massenauflösung (QqTOF bis zu 30.000, Orbitrap bis zu 100.000, FT-ICR bis zu 500.000) und einem großen dynamischen Messbereich (Allwood et al., 2010). Nach der Selektion von

Kandidatenpeaks können durch nachfolgende MS/MS-Analysen Strukturhypothesen aufgestellt und verifiziert werden.

Im Bereich der gerichteten Analyse von Metaboliten finden vor allem Triple-Quadrupol (QqQ), Quadrupol-Linear-Ionenfallen (QqLit) und Ionenfallen (IT) Analysatoren Anwendung (Hopfgartner et al., 2004; Lu et al., 2008). Diese Geräte ermöglichen neben einem Full-Scan Modus (Scannen eines großen Massenbereiches) verschiedene Modi wie Produktionen-, Vorläuferionen- und Neutralverlust-Scans sowie Selected Reaction Monitoring (SRM) (Kopka et al., 2004; Catchpole et al., 2005; Brügger et al., 1997). Beim SRM wird im ersten Quadrupol ein Vorläuferion ausgewählt und anschließend im zweiten Quadrupol fragmentiert. Im dritten Quadrupol erfolgt die Detektion eines festgelegten Produktions (Fragmentions). Werden mehrere solcher Massenbereiche, so genannte Übergänge, in einer Methode zusammengefasst, wird die Bezeichnung „Multiple Reaction Monitoring“ (MRM) verwendet. Die Vorteile einer MRM-Methode liegen vor allem bei einer erhöhten Sensitivität, die durch ein höheres Signal-zu-Rausch-Verhältnis bedingt ist, einer großen Selektivität sowie der schnellen und einfachen Quantifizierung bereits bekannter Metabolite (Lu et al., 2008).

1.5.1.2 Gas-Chromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie

Eine Voraussetzung für die Analyse von Metaboliten mittels GC/MS ist die Verdampfbarkeit und thermische Stabilität der Analyten. Ist dies, wie bei polaren Metaboliten nicht der Fall, müssen die funktionellen Gruppen derivatisiert werden, um die Polarität zu verringern und die chemische Stabilität zu erhöhen (Blau et al., 1993; Knapp 1979; Little 1999). Nach der gaschromatographischen Trennung der Probenbestandteile erfolgt die Ionisierung mittels Elektronen-Stoßionisierung (EI) oder chemischer Ionisierung (CI).

Auch bei der GC/MS-Analyse kommen die Konzepte der gerichteten und ungerichteten Analyse zum Einsatz. Quadrupole, Ionenfallen und TOF- Analysatoren werden hierbei überwiegend verwendet (Want et al., 2005). Im Full-Scan-Modus wird ein bestimmter Masse-zu-Ladungs-Bereich (typischerweise m/z 50-600) gescannt und die Identifizierung der Metabolite erfolgt anhand ihrer charakteristischen Fragmentierungsmuster.

Für GC/MS-Analysen existieren umfangreiche Bibliotheken mit EI-Spektren (Kopka et al., 2005), die eine einfache Identifizierung von Metaboliten anhand ihres Retentionszeitindex und Fragmentierungsmusters ermöglichen (Schauer et al., 2005) sowie Protokolle für den kompletten Analyseablauf (Lisec et al., 2006). Die Identifizierung der Metabolite anhand der EI-Spektren wird dadurch erleichtert, dass

sie üblicherweise bei einer Stoßenergie von 70 eV aufgenommen werden und deshalb für alle MS mit Elektronen-Stoßionisierung einen universellen Charakter besitzen. Einsatz fand die GC-MS beispielsweise bei der Untersuchung von Blättern verschiedener Tomatensorten (Schauer et al., 2005; Tikunov et al., 2005), von *Arabidopsis thaliana* nach Salzstress (Kim et al., 2007) oder von mykorrhizierendem Schneckenklee (*Medicago truncatula*) (Schliemann et al., 2008). Die Dekonvolution der komplizierten Metabolitenspektren erfolgt zumeist softwaregestützt (Lüdemann et al., 2008; Stein 1999).

Neben dem Full-Scan-Modus wird auch der „Selected-Ion-Monitoring“-Modus (SIM) zur Aufnahme kleiner Masse-zu-Ladungs-Bereiche genutzt. Dies ermöglicht das gezielte Monitoring charakteristischer Fragmente bekannter Verbindungen bei verbesserter Sensitivität. Die gesteigerte Sensitivität resultiert aus einem verbesserten Signal-zu-Rausch-Verhältnis, welches durch die Aufnahme eines kleinen m/z -Bereiches bedingt wird. Anwendung fand die GC/MS-Analyse im SIM-Modus beispielsweise bei Flux-Analysen während der Samenentwicklung von *B. napus* (Schwender et al., 2006; Schwender et al., 2003).

1.6 Zielstellung der Arbeit

Eine Voraussetzung für die wirtschaftliche Verwertbarkeit von Rapsschrotprodukten im Lebens- und Futtermittelbereich ist die Reduktion der antinutritiven Komponenten im Rapssamen. Verschiedene biotechnologische Ansätze zur Absenkung der Sinapinsäureester wurden umgesetzt (Kapitel 1.4). Aufgrund der Tatsache, dass Sinapin die überwiegende phenolische Verbindung im Rapssamen ist, wurden die transgenen Linien nahezu ausschließlich auf die Reduktion von Sinapin und löslichen Sinapinsäureestern hin untersucht und selektiert. Es wurde wiederholt beobachtet, dass gentechnisch veränderte Pflanzen neben den erwünschten auch völlig unerwartete Stoffwechselveränderungen aufweisen. Aus diesem Grund ist es essenziell, die gentechnisch veränderten Niedrig-Sinapin-Rapslinien hinsichtlich metabolischer Veränderungen zu charakterisieren, um dem Konzept des „Substantial Equivalence“ zu genügen.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die durch transgene Ansätze angestrebten Veränderungen im Sinapinsäureester-Metabolismus nachzuweisen und die begleitenden, eventuell unerwünschten, Änderungen in der Abundanz weiterer Sekundär- und Primärmetabolite durch umfassende Metaboliten-Analysen zu erfassen. Die Metaboliten-Analyse während verschiedener, definierter Stadien der Samen- und Keimlingsentwicklung sollten die Auswirkung der Gensuppression auf das Metabolitenmuster erkennen lassen. Die Ergebnisse sollten Prognosen zur Fitness der Pflanzen mit verändertem Metabolitenprofil und zum Einsatz des gewonnenen Rapsmehls für Ernährungszwecke erlauben.

Die Metaboliten-Analysen sollen für Niedrig-Sinapin-Rapslinien durchgeführt werden, die samenspezifisch das Enzym UDP-Glucose:Sinapat-Glucosyltransferase (SGT; *UGT84A9i*) supprimieren bzw. synchron die Gene für SGT und das Enzym Sinapoylglucose:Cholin-Sinapoyltransferase (SCT) - *UGT84A9i/BnSCTi*. Außerdem wurden Rapslinien untersucht, die samenspezifisch eine Sinapinesterase (SCE) überexprimieren und gleichzeitig das Gen für die SGT supprimieren - *UGT84A9i/BnSCE3OE*.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Pflanzen

Die Suppression von UGT84A9 (BnSGT1) durch RNAi wurde mit der Sommerrapssorte *B. napus* L. cv. Drakkar durchgeführt. Die *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformation, Selektion und Pflanzenregeneration bis zur T4-Generation wurde von A. Hüsken (Georg-August-Universität Gießen) durchgeführt (Hüsken et al., 2005).

Die simultane Suppression von UGT84A9 und BnSCT durch RNAi wurde mit der Sommerrapssorte *B. napus* L. cv. Lisora durchgeführt. Die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation wurde durch das Saatenunion-Resistenzlabor in Leopoldshöhe von Dr. Orsini durchgeführt. Die Selektion und Pflanzenregeneration bis zur T3-Generation wurde von J. Mittasch am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie in Halle (Saale) vorgenommen.

Für die Überexpression der BnSCE3 diente die Sommerrapssorte *B. napus* L. cv. Lisora. Die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation wurde ebenfalls durch das Saatenunion-Resistenzlabor in Leopoldshöhe durchgeführt und die Selektion und Pflanzenregeneration bis zur T3-Generation wurde von K. Clauß am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie in Halle (Saale) vorgenommen.

Die simultane Suppression von UGT84A9 und Überexpression von BnSCE3 wurde durch Kreuzung der entsprechenden Eltern erreicht. Dies wurde am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie von J. Mittasch und K. Clauß durchgeführt. Die daraus entstandene uniforme F1-Generation wurde einer umfassenden Metabolitenanalyse unterzogen.

2.1.2 Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Chemikalien von folgenden Firmen bezogen.

Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Methanol, Acetonitril, n-Hexan, Wasser, Trichlormethan (alles HPLC-grade), Essigsäure (100 %, p. a.), Salzsäure (37 % p. a.), SDS (≥99 %), D (-) Fructose (99,5 %)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, St. Gallen, Schweiz)

ortho-Phosphorsäure (85 %, p. a.), Phenyl- β -D-glucopyranosid (≤ 98 %), TFA (HPLC-grade), Saccharose, MOA, MSTFA, Pyridin ($\leq 99,8$ %, p. a.)

Methanol, Wasser, Wasser mit 0,1 % Ameisensäure, Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure, Methanol mit 0,01 % Ammoniumacetat, Wasser mit 0,01 % Ammoniumacetat (alles LC-MS-grade),

Phenylalanin-d₅, Leucin-d₃, Glutaminsäure-d₃, Glucose-d₇, Phenyl- β -D-glucopyranosid, Ribitol, n-Alkane, Sinapinsäure (≥ 99 %, HPLC-grade)

Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)

Aceton, Ethylacetat, Natriumchlorid, Ameisensäure (alles p. a.), Kaliumhydroxid, D(+)-Glucose, Anissäure (p.a.), Indikatorpapier (pH 1-14)

Destilliertes Wasser wurde aus einem Milli-Q PLUS Ultra Water System (Millipore Corp., Billerica, Massachusetts, USA) genutzt.

2.1.3 Geräte

Zentrifugen	Zentrifuge 5810R (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland), Zentrifuge 5417R (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland), Zentrifuge 5415R (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland),
Vakuum- konzentrator	Konzentrator RVC-2-18 (Martin Christ GmbH, Osterode, Deutschland), Concentrator 5301 (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland), Buchi Rotavapor RE-11 (BÜCHI Labortechnik GmbH, Essen, Deutschland)
Kugelmühle	MM 400 (Retsch, Haan, Deutschland)
Thermomixer	Thermomixer Comfort (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
UPLC	ACQUITY UPLC System bestehend aus Binary Solvent Manager, Sample Manager und PDA Detektor (Waters Corp., Milford, Massachusetts, USA)
HPLC	HPLC-Separations-Modul 2695 mit PDA Detektor 2996 (Waters Corp., Milford, Massachusetts, USA)
Massen- spektrometer	MicrOTOF-Q Hybrid Quadropole Time-of-Flight MS mit einer Apollo II Electrospray-Quelle (Bruker Daltonics Inc., Billerica, Massachusetts, USA), 3200 QTRAP® LC-MS/MS-System mit einer ESI-Turbo-Spray™-Quelle (Applied Biosystems, Foster City, California, USA),

	Agilent 5975 Quadrupol Massenspektrometer (Agilent Corp., Santa Clara, California, USA), Trace DSQ Quadrupol Massenspektrometer (Fisher Scientific Inc., Pittsburgh, Pennsylvania, USA)
Gaschromatographen	Agilent 6890N Gaschromatograph (Agilent Corp., Santa Clara, California, USA), Trace GC 2000 Gaschromatograph mit einem AI/AS 3000 Autosampler (Fisher Scientific Inc., Pittsburgh, Pennsylvania, USA)
Fluoreszenzspektrophotometer	CytoFluor™ II Microwell Fluorescence Reader (PerSeptive Biosystems Inc., Framingham, Massachusetts, USA)
NIR-Spektrophotometer	NIR-Spektrophotometer Model 6500 (FOSS-NIRSystems, Inc., Rellingen, Deutschland)

Säulen für die Chromatographie

Nucleosil C ₁₈	4 mm x 250 mm; Partikelgröße 5 µm (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland)
BEH C ₁₈	2,1 mm x 50 mm, Partikelgröße 1,7 µm (Waters Corp., Milford, Massachusetts, USA)
HSS-T3 C ₁₈	1 mm x 100 mm, Partikelgröße 1,8 µm (Waters Corp., Milford, Massachusetts, USA)
ZB-5MS	30 m x 0,25 mm, Filmdicke 0,25 µm, Vorsäule 10 m (Phenomenex LTD, Macclesfield, UK)
VF-5MS	30 m x 0,25 mm, Filmdicke 0,25 µm, Vorsäule 10 m (Agilent Corp., Santa Clara, California, USA)

2.2 Kultivierung

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte im Gewächshaus. Dazu wurden *B. napus*-Samen in Pflanzschalen auf eine Mischung aus Erde und Vermiculit (1:1) ausgelegt. Die Samen / Keimlinge wurden während der ersten 10 Tage mit einer Plastikhaube bedeckt. Danach wurden die Pflanzen pikiert und in Töpfe umgesetzt. Die Bedingungen im Gewächshaus waren wie folgt: 16 Stunden Licht bei 16 bis 19°C, 8 Stunden Dunkelheit bei 14 bis 17°C. Die Luftfeuchte lag bei 40 bis 70 %. Die Vermehrung der Pflanzen erfolgte durch Selbstung.

2.3 Extraktionsmethoden für pflanzliche Metabolite

2.3.1 Extraktion von Sekundärmetaboliten

2.3.1.1 Extraktionsmethoden für HPLC- und UPLC-basierte Analysen

Extraktionsmethode für lyophilisierte Samen und Keimlinge (Keimblätter) (UGT84A9i, UGT84A9i/BnSCTi)

8 mg lyophilisiertes Samenmaterial bzw. lyophilisierte Keimblätter wurde mit 200 µl Methanol/Wasser (50/50, v/v) versetzt und 10 min in einem Ultraschallbad extrahiert. Nach Zentrifugation (10 min, 11.000 g) und Überführung des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß wurde ein zweiter Extraktionsschritt mit 200 µl Methanol/Wasser (80/20, v/v) angeschlossen und die Überstände aus beiden Extraktionen vereinigt.

Extraktionsmethode für Keimlinge (Keimblätter) (UGT84A9i) des UVB-Expositionsexperimentes

Jeweils ein Keimblattpaar wurde unter ständiger Kühlung mit flüssigem Stickstoff in einer Kugelmühle (2 x 1 Minute, Frequenz 30 s⁻¹) zerkleinert (Mahlkugeln 3 mm Durchmesser, Retsch). Anschließend wurde das tiefgefrorene Pflanzenmaterial mit 300 µl Methanol/Wasser (80/20, v/v) versetzt und 5 min in einem Ultraschallbad extrahiert. Nach Zentrifugation (5 min, 11.000 g) und Überführung des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß wurde ein zweiter Extraktionsschritt mit 300 µl Methanol/Wasser (80/20, v/v) angeschlossen und die Überstände aus beiden Extraktionen vereinigt. Aufgrund des unterschiedlichen Frischgewichtes und Wasseranteils der Keimblätter wurden die Extrakte vor der Analyse auf ein einheitliches Volumen gebracht.

Extraktionsmethode für reife Samen (UGT84A9i/BnSCE3OE)

30 mg Samenmaterial wurden unter ständiger Kühlung mit flüssigem Stickstoff in einer Kugelmühle (2 x 1 Minute, Frequenz 30 s⁻¹) zerkleinert (Mahlkugeln 3 mm Durchmesser, Retsch). Anschließend wurde das tiefgefrorene Pflanzenmaterial mit 300 µl Methanol/Wasser (50/50, v/v) versetzt und 10 min in einem Ultraschallbad extrahiert. Nach Zentrifugation (10 min, 11.000 g) und Überführung des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß wurde ein zweiter Extraktionsschritt mit 300 µl Methanol/Wasser (80/20, v/v) angeschlossen und die Überstände aus beiden Extraktionen vereinigt.

Alkalische Hydrolyse (Verseifung) von methanolischen Extrakten

Zur Analyse des Gesamt-Sinapinsäureester-Gehaltes wurden 50 µl methanolischer Extrakt mit 40 µl dest. Wasser und 10 µl 10 N KOH versetzt und 3 h bei 50 °C geschüttelt. Die Lösung wurde anschließend mit 12,5 µl Essigsäure neutralisiert, mit 37,5 µl dest. Wasser verdünnt und mittels UPLC analysiert.

2.3.1.2 Extraktionsmethoden für MS-basierte Analysen

Extraktionsmethode für lyophilisierte Samen und Keimlinge (UGT84A9i, UGT84A9i/BnSCTi)

10 mg lyophilisiertes Samenmaterial wurde mit 100 µl Methanol/Wasser (50/50, v/v) versetzt und 10 min in einem Ultraschallbad extrahiert. Nach Zentrifugation (10 min, 11.000 g) und Überführung des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß wurde ein zweiter Extraktionsschritt mit 100 µl Methanol/Wasser (80/20, v/v) (inkl. 10 µM Anissäure) angeschlossen und die Überstände aus beiden Extraktionen vereinigt.

Extraktionsmethode für reife Samen (UGT84A9i/BnSCE3OE)

30 mg Samenmaterial wurden unter ständiger Kühlung mit flüssigem Stickstoff in einer Kugelmühle (2 x 1 Minute, Frequenz 30 s⁻¹) zerkleinert (Mahlkugeln 3 mm Durchmesser, Retsch). Anschließend wurde das tiefgefrorene Pflanzenmaterial mit 300 µl Methanol/Wasser (50/50, v/v) versetzt und 10 min in einem Ultraschallbad extrahiert. Nach Zentrifugation (10 min, 11.000 g) und Überführung des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß wurde ein zweiter Extraktionsschritt mit 300 µl Methanol/Wasser (80/20, v/v) (inkl. 10 µM Anissäure) angeschlossen und die Überstände aus beiden Extraktionen vereinigt.

Für beide Extraktionsprozeduren wurden die vereinigten Überstände 1:2 mit Wasser verdünnt und mittels eines 0,2 mm Polytetrafluorethylen-Filter (Whatman, Dassel, Deutschland) filtriert.

Alkalische Hydrolyse (Verseifung) von methanolischen Extrakten

Zur Analyse von HCA- und HBA-Äquivalenten wurden 50 µl methanolischer Extrakt mit 40 µl dest. Wasser und 10 µl 10 N KOH versetzt und 3 h bei 50 °C geschüttelt. Die Lösung wurde anschließend mit 12,5 µl Essigsäure neutralisiert, mit 37,5 µl dest. Wasser verdünnt und analysiert.

2.3.2 Isolierung von Zellwand-gebundenen Phenolen

Extraktionsmethode für reife Samen (UGT84A9i, UGT84A9i/BnSCTi und UGT84A9i/BnSCE3OE)

Die Prozedur basiert im Wesentlichen der von (Tan et al., 2004) veröffentlichten Vorgehensweise. Die Methode ermöglicht die sukzessive Extraktion aller nicht kovalent gebundener Inhaltsstoffe durch Einsatz von Lösungsmitteln variierender Polarität und Hydrophobizität.

Zunächst wurden 100 mg reife Samen unter ständiger Kühlung mit flüssigem Stickstoff in einer Kugelmühle mit Mahlkugeln (Durchmesser 3 mm, Retsch) bei einer Frequenz von 30 s^{-1} zweimal 1 min zerkleinert. Anschließend wurde das Samenmaterial in 15 ml Polypropylen-Gefäße überführt und zweimal mit 5 ml Methanol/Wasser (80/20, v/v) für 10 min in einem Ultraschallbad extrahiert. Nach jedem Extraktionsschritt wurde die Suspension für 15 min bei 3220 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde anschließend mit Methanol, destilliertem Wasser, 0,5 % SDS (w/v), 1 M wässrige Natriumchloridlösung, destilliertem Wasser, Methanol, Aceton und *n*-Hexan extrahiert. Jeder Extraktionsschritt wurde zweimal mit 5 mL Extraktionsmittel für 10 min in einem Ultraschallbad durchgeführt. Nach jedem Extraktionsschritt wurden die Proben bei 3220 g zentrifugiert und die Überstände wurden verworfen. Nach der letzten Extraktion wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet.

Spaltung von Zellwand-gebundenen Estern und β -Aryl Ethern

Von dem getrocknetem Pellet wurden jeweils 10 mg in Reagenzgläser überführt und mit 2 ml 1 M wässriger Natriumhydroxidlösung versetzt. Die Reagenzgläser wurden mit Gummistopfen verschlossen und für 10 min mit Stickstoff begast. Anschließend wurden die Proben für 24 Stunden bei 80 °C unter ständigem Schütteln inkubiert. Danach wurden die Proben für 15 min bei 3220 g zentrifugiert und der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der Überstand wurde mit konzentrierter Salzsäure auf den pH-Wert 3,0 eingestellt und dreimal mit 6 ml Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase aus den drei Extraktionen wurde vereinigt und mithilfe eines Rotationsverdampfers vollständig eingeeengt. Die eingeeengten Extrakte wurden in 200 μ l Methanol/Wasser (80/20, v/v) aufgenommen und in 1,5 ml Polypropylen-Reaktionsgefäße überführt und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert.

2.3.3 Extraktion von Primärmetaboliten

2.3.3.1 Extraktionsmethode für die ungerichtete Analyse

Extraktionsmethode und Derivatisierung für UGT84A9i und UGT84A9i/BnSCTi-Samen

10 mg Samenmaterial wurde unter ständiger Kühlung mit flüssigem Stickstoff in einer Kugelmühle mit Mahlkugeln (Durchmesser 3 mm, Retsch) bei einer Frequenz von 30 s^{-1} zweimal 1 Minute zerkleinert. Anschließend wurde das tiefgefrorene Pflanzenmaterial mit 360 μl gekühltem ($-20 \text{ }^\circ\text{C}$) Methanol versetzt, welcher als Standardsubstanzen je $0,16 \text{ mg ml}^{-1}$ Ribitol und Phenylalanin- d_5 enthielt. Die Proben wurden für 15 min bei $70 \text{ }^\circ\text{C}$ in einem Thermomixer bei 100 rpm geschüttelt, wobei sie nach einer Minute kurz belüftet wurden. Nach einer 10-minütigen Abkühlphase wurden 200 μl Trichlormethan hinzugegeben und die Proben wurden 5 min bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ in einem Thermomixer bei 1000 rpm geschüttelt. Anschließend wurden 400 μl Wasser hinzugefügt und die Proben 7 min bei 16.100 g zentrifugiert. Von der oberen, polaren Phase wurde 25 μl in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 20 μl einer Standardlösung (je $0,05 \text{ mg ml}^{-1}$ Leucin- d_3 , Glutaminsäure- d_3 und Glucose- d_7) vereinigt und in einem Vakuumkonzentrator bis zur vollständigen Trockene eingengt.

Die Derivatisierung der eingengten Metabolitenfraktion erfolgt durch Zugabe von 30 μl MOA (20 mg ml^{-1} in Pyridin) und starkem Schütteln für 1,5 Stunden bei $40 \text{ }^\circ\text{C}$ in einem Thermomixer bei 1000 rpm. Danach wurden 60 μl MSTFA und 10 μl einer Retentionsindex-Markerlösung (n-Alkane; je $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ in Hexan; Decan, Dodecan, Pentadecan, Nonadecan, Docosan, Octacosan, Dotricontan) hinzugefügt und die Proben 45 min bei $40 \text{ }^\circ\text{C}$ in einem Thermomixer bei 1000 rpm geschüttelt. 80 μl des derivatisierten Pflanzenextraktes wurde in ein Glas-Vial überführt und analysiert.

Extraktionsmethode und Derivatisierung für UGT84A9i/BnSCE3OE-Samen

Die Analyse von Primärmetaboliten der Linien *UGT84A9i/BnSCE3OE* und des entsprechenden Wildtyps wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. J. Kopka vom Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie in Postdam / Golm durchgeführt.

20 mg lyophilisiertes, zerkleinertes Pflanzenmaterial wurde mit 360 μl gekühltem Methanol (-20°C) versetzt und für 15 min bei 70°C schüttelnd inkubiert. Nach einer 10-minütigen Abkühlphase wurden 200 μl Trichlormethan hinzugegeben und die Proben wurden nochmals 5 min bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurden 400 μl bidest. Wasser hinzugefügt und die Proben 5 min bei 16.000 g zentrifugiert. Von der oberen, polaren Phase wurden zweimal 80 μl in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch Vakuumzentrifugation eingengt.

Die Derivatisierung der eingeeengten Metabolitenfraktion erfolgt durch Zugabe von 40 μl MOA (20 mg ml^{-1} in Pyridin) und starkem Schütteln für 1,5 Stunden bei 30 °C. Danach wurden 70 μl MSTFA und 10 μl einer Retentionsindex-Markerlösung (n-Alkane; je $0,22 \text{ mg ml}^{-1}$ in Pyridin; Decan, Dodecan, Pentadecan, Octadecan, Nonadecan, Docosan, Octacosan, Dotricontan, Hexatricontan) hinzugefügt und die Proben 30 min bei 37°C derivatisiert. 80 μl des derivatisierten Pflanzenextraktes wurde in ein Glas-Vial überführt und analysiert.

2.3.3.2 Extraktionsmethode für die zielgerichtete Analyse

Extraktionsmethode und Derivatisierung für UGT84A9i- und UGT84A9i/BnSCTi-Samen

Die Extraktion des Samenmaterials und die Derivatisierung der Extrakte wurden analog zu den Angaben in Kapitel 2.3.3.1 durchgeführt. Allerdings wurde auf die Zugabe der Standards Ribitol, Phenylalanin- d_5 , Leucin- d_3 , Glutaminsäure- d_3 , Glucose- d_7 und die Retentionsindex-Markerlösung verzichtet. Stattdessen wurde als interner Standard Phenyl- β -D-glucopyranosid verwendet, welcher dem ersten Extraktionsmittel zugesetzt wurde.

2.4 Chromatographie

2.4.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC)

2.4.1.1 Methodik für die Analyse von Sinapinsäureestern und Flavonoiden

Die chromatographische Analyse erfolgte mit einem Waters Alliance 2695 Separations-Modul mit UV/VIS-Detektor. Die Aufnahme der UV/VIS-Spektren erfolgte über den Wellenlängenbereich von 210 nm bis 500 nm.

Ein Probenvolumen von 20 µl wurde über eine Nucleosil C₁₈-Säule aufgetrennt. Eluiert wurde im Gradientenmodus mit dem Laufmittelsystem 1,5 % (v/v) Phosphorsäure in Wasser (A) und Acetonitril (B) bei einer Flussrate von 1 ml min⁻¹ und einer Säulentemperatur von 25 °C. Der Gradient ist in Tabelle 2-1 dargestellt. Die Datenaufnahme und Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit der Software Empower 2.0.

Tabelle 2-1: Gradient für die RP-HPLC-Trennung von Phenylpropanderivaten für die Analyse von Sinapinsäureestern und Flavonoiden. Laufmittel A: 1,5 % (v/v) Phosphorsäure in Wasser, Laufmittel B: Acetonitril.

Zeit (min)	% A	% B
0	90	10
40	60	40
41	10	90
43	10	90
45	90	10
60	90	10

Für die Analyse der Extrakte aus Keimblättern des UVB-Experimentes (*UGT84A9i*) wurden Flavonoide entweder als Quercetin- oder Kämpferolderivate identifiziert und für die Auswertung in diese beiden Kategorien unterteilt. Eine Differenzierung von Quercetin- und Kämpferolderivaten ist durch ihre UV-Spektren möglich. In methanolischen Lösungen besitzt das UV-Spektrum von Quercetinderivaten ein erstes Absorptionsmaximum bei etwa 255 nm mit einer charakteristischen Schulter bei etwa 269 nm. Kämpferolderivate mit einem Absorptionsmaximum bei ca. 266 nm weisen diese Schulter nicht auf (Markham 1989). Sinapinsäureester hingegen zeigen Absorptionsmaxima bei 265 nm und 330 nm.

2.4.2 Ultrahochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (RP-UPLC)

2.4.2.1 Methodik für die Quantifizierung von Sinapinsäureestern

Die chromatographische Analyse erfolgte mit einem Waters ACQUITY UPLC-System. Die Aufnahme der UV/VIS-Spektren erfolgte über den Wellenlängenbereich von 210 nm bis 500 nm.

Ein Probenvolumen von 3 µl wurde über eine BEH C₁₈-Säule aufgetrennt. Eluiert wurde im Gradientenmodus mit dem Laufmittelsystem 0,1 % (v/v) TFA in Wasser (A) und 98 % (v/v) Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA (B). Der Gradient ist in Tabelle 2-2 dargestellt. Die Flussrate betrug 500 µl min⁻¹ und die Säulentemperatur 40°C.

Datenaufnahmen und Auswertung erfolgten mit der Software Empower 2.0. Die Metabolite Sinapin, Sinapoylglucose und Sinapoylmalat wurden anhand von Eichkurven authentischer Standards bei einer Wellenlänge von 330 nm quantifiziert. Die Analyse des verseiften methanolischen Extraktes liefert den Gesamt-Sinapinsäureester-Gehalt ausgedrückt in Sinapinsäure-Äquivalenten. Als Referenzstandards für die Quantifizierung wurde eine Mischung aus Sinapin, Sinapinsäure und Sinapoylglucose verwendet, die ebenfalls verseift wurde. Auch hier erfolgte die photometrische Detektion bei 330 nm. Die Differenz aus Gesamt-Sinapinsäureester-Gehalt (nmol/mg Frischgewicht) und Sinapin (nmol/mg Frischgewicht) ergibt „restliche Sinapinsäureester“. Die Datenaufnahme und Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit der Software Empower 2.0.

Tabelle 2-2: Gradient für die RP-UPLC-Trennung von Phenylpropanderivaten für die Quantifizierung von Sinapinsäureestern. Laufmittel A: 0,1 % (v/v) TFA in Wasser, Laufmittel B: 98 % (v/v) Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA.

Zeit (min)	% A	% B
0,0	95	5
0,5	95	5
1,8	73	27
2,0	5	95
3,4	5	95
3,6	95	5
5,0	95	5

2.5 Massenspektrometrie

2.5.1 Methodik für die ungerichtete Analyse von Sekundärmetaboliten mittels RP-UPLC-ESI-QqTOF-MS

Für die ungerichtete Analyse von Sekundärmetaboliten erfolgte die on-line-Kopplung eines ACQUITY UPLC-Systems zu einem MicrOTOF-Q Hybrid Quadropole Time-of-Flight-Massenspektrometer.

Ein Probenvolumen von 3.1 µl wurde über eine HSS-T3 C₁₈-Säule aufgetrennt. Eluiert wurde im Gradientenmodus mit dem Laufmittelsystem 0,1 % (v/v) Ameisensäure in Wasser (A) und 0,1 % (v/v) Ameisensäure in Acetonitril (B). Der Gradient ist in Tabelle 2-3 dargestellt. Die Flussrate betrug 150 µl min⁻¹ und die Säulentemperatur 40 °C.

Tabelle 2-3: Gradient für die RP-UPLC-Trennung von Phenylpropanderivaten für die ungerichtete Analyse von Sekundärmetaboliten. Laufmittel A: 0,1 % (v/v) Ameisensäure in Wasser, Laufmittel B: 0,1 % (v/v) Ameisensäure in Acetonitril.

Zeit (min)	% A	% B
0,0	95	5
1,0	85	15
7,0	55	45
7,5	45	55
8,0	5	95
11,0	5	95
11,5	95	5
14,0	95	5

Die Detektion der eluierten Komponenten erfolgte im *m/z*-Massenbereich von 100-1000. Die Messungen erfolgten im positiven Modus mit folgenden Einstellungen: Sprühgas, Stickstoff, 1,6 bar; Verdampfungsgas, Stickstoff, 6 l min⁻¹, 190°C; Kapillarspannung, 25500 V (+4000 V); Endplattenkompensation, 2500 V; Radiofrequenz des 1. Trichters, 200 V; Radiofrequenz des 2. Trichters, 200 V; Stoßenergie der Quelle, 0 V; Radiofrequenz des Hexapols, 100 V; Ionenenergie des Quadrupol, 5 eV; Stoßgas, Argon; Stoßenergie, 10 eV; Stoßradiofrequenz 200/400 V (Intervall 50/50); Verweildauer, 70 ms; Vorpulsspeicherung, 5 ms; Frequenz der Pulse, 10 kHz; Datenpunktfolge, 3 Hz. Die interne Kalibrierung jedes Laufes erfolgte stets nach 12 min mit je 20 µl 10 mM Lithiumformiat in einem Isopropanol-Wasser Gemisch (1:1 v/v). Die Quantifizierung der Metabolite erfolgte mit der Geräteherstellersoftware QuantAnalysis.

2.5.2 Methodik für die zielgerichtete Analyse von Sekundärmetaboliten mittels RP-UPLC-ESI-QqLIT-MS/MS

Für die zielgerichtete Analyse von Sekundärmetaboliten erfolgte die on-line-Kopplung eines ACQUITY UPLC-Systems zu einem 3200 QTRAP® LC-MS/MS-System.

Ein Probenvolumen von 2 µl wurde über eine BEH C₁₈-Säule aufgetrennt. Eluiert wurde im Gradientenmodus mit dem Laufmittelsystem 0,1 % (v/v) Ameisensäure in Wasser und 0,1 % (v/v) Ameisensäure in Acetonitril. Der Gradient ist in Tabelle 2-4 dargestellt. Die Flussrate betrug 400 µl min⁻¹ und die Säulentemperatur 40 °C.

Tabelle 2-4: Gradient für die RP-UPLC-Trennung von Phenylpropanderivaten für die zielgerichtete Analyse von Sekundärmetaboliten. Laufmittel A: 0,1 % (v/v) Ameisensäure in Wasser, Laufmittel B: 0,1 % (v/v) Ameisensäure in Acetonitril.

Zeit (min)	% A	% B
0,0	95	5
0,5	85	15
1,2	80	20
3,2	70	30
3,4	5	95
4,1	5	95
4,3	95	5
5,0	95	5

Die Messungen erfolgten im positiven Modus und die Geräteeinstellungen und die Prozessüberwachung wurde mithilfe der Firmsoftware Analyst 1.5 durchgeführt. Folgende ESI-Einstellungen wurden verwendet: Ionensprayspannung, 3500 V; Sprühgas, Stickstoff, 45 psi; Temperatur der Quelle, 650°C; Verdampfungsgas, Stickstoff, 70 psi; Blendengasdruck, Stickstoff, 35 psi.

Für die MRM-Scans wurde folgende Einstellungen verwendet: Zerstäubungspotenzial 20 V; Eintrittspotenzial 6 V; Austrittspotenzial 1,5 V; Stoßgasdruck, 5 psi. Anhand von EPI-Experimenten wurden individuelle Stoßenergien für jeden Übergang festgelegt. Die Q1- und Q3-Auflösung wurde in der unit-Einstellung betrieben. Verweilzeiten wurden automatisch mit der Gerätefunktion „scheduled MRM“ festgelegt, deren Messfenster 60 Sekunden mit einer Scanzeit von 3 Sekunden betrug. In die MRM-Methode wurden 83 Metabolite integriert. Die detaillierten Angaben zu den verwendeten Übergängen, Kollisionsenergien und Retentionszeiten pro Metabolit finden sich im Anhang in Tabelle 6-13.

Vor Beginn einer Messreihe wurden die Geräteeinstellungen und die Kalibrierung mit 100 µM Polypropylenglycol überprüft. Die Integration der Peaks erfolgte nach

Datenaufnahme mit der Geräteherstellersoftware Analyst 1.5. Die Rohdaten wurden anschließend mit dem Programm R statistisch ausgewertet.

Entwicklung der MRM-Methode

Für die zielgerichtete Analyse wurde eine MRM-Methode entwickelt, die auf den Ergebnissen der ungerichteten Metabolitenanalyse basierte. Es wurden 83 der 110 Sekundärmetabolite (überwiegend Phenylpropanderivate, einige Flavonoide) in die MRM-Methode integriert. Zunächst wurden die chromatographischen Parameter der ungerichteten Metabolitenanalyse mittel RP-UPLC-QqTOF-MS auf das vorhandene System übertragen (identische(r) Laufmittel, Säule, Gradient) und die Identifizierung der Metabolite wurde für reife Samen durch Aufnahme und Auswertung von EMS- und EPI-Scans verifiziert. Um die MRM-Methode für einen hohen Probendurchsatz zu optimieren, wurde anschließend der 14-minütige Gradient auf 5 min verkürzt. Die LIT-Experimente zur Aufnahme von EMS (enhanced MS) und EPI (enhanced product ions)-Scans wurden mit folgenden Einstellungen durchgeführt:

14 min Gradient:

EMS: Ionensprayspannung 5500 V; Sprühgas, Stickstoff, 55 psi; Temperatur der Quelle 550 °C; Verdampfungsgas, Stickstoff, 40 psi; Blendengasdruck, Stickstoff, 30 psi; Zerstäubungspotenzial 55 V; Eintrittspotenzial 6 V; Stoßenergie 5 eV; Stoßgasdruck, 3 psi; Scanrate 4000 Da s⁻¹.

EPI: Ionensprayspannung 5500 V; Sprühgas, Stickstoff, 30 psi; Temperatur der Quelle 550 °C; Verdampfungsgas, Stickstoff, 30 psi; Blendengasdruck, Stickstoff, 35 psi; Zerstäubungspotenzial 35 V; Eintrittspotenzial 6 V; Stoßenergie 20 bis 60 eV; Stoßgasdruck, 3 psi; Scanrate 4000 Da s⁻¹.

5 min Gradient:

EMS: Ionensprayspannung 3500 V; Sprühgas, Stickstoff, 45 psi; Temperatur der Quelle 550 °C; Verdampfungsgas, Stickstoff, 70 psi; Blendengasdruck, Stickstoff, 45 psi; Zerstäubungspotenzial 20 V; Eintrittspotenzial 6 V; Stoßenergie 5 eV; Stoßgasdruck, 3 psi; Scanrate 1000 Da s⁻¹.

EPI: Ionensprayspannung 3500 V; Sprühgas, Stickstoff, 40 psi; Temperatur der Quelle 550 °C; Verdampfungsgas, Stickstoff, 40 psi; Blendengasdruck, Stickstoff, 25 psi; Zerstäubungspotenzial 20 V; Eintrittspotenzial 6 V; Stoßenergie 20 bis 60 eV; Stoßgasdruck, 3 psi; Scanrate 1000 Da s⁻¹.

EMS-Scans wurden üblicherweise mit der unit-Einstellung durchgeführt.

Für jeden Metaboliten wurde ein charakteristisches Fragmentation sowie die optimale Kollisionsenergie ausgewählt und in einer „Scheduled Multiple Reaction Monitoring“ (MRM)-Methode mit den oben genannten Einstellungen zusammengefasst.

2.5.3 Methodik für die zielgerichtete Analyse von Zellwand-gebundenen Phenolen sowie HCA- und HBA-Äquivalenten mittels RP-UPLC-ESI-QqLIT-MS/MS

Für die zielgerichtete Analyse von Zellwand-gebundenen Phenolen und HCA- und HBA-Äquivalenten erfolgte die on-line-Kopplung eines ACQUITY UPLC-Systems zu einem 3200 QTRAP® LC-MS/MS-System.

Ein Probenvolumen von 1 µl wurde über eine HSS T3 C₁₈ Säule aufgetrennt. Eluiert wurde im Gradientenmodus mit dem Laufmittelsystem 0,01 % (v/v) Ammoniumacetat in Wasser (A) und 90 % (v/v) wäss. Methanol mit 0,01 % (v/v) Ammoniumacetat (B). Der pH-Wert des Laufmittels wurde mit Ammoniumhydroxid auf 4.0 eingestellt. Der Gradient ist in Tabelle 2-5 dargestellt. Die Flussrate betrug 150 µl min⁻¹ und die Säulentemperatur 50 °C.

Tabelle 2-5: Gradient der chromatographischen Trennung von Zellwand-gebundenen Phenolen. Laufmittel A: Wasser mit 0,01 % (v/v) Ammoniumacetat, Laufmittel B: 90 % (v/v) wäss. Methanol mit 0.01 % (v/v) Ammoniumacetat.

Zeit (min)	% A	% B
0,0	96	4
1,0	96	4
7,0	60	40
13,5	20	80
14,0	0	100

Die Messungen erfolgten im negativen Modus und die Geräteeinstellungen und die Prozessüberwachung wurde mithilfe der Geräteherstellersoftware Analyst 1.5 (AB Sciex, Darmstadt) durchgeführt. Folgende ESI-Einstellungen wurden verwendet: Ionensprayspannung -2100 V; Sprühgas, Stickstoff, 40 psi; Temperatur der Quelle, 550°C; Verdampfungsgas, Stickstoff, 40 psi; Blendengasdruck, Stickstoff, 25 psi.

Für die zielgerichtete Analyse wurde eine „Information Dependent Acquisition“ (IDA)-Methode eingesetzt mit MRM-Scans als „Survey“ und EPI-Scans als „Dependent“.

Für MRM-Scans wurden folgende Einstellungen verwendet: Zerstäubungspotenzial -35 V; Eintrittspotenzial -7 V; Austrittspotenzial -2 V. Die Verweilzeiten wurden automatisch durch Auswahl der Option „scheduled MRM“ festgelegt. Das Messfenster betrug 60 Sekunden und die Scanzeit 3 Sekunden.

Für EPI-Scans wurden folgende Einstellungen verwendet: Zerstäubungspotenzial -20 V; Stoßgasdruck, Stickstoff, 5 psi, Eintrittsbarriere 8 V. Die Stoßenergie wurde auf -35 eV mit einer Spanne von -15 eV festgelegt. Die Scanrate betrug 4000 Da s^{-1} mit automatischer Festlegung der Verweilzeiten.

Die Integration der Peaks erfolgte nach Datenaufnahme mit der Gerätehersteller-Software Analyst 1.5. Die Rohdaten wurden anschließend mit dem Programm R statistisch ausgewertet.

Die Entwicklung der IDA-Methode zur zielgerichteten Analyse erfolgte durch Dr. Andrej Frolov (Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle (Saale)). Die detaillierten Angaben zu den verwendeten MRM-Übergängen, Kollisionsenergien und Retentionszeiten pro Metabolit finden sich im Anhang in Tabelle 6-14.

2.5.4 Methodik für die ungerichtete Analyse von Primärmetaboliten mittels GC-EI-MS

Analyse von UGT84A9i- und UGT84A9i/BnSCTi-Samen

Die chromatographische Trennung der Metabolite erfolgte mit einem Agilent 6890N Gaschromatographen. Es wurden deaktivierte Standard-Split/Splitless-Liner verwendet. $1 \mu\text{l}$ der derivatisierten Probe wurde nach splittloser Injektion bei $250 \text{ }^\circ\text{C}$ an einer Phenomenex ZB-5MS-Kapillarsäule bei konstantem Fluss von 1 ml min^{-1} Helium aufgetrennt. Zur Probeninjektion wurde ein 7683 B Series Injector genutzt. Der Temperaturgradient des Säulenofens ist in Tabelle 2-6 beschrieben.

Tabelle 2-6: Temperaturgradient für GC-MS Analyse von Primärmetaboliten.

Zeit (min)	Temperatur $^\circ\text{C}$
0	60
1	60
25	300
30	300
35	325

Die Detektion erfolgte mit einem Agilent 5975 Quadrupol Massenspektrometer bei einer Scanrate von 3 s^{-1} im Massenbereich von m/z 50-600 nach Elektronenstoßionisierung bei 70 eV und einem „Solvent Delay“ von 7 min. Die Transferline-Temperatur betrug $280 \text{ }^\circ\text{C}$ und die Temperatur der Ionenquelle $230 \text{ }^\circ\text{C}$. Die Prozessüberwachung und Datenaufnahme wurde mithilfe der Firmsoftware MSD Chem Station D.020.00.275 durchgeführt.

Die Annotation der Peaks erfolgte mithilfe der Software AMDIS (Stein 1999), NIST02 (<http://chemdata.nist.gov/>), TagFinder (Lüdemann et al., 2008) und der Golm

Metabolom Datenbank (GMD; Kopka et al., 2005), die eine Identifizierung von Peaks anhand ihrer Retentionszeitindices (RI) ermöglicht (Schauer et al., 2005). Nach erfolgreicher Peak-Annotation wurde pro Metabolit ein charakteristisches Fragment zur Quantifizierung ausgewählt. Eine Zusammenfassung der identifizierten Metabolite und der verwendeten charakteristischen Fragmente ist im Anhang in Tabelle 6-15 zu finden.

Analyse von UGT84A9i/BnSCE30E-Samen

Die Analyse der GC-TOF-MS-Daten wurde wie in (Allwood et al., 2009) beschrieben vorgenommen. Zur chromatografischen Trennung wurde jedoch eine Varian VF-5MS-Trennsäule genutzt. Die Peakintensitäten der Massenfragmente wurden auf das Probenfrischgewicht und den internen RI-Standard Sorbitol-C13 normiert.

Die Annotation der Peakidentitäten erfolgte mittels TagFinder (Lüdemann et al., 2008) und der Retentionszeitenindex (RI)-Kollektion (Schauer et al., 2005) der Golm Metabolom Datenbank (GMD; Kopka et al., 2005).

2.5.5 Methodik für die zielgerichtete Analyse von Primärmetaboliten mittels GC-EI-MS

Die chromatographische Trennung der Metabolite erfolgte mit einem Trace GC 2000-Gaschromatographen und einem AI/AS 3000 Autosampler. Es wurden deaktivierte Standard-Split/Splitless-Liner verwendet. 1 µl der derivatisierten Probe wurde nach splittloser Injektion bei 220 °C an einer Phenomenex ZB-5MS-Kapillarsäule bei konstantem Fluss von 1 ml min⁻¹ Helium aufgetrennt. Der Temperaturgradient entspricht den Angaben in Tabelle 2-6.

Die Detektion der gaschromatographisch getrennten Metabolite erfolgte mit einem Trace DSQ Quadrupol-Massenspektrometer. Die Detektion der Metabolite erfolgte im SIM-Modus mit einer Fenstergröße von 1,4 Da nach Elektronenstoß-Ionisierung bei 70 eV, einem „Solvent Delay“ von 6 min und einer Transferline-Temperatur von 290 °C mit folgenden Parametern: Fructose *m/z* 306 bei 18,06 min; Glucose *m/z* 318 bei 18,48 min; Saccharose *m/z* 360 bei 30,76 min; Phenyl-β-D-glucopyranosid *m/z* 360 bei 25,63 min. Die Prozessüberwachung und Datenaufnahme wurde mithilfe der Firmensoftware Xcalibur 1.4.1 durchgeführt.

Die Quantifizierung der Metabolite Glucose, Fructose und Saccharose erfolgte mit der Methode des internen Standards, wobei Phenyl-β-D-glucopyranosid als interner Standard verwendet wurde (Willis 1972). Die Integration der Peaks erfolgte mit der Xcalibur 1.4.1 Software. Die Daten wurden anschließend exportiert und statistisch analysiert.

2.6 UVB-Stress-Applikation

Um die Auswirkung erhöhter UVB-Strahlung auf *UGT84A9i*-Rapskeimlinge zu untersuchen, wurden Rapssamen der entsprechenden Linien unter UVB-Einstrahlung angezogen und deren Keimblätter wurden einer Metabolitenanalyse unterzogen. Die Durchführung dieses Experimentes erfolgte am GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit in München in speziellen Versuchskammern der Abteilung „Experimentelle Umweltsimulation“ unter Anleitung von Dr. Andreas Albert. Zur genauen Untersuchung des Einflusses von UVB-Strahlung auf die Keimung und Keimlingsentwicklung erfolgte die Anzucht der Pflanzen in einem „Sonnensimulator“. Dort erfolgt die Keimung und Keimlingsentwicklung unter definierten Bedingungen (Licht, Temperatur, Feuchte, UV-Einstrahlung). Durch die Kombination verschiedener Lampen (Metallhalogenidlampen, Halogenlampen, blaue Leuchtstoffröhren und zusätzliche UVB-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 starkem Wasserfilter entfernt. Entsprechend der stratosphärischen Ozonschicht kann die UVB-Strahlung durch Verwendung von Glas- bzw. Kunststofffiltern angepasst oder auch vollständig ausgeschlossen werden. Die Kombination verschiedener Filter ermöglicht die Regulation der UVB-Strahlung und die Simulation verschiedener Ozonschichtdichten (Döring 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 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR für 14 Stunden (33,8 $\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1}$ PAR). PAR definiert die photosynthetisch aktive Strahlung zwischen 400 nm und 700 nm, UVA-Strahlung zwischen 315 nm und 400 nm und UVB-Strahlung zwischen 280 nm und 315 nm. Die UVB-Strahlung betrug 1,3 W m^{-2} für 12 Stunden (55,1 $\text{kJ m}^{-2} \text{d}^{-1}$ UVB). Die Kontrollpflanzen (-UVB) wurden ebenfalls in der Sonnensimulationskammer unter gleichen Bedingungen, jedoch ohne UVB-Strahlung, kultiviert. Ein Fensterglasfilter (Dicke: 8 mm) absorbierte die UVB-Strahlung. Pflanzenmaterial von 4, 8, 11 und 16 Tage alten Keimlingen wurde in die entsprechenden Pflanzenteile separiert und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert.

2.7 Cholinquantifizierung

Die Quantifizierung von freiem Cholin von reifen Samen erfolgte mit dem Cholin/Acetylcholin-Quantifizierungs-Kit der Firma BioCat (Heidelberg, Deutschland) entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Dazu wurden 20 Samen mit einem

Pistill in einem Mörser unter ständiger Kühlung mit flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemahlen. Anschließend wurden 100 µl Pufferlösung zu 5 mg Samenmaterial gegeben und die Probe wurde 10 min in einem Ultraschallbad inkubiert. Nach Zentrifugation für 2 min bei 11.000g wurden 10 µl des Überstandes zum bereitgestellten Reaktionsmix gegeben. Nach 30 min Inkubation (lichtgeschützt) wurde die Fluoreszenz der Probe (Ex/Em 535/590 nm) mit einem CytoFluor™ II Microwell Fluorescence Reader gemessen. Anhand einer parallel aufgenommenen Cholin-Standardkurve wurde der Gehalt an freiem Cholin quantifiziert.

2.8 NIRS-Analysen

NIRS-Analysen an reifen Rapssamen wurden durchgeführt, um wichtige agronomische Merkmale zu bestimmen. Dies wurde nur für die Linien *UGT84A9i* und *UBT84A9i/BnSCTi* sowie deren Wildtypen durchgeführt. Die NIRS-Messungen erfolgten an der Justus-Liebig Universität Gießen durch die Arbeitsgruppe von Prof. W. Friedt. Für die Analysen wurden intakte, reife Samen mit einem NIR-Spektrophotometer Model 6500 untersucht. Die NIRS-Spektren wurden einem Wellenlängenbereich von 400 nm bis 2500 nm im Abstand von 2 nm aufgenommen. Jede Probe wurde viermal gemessen und die Spektren wurden als Mittelwert von 32 Scans erhalten. Die Kalibrierung und Validierung der Methode wurde wie in (Font et al., 2005) beschrieben durchgeführt.

2.9 Chemometrische Analyse

Alle in der Arbeit angewendeten statistischen Berechnungen erfolgten mit dem Statistikprogramm R (<http://www.R-project.org>). Eine Übersicht zur Anzahl der untersuchten biologischen Replikate für alle Rapslinien und untersuchten Metabolite ist dem Anhang zu entnehmen (Tabelle 6-16, Tabelle 6-17, Tabelle 6-18).

2.9.1 Statistische Analysen für *UGT84A9i*-Pflanzenmaterial

Um statistisch gesicherte Ergebnisse hinsichtlich Veränderungen im Metabolitenprofil von *UGT84A9i*-Rapslinien zu erhalten, wurden zwei unabhängige Rapslinien (*UGT84A9i* (1) und (2)) sowie der entsprechende Wildtyp analysiert. Um saisonale und generationsspezifische Effekte zu vermeiden, wurden beide *UGT84A9i*-Rapslinien je zweimal kultiviert (Generation T7 und T8) und das geerntete Samenmaterial (Stadien A, B, C, D) bzw. die Keimblätter (2d, 4d, 7d, 10d, 14d) anschließend untersucht.

Für statistische Untersuchungen wurden für jeden Metaboliten zunächst die Normalverteilungsannahme der erhaltenen Messwerte mit dem Shapiro-Wilk-Test

und die Varianzhomogenität mit dem Fligner-Killeen-Test überprüft. Bei Einhaltung dieser zwei Kriterien wurde für jede Kultivierung eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA mit einem festen Effekt) durchgeführt. Falls für beide Kultivierungen ein signifikanter Unterschied feststellbar war, wurde der Tukey-HSD-Test als *post hoc*-Test eingesetzt (Signifikanzniveau 5 %). Hierbei wurden pro Kultivierung zwei Tests durchgeführt: Wildtyp gegen *UGT84A9i* (1) sowie Wildtyp gegen *UGT84A9i* (2). Für den Fall, dass Messwerte nicht der Normalverteilung entsprachen, wurde der Kruskal-Wallis-Test als Pendant zur ANOVA durchgeführt. Bei Vorhandensein signifikanter Unterschiede wurde der Nemenyi-Test als *post hoc*-Test eingesetzt.

Wurde für beide Kultivierungen und beide *UGT84A9i*-Linien ein signifikanter Unterschied im Vergleich zum Wildtyp festgestellt, so wurde weiterhin überprüft, ob die Konzentrationsänderung mindestens dem Faktor 2 entsprach. Wenn diese zusätzliche Bedingung erfüllt war, wurde der Unterschied als signifikant bewertet. Bei der Bewertung der Veränderungen von Zellwand-gebundenen Phenolen und HCA- sowie HBA-Äquivalenten wurde diese zusätzliche Bedingung nicht überprüft.

Im Anschluss daran wurden je untersuchtem Entwicklungsstadium und quantifiziertem Metaboliten die vier Einzelwerte, die das Verhältnis der Metaboliten-Intensität von *UGT84A9i* zu Wildtyp darstellen, durch Berechnung des Medians zu einem repräsentativen Einzelwert zusammengefasst. Diese Daten wurden anschließend für die hierarchische Clusteranalyse genutzt. Hierbei kam die Funktion „heatmap“ des R-Paketes „stats“ zum Einsatz.

Charakterisierung von 110 Metaboliten aus *UGT84A9i*- und Wildtyp-Samen

Die Charakterisierung von 110 Metaboliten basiert auf der Analyse der Samenentwicklungsstadien A, B, C und D der Linien *UGT84A9i* (1), *UGT84A9i* (2) und dem Wildtyp (Drakkar) hinsichtlich beider Kultivierungen.

Die Rohdaten wurden zunächst mit der Geräteherstellersoftware CompassXPort (Bruker Daltonic) in das Datenformat „mzData“ konvertiert und anschließend erfolgte die Prozessierung der Daten mit der Software R (www.R-project.org) unter Verwendung des Paketes „XCMS“ (Tautenhahn et al., 2008). Die Detektion chromatographischer Peaks erfolgte für jede Datei separat mithilfe des „centWave“-Algorithmus. Im Anschluss an das so genannte Peak-Picking müssen die Peaks von allen Dateien in eine Datenmatrix integriert werden, um Vergleiche zwischen verschiedenen Rapslinien zu ermöglichen. Die Gruppierung der Peaks erfolgte mithilfe der Funktionen „group“ und „retcor“. Bei der Gruppierung der Peaks kann es trotz einer durchgeführten Retentionszeit-Korrektur auch zu fehlenden Werten kommen. Diese so genannten „missing values“ wurden zunächst mittels der Funktion „fillPeaks“ komplettiert und anschließend wurden die Daten wie zuvor beschrieben

statistisch ausgewertet, um die relevanten m/z -Signale für weitere Analysen zu selektieren. Weiterhin wurden m/z -Signale gefiltert, die in allen Rapslinien innerhalb eines Entwicklungsstadiums auftraten, um eine verbesserte Charakterisierung des Metabolitenpools zu ermöglichen. Zur anschließenden Identifizierung von Quasimolekularionen und deren Fragmente wurde im nächsten Schritt das Paket „CAMERA“ der Software R eingesetzt. Mithilfe des Paketes wurden Isotopen-, Addukt- sowie typische Fragmentationen rechnerisch ermittelt und eine Korrelationsanalyse zwischen m/z -Signalen durchgeführt, um korrelierende m/z -Signale zu identifizieren. Weiterhin wurden Proben im negativen Modus gemessen. Anschließend wurden, unter Berücksichtigung der theoretischen Masse- und Ladungsunterschiede zwischen positiv aufgenommenen und negativ aufgenommenen m/z -Signalen, diejenigen gefiltert, die sowohl im positiven als auch im negativen Messmodus detektiert wurden. Für alle gefilterten m/z -Signale, die potenzielle Molekular- bzw. Quasimolekularionen darstellten, wurden Tandem-Massenspektren zur weiteren Charakterisierung aufgenommen. Nach Interpretation der somit gewonnenen Daten konnten 110 Metabolite identifiziert werden. Diese wurden nachfolgend mit der Geräteherstellere Software QuantAnalysis in den aufgenommenen Rohdaten quantifiziert und anschließend wurde die bereits erläuterte statistische Analyse wiederholt.

2.9.2 Statistische Analyse für *UGT84A9i/BnSCTi*-Pflanzenmaterial

Für die Analyse von *UGT84A9i/BnSCTi*-Pflanzenmaterial war nur eine transgene Rapslinie verfügbar. Auch diese wurde zweimal kultiviert (Generation T4 und T5) und beerntet (Samenstadien A, B, C, D sowie 2d, 4d, 7d, 10d, 14d alte Keimlinge).

Statistisch signifikant veränderte Metabolite wurden ähnlich zu der Vorgehensweise in Kapitel 2.9.1 ermittelt.

2.9.3 Statistische Analyse für *UGT84A9i/BnSCE3OE*-Pflanzenmaterial

Für die Analyse von *UGT84A9i/BnSCE3OE* wurden reifen Samen der uniformen F1-Generation sowie reife Samen der Parenteralgeneration betrachtet. Für jeden analysierten Metaboliten wurden zunächst je Linie die Normalverteilungsannahmen der erhaltenen Messwerte mit dem Shapiro-Wilk-Test und die Varianzhomogenität mit dem Fligner-Killeen-Test überprüft. Anschließend wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse mit festen Effekten durchgeführt und bei signifikantem Ergebnis wurde der Tukey-HSD-Test als *post hoc*-Test eingesetzt (Signifikanzniveau 5 %). Folgende Vergleiche wurden durchgeführt:

- Wildtyp Drakkar gegen *UGT84A9i* (1) und gegen *UGT84A9i* (2)

- Wildtyp Lisora gegen *BnSCE3OE*
- Wildtyp Drakkar gegen *UGT84A9i(1)/ BnSCE3OE* und gegen *UGT84A9i(2)/ BnSCE3OE*
- Wildtyp Lisora gegen *UGT84A9i(1)/ BnSCE3OE* und gegen *UGT84A9i(2)/ BnSCE3OE*

Falls Messwerte nicht der Normalverteilung entsprachen, wurde der Kruskal-Wallis-Test und als *post hoc*-Test der Nemenyi-Test durchgeführt.

Auch für diese Vergleiche wurde jeweils überprüft, ob die Konzentrationsänderung mindestens dem Faktor 2 entsprach. Eine Ausnahme stellt wieder die Analyse von Zellwand-gebundenen Phenolen und HCA- sowie HBA-Äquivalenten dar. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die Einzelwerte, die das Verhältnis der Metaboliten-Intensität von *UGT84A9i* zu Wildtyp bzw. *UGT84A9i/ BnSCE3OE* zu den Wildtypen Drakkar und Lisora darstellen, durch Berechnung des Medians zu einem repräsentativen Einzelwert zusammengefasst.

3 Ergebnisse

3.1 Veränderungen des Metabolitenprofils durch samenspezifische Suppression von *UGT84A9*

Das Enzym UDP-Glucose:Sinapat-Glucosyltransferase (*UGT84A9*) katalysiert die Übertragung des Glucoserestes aus UDP-Glucose auf die Carboxylgruppe der Sinapinsäure. Der resultierende Metabolit 1-O-Sinapoylglucose dient im Stoffwechsel von Brassicaceen als Acyldonor für verschiedene Umesterungsreaktionen, durch die eine Vielfalt von Sinapinsäureestern, wie beispielsweise Sinapin, synthetisiert werden. Das Ziel der samenspezifischen dsRNA*-*vermittelten Suppression von *UGT84A9* war die Absenkung des Sinapinsäureester-Gehaltes in reifen Samen durch Konzentrationsabnahme des Acyldonors 1-O-Sinapoylglucose.

Die Erzeugung der entsprechenden transgenen *B. napus*-Pflanzen (Sorte Drakkar), für die im Folgenden der Begriff *UGT84A9i* verwendet wird, ist in der Arbeit von Hüsken et al. (2005) beschrieben. Die transgenen Pflanzen wurden bis zur vierten transgenen Generation (T4) vermehrt und in jeder Generation hinsichtlich des Sinapin- und Gesamt-Sinapinsäureester-Gehaltes analysiert und selektiert. In der T4-Generation wurde eine maximale Absenkung des Sinapin-Gehaltes auf 45 % des Wildtyp-Niveaus beobachtet. Der Gesamt-Sinapinsäureester-Gehalt ist hingegen auf 31 % reduziert. Die Arbeit von Hüsken et al. (2005) beschreibt die Erzeugung der transgenen Pflanzen und die Selektion der Transformanten mit den niedrigsten Sinapin- bzw. Gesamtsinapinsäureester-Gehalten im Samen. Eine umfassende Metabolitenanalyse, die die Veränderungen im globalen Metabolitenprofil charakterisiert, wurde bisher nicht durchgeführt. Baumert et al. (2005) beschreiben die Analyse von T4-Samen der Linie *UGT84A9i* mittels RP-HPLC. Hierbei konnte durch einen rein visuellen Vergleich der Elutionsprofile von Wildtyp und *UGT84A9i* bei einer Wellenlänge von 330 nm festgestellt werden, dass neben Sinapin weitere 14 Sekundärmetabolite in transgenen Samen stark reduziert vorlagen. Diese 14 Sekundärmetabolite aus Wildtyp-Samen wurden mittels Massenspektrometrie und NMR strukturell charakterisiert und ihre Abundanz während der Keimlingsentwicklung in Wildtyp-Samen dargestellt. Die Publikation von Baumert et al. (2005) beinhaltet allerdings keine quantitativen Informationen zu Metaboliten aus *UGT84A9i*-Samen.

Um Prognosen zur Fitness der Pflanzen sowie zum Einsatz des gewonnenen Rapsmehls für Ernährungszwecke zu ermöglichen, wurden die transgenen Pflanzen weiter vermehrt und umfangreiche qualitative und quantitative Veränderungen des Metabolitenprofils charakterisiert. Um statistisch gesicherte Ergebnisse zu erhalten,

wurden zwei unabhängige *UGT84A9i*-Rapslinien analysiert, d.h. sie stammen aus unabhängigen Transformationsereignissen und zeigen die gleiche Absenkung des Sinapin-Gehaltes. Um saisonale und generationsspezifische Effekte zu vermeiden, wurden beide *UGT84A9i*-Rapslinien je zweimal kultiviert und beerntet, wobei in diesem Zusammenhang zwei aufeinanderfolgende Generationen (T7, T8) angezogen wurden. Es wurden nur solche Veränderungen im Metabolitenprofil als signifikant bewertet, die in beiden transgenen Linien und beiden Kultivierungen auftraten.

Um die Samenspezifität der *UGT84A9*-Suppression sowie deren Einfluss auf das Metabolom der Samen und Keimlinge zu überprüfen, wurden sowohl Samenentwicklungsstadien als auch Keimlinge einer Metabolitenanalyse unterzogen. Das Metabolitenprofil der zwei *UGT84A9i*-Rapslinien sowie des entsprechenden Wildtyps wurde für vier Stadien der Samenentwicklung (2, 3, 5 und 7 Wochen nach Blühbeginn - WAF) und für 2, 4, 7, 10 und 14 Tage alte Keimlinge betrachtet. Bezüglich der Keimlinge wurden nur die Keimblätter der Metabolitenanalyse unterzogen. Abbildung 3-1 zeigt die vier analysierten Samenentwicklungsstadien. Stadium A (2 WAF) beinhaltet das Kugel-, Herz-, und Torpedostadium. Stadium B (3 WAF) umfasst das mittlere Keimblattstadium. Stadium C umfasst den voll entwickelten und noch grünen Embryo und Stadium D ist der reife dormante Samen mit einer schwarzen Samenschale.

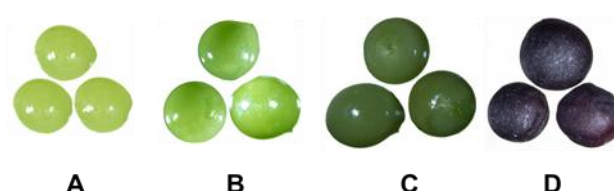


Abbildung 3-1: Samenentwicklungsstadien A (2 WAF), B (3 WAF), C (5 WAF) und D (7 WAF).

3.1.1 Veränderungen während der Samenentwicklung

3.1.1.1 Konzentrationsänderung von Sinapoylmalat, Sinapoylglucose und Sinapin während der Samenentwicklung

Die Konzentrationsänderung von Sinapoylmalat, Sinapoylglucose und Sinapin während der Samenentwicklung ist für *UGT84A9i* und den Wildtyp in Abbildung 3-2 illustriert. Zur besseren Übersichtlichkeit sind die Ergebnisse beider Kultivierungen zusammengefasst. In Wildtyp-Samen konnte während der gesamten Samenentwicklung nur wenig Sinapoylglucose detektiert werden. Dies gilt ebenso für Sinapoylmalat. Die Akkumulation von Sinapin beginnt im grünen voll entwickelten

Samen und der Sinapin-Gehalt steigt zum Stadium D sprunghaft an. Das Akkumulationsprofil der Metabolite Sinapin, Sinapoylglucose und Sinapoylmalat für *UGT84A9i*-Samen zeigte Unterschiede zum Wildtyp (Abbildung 3-2). Während der frühen Embryogenese (Stadien A und B) war Sinapoylglucose noch in den Samen detektierbar. In den Stadien C und D war dies nicht mehr der Fall. Sinapoylmalat war während der gesamten Samenentwicklung nicht quantifizierbar. Die Akkumulation von Sinapin begann wie beim Wildtyp in Stadium C. In *UGT84A9i*-Samen kam es allerdings mit dem Übergang zu Stadium D nur zu einer moderaten Zunahme von Sinapin.

Die vorgestellten Ergebnisse verdeutlichen, dass sich erste Veränderungen im Gehalt von Sinapin, Sinapoylglucose und Sinapoylmalat mit Eintritt in Stadium C beobachten lassen und sich insbesondere in reifen transgenen Samen manifestieren.

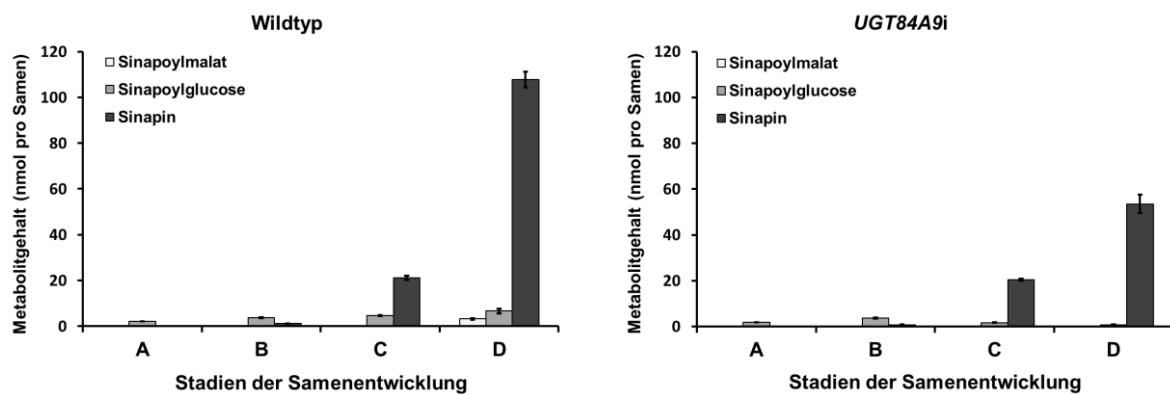


Abbildung 3-2. Konzentration von Sinapoylmalat, Sinapoylglucose und Sinapin während der Samenentwicklung für Wildtyp und *UGT84A9i*.

3.1.1.2 Sinapin- und Gesamt-Sinapinsäureester-Gehalt in reifen Samen

In Abbildung 3-3 ist für beide Kultivierungen und beide *UGT84A9i*-Linien der Gehalt von Sinapin, restlichen Sinapinsäureestern sowie der Gesamt-Sinapinsäureester für reife Samen dargestellt. Die Differenz aus Gesamt-Sinapinsäureester-Gehalt und Sinapin umfasst diejenigen Sinapinsäure-Reste, die durch alkalische Hydrolyse aus anderen Sinapinsäure-Konjugaten freigesetzt wurden und als restliche Sinapinsäureester bezeichnet werden.

Beide *UGT84A9i*-Linien zeigten für beide Kultivierungen eine stabile Absenkung des Sinapin-Gehaltes auf einen gemittelten prozentualen Wert von 50 %. Die Absenkung der verbleibenden Sinapinsäureester betrug im Mittel 15 % des Wildtyps, so dass der Gesamt-Sinapinsäureester-Gehalt durchschnittlich 44 % des Wildtyps beträgt. Die detaillierten Ergebnisse der Quantifizierung sind im Anhang in Tabelle 6-1

zusammengefasst. Für die Generationen T7 und T8 lässt sich somit eine stabile Absenkung des Sinapin- und Gesamt-Sinapinsäureester-Gehaltes nachweisen.

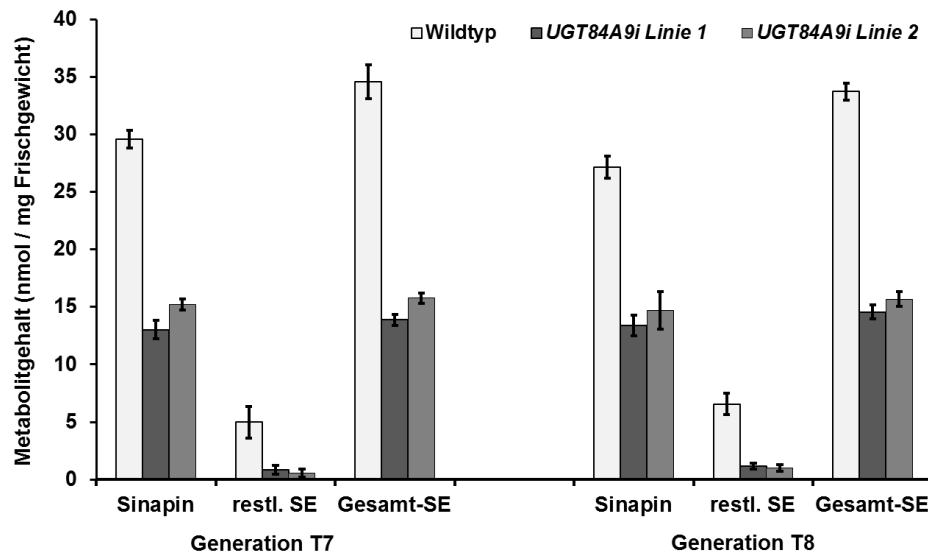


Abbildung 3-3: Konzentration von Sinapin, restlichen Sinapinsäureestern (restl. SE) und Gesamt-Sinapinsäureestern (Gesamt-SE) für reife Wildtyp- und *UGT84A9i*-Samen. Dargestellt sind die Ergebnisse von zwei unabhängigen transgenen Rapslinien und zwei unabhängigen Kultivierungen.

3.1.1.3 Analyse von Sekundärmetaboliten während der Samenentwicklung

Um festzustellen, welche Auswirkungen die Suppression von *UGT84A9* auf den Phenylpropanstoffwechsel während der Samenentwicklung hat, wurden die vier Samenstadien A, B, C und D hinsichtlich quantitativer und qualitativer Veränderungen des Sekundärstoffgehalts, bezogen auf die lösliche Fraktion, analysiert. Dazu wurde das Samenmaterial im Rahmen eines ungerichteten Metabolitenprofilings untersucht. Hierbei wurde der Fokus auf phenolische Sekundärstoffe, insbesondere auf Derivate der Hydroxyzimt- und Hydroxybenzoesäuren und auf Flavonoide gelegt. Zunächst wurden alle differenziellen Signale zwischen den beiden transgenen *UGT84A9i*-Linien und dem Wildtyp identifiziert. Dabei wurden nur solche Signale betrachtet, die sich für beide Kultivierungen statistisch signifikant mindestens um den Faktor zwei unterscheiden. Diese Herangehensweise lieferte alle Metabolite, die zwischen Wildtyp und transgenen Samen verändert sind. Um eine übergreifende Beurteilung des Metabolitenprofils vornehmen zu können, sind allerdings auch Metabolite interessant, die nicht verändert vorliegen. Deswegen wurden im zweiten Schritt alle Signale untersucht, die keine Veränderungen zwischen den Linien zeigten.

Die Identifizierung der Metabolite erfolgte anhand stoßinduzierter Tandem-Massenspektren und darauf basierender Strukturhypothesen nach Berechnung der Elementarzusammensetzung der Fragment- und Quasimolekularionen. Ein Teil der untersuchten Metabolite konnte mithilfe von Referenzsubstanzen eindeutig identifiziert werden. Insgesamt wurden 110 verschiedene Metabolite in den Samenstadien A, B, C und D quantitativ und qualitativ analysiert. Eine Zusammenfassung aller quantifizierten Metabolite mit entsprechenden Strukturinformationen ist im Anhang zu finden (Tabelle 6-12, Abbildungen 6-8 bis 6-11). Die identifizierten Substanzen sind überwiegend im Phenylpropanstoffwechsel vorkommende Verbindungen und beinhalten unter anderem phenolische Cholinester, Hydroxybenzoe- und Hydroxyzimtsäurederivate sowie Flavonoid-Derivate.

In Tabelle 3-1 ist für jedes Samenentwicklungsstadium die Anzahl differenzieller Metabolite dargestellt. Während der frühen Samenentwicklung (Stadium A und B) wurde nur für Feruloylcholin ein Unterschied zwischen Wildtyp und *UGT84A9i* detektiert, wobei diese Verbindung in transgenen Samen reduziert vorlag. Mit dem Übergang zu Stadium C wurden 15 differenzielle Metabolite identifiziert. Im reifen Samen (Stadium D) wurden die meisten Veränderungen gefunden, mit 58 quantitativ veränderten Metaboliten zwischen Wildtyp und *UGT84A9i*. Bereits an der Anzahl differenzieller Metabolite pro Stadium lässt sich ablesen, dass die Suppression von *UGT84A9* erst in der späten Samenentwicklungsphase deutliche Veränderungen im Metabolitenprofil verursacht.

Tabelle 3-1: Anzahl differenzieller Metabolite in den Samenentwicklungsstadien A – D für den Vergleich Wildtyp – *UGT84A9i*.

Samenstadium	Anzahl differenzieller Metabolite (reduziert + induziert in <i>UGT84A9i</i>)
A	0
B	1+0
C	7+8
D	34+24

Eine Zusammenstellung der Quantifizierungsergebnisse für alle 110 Metabolite während der Samenstadien A, B, C und D ist im Anhang zu finden (Tabelle 6-10).

In Tabelle 3-2 sind alle Metabolite aufgelistet, die in den Samenentwicklungsstadien C und D signifikante Unterschiede zwischen *UGT84A9i* und Wildtyp zeigten. Die Nummerierung der Metabolite in Tabelle 3-2 entspricht der Nummerierung in Tabelle 6-10 (Anhang). Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die Ergebnisse beider

UGT84A9i-Rapslinien und Kultivierungen zu einem repräsentativen Wert (Median) zusammengefasst.

Die Einteilung der Metabolite in Tabelle 3-2 erfolgt in sechs Kategorien. Zur ersten Gruppe gehören die Sekundärstoffe Feruloyl- und Cinnamoylcholin. Sie waren sowohl in Stadium C als auch D signifikant reduziert und der Grad der Reduktion ist für beide Stadien etwa gleich. In der zweiten Kategorie sind alle Metabolite, deren Konzentrationsunterschiede zwischen *UGT84A9i* und Wildtyp sich von Stadium C zu D nicht weiter vergrößerten, sondern verkleinerten. Hierzu zählen Kaffeoylcholin, dessen Konzentrationsabnahme sich in *UGT84A9i* etwas abschwächte und drei Metabolite, deren Induktion in *UGT84A9i* etwas zurückging.

Die Kategorien drei und vier umfassen alle Metabolite, deren Gehalt sich in transgenen Samen während der Samenentwicklung entweder weiter vermindert oder weiter erhöht hat. Für diese Metabolite verstärkt sich in Stadium D somit der Effekt, der bereits in Stadium C beobachtet wurde. Metabolite mit weiterer Konzentrationsabnahme während der Samenentwicklung sind z. B. Sinapoylglucose sowie 5-Hydroxyferuloyl- und 3,4-Dimethoxyferuloylcholin. Die Metabolite 4-O- β -Glucosyl-*E*-sinapinsäure und 4-O-Glucosylsinapoylcholin zeigten hingegen eine weitere Konzentrationszunahme von Stadium C zu D.

Die Kategorien fünf und sechs beinhalten alle Metabolite, die nur in reifen Samen eine Konzentrationsveränderung zeigen. Hierzu zählen 27 reduzierte und 16 induzierte Sekundärstoffe. Zu den reduzierten Verbindungen gehören unter anderem von 1-O-Sinapoylglucose abgeleitete Derivate wie 1,2-Di-O-sinapoylglucose oder 1,2-Di-O-sinapoylgentiobiose, vier Kämpferol-Derivate sowie verschiedene phenolische Cholinester. Die induzierten Verbindungen umfassen vorwiegend glycosylierte Hydroxyzimt- oder Hydroxybenzoesäuren sowie zehn nicht eindeutig charakterisierte Verbindungen, die wahrscheinlich zur Klasse der phenolischen Cholinester zählen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass zu den ersten in *UGT84A9i*-Samen reduzierten Metaboliten (Stadium C) Sinapoylglucose sowie Hydroxyzimtsäure-abgeleitete Cholinester wie Kaffeoyl-, Feruloyl- oder 5-Hydroxyferuloylcholin zählen. Noch bevor sich die Verminderung des Gehaltes von Sinapoylglucose merklich auf den Sinapin-Gehalt auswirken kann, werden bereits die Cholinester der im Stoffwechselweg vorgeschalteten Hydroxyzimtsäuren beeinflusst. Metabolite, deren Gehalt in transgenen Samen im Vergleich zum Wildtyp während der Samenreife anstieg, waren hingegen überwiegend 4-O-Glucoside bzw. 4-O-Hexoside der Hydroxyzimtsäuren, Hydroxybenzoesäuren oder der entsprechenden Cholinester.

Tabelle 3-2: Metabolite mit verändertem Gehalt in Samen von *UGT84A9i* für die Samenentwicklungsstadien C und D. Signifikante Veränderungen sind in schwarz dargestellt; nicht signifikante Veränderungen in grau; * unter dem Quantifizierungslimit in *UGT84A9i*; n.d. – nicht detektierbar.

Nr.	Metabolit	Verhältnis <i>UGT84A9i</i> zu Wt	
		Stadium C	Stadium D
Veränderungen im Metabolitengehalt von <i>UGT84A9i</i>, die im Verlauf der Samenentwicklung konstant bleiben:			
13	Feruloylcholin	0,07	0,11
24	Cinnamoylcholin	0,03	0,08
Veränderungen im Metabolitengehalt von <i>UGT84A9i</i>, die sich im Verlauf der Samenentwicklung abschwächen:			
8	Kaffeoylcholin	0,19	0,33
15	SC(4-O-8')G-4-O'-hexosid	5,27	3,79
47	Kämpferol-3-O-(sin-soph)	100	9,40
78	Sinapin-4-O-deoxyhexosid	100	46,14
Veränderungen im Metabolitengehalt von <i>UGT84A9i</i>, die sich im Verlauf der Samenentwicklung verstärken (Konzentrationsabnahme):			
9	5-Hydroxyferuloylcholin	0,40	0,14
23	3,4-Dimethoxycinnamoylcholin	0,24	0,11
25	FC(5-8')S	0,39	0,28
34	1-O-Sinapoylglucose	0,49	*
Veränderungen im Metabolitengehalt von <i>UGT84A9i</i>, die sich im Verlauf der Samenentwicklung verstärken (Konzentrationszunahme):			
6	4-O-Glucosylsinapoylcholin	7,64	11,63
17	SC(4-O-8')S-4-O'-hexosid	2,74	3,24
45	4-O-β-Glucosyl- <i>E</i> -sinapinsäure	2,14	11,43
46	Kämpferol-3-O-β-soph	2,52	5,12
75	UK#7	100	100
Metabolite, deren Gehalt nur in reifen <i>UGT84A9i</i>-Samen vermindert ist:			
2	4-O-Hexosyloxybenzoylcholin	0,96	0,37
16	Sinapoylcholin	0,97	0,50
18	FC(4-O-8')S	0,57	0,50
27	FC(4-O-8')S-di-sin	0,33	0,04
28	FC(4-O-8')G-di-sin	0,74	0,13
29	SC(4-O-8')G-di-sin	0,49	0,14
30	Kaffeoylgentiobiose	n.d.	0,36
32	Kämpferol-3-O-soph-7-O-glc	0,96	0,50

Tabelle 3-2 (Fortsetzung)

Nr.	Metabolit	Verhältnis <i>UGT84A9i</i> zu Wt	
		Stadium C	Stadium D
Metabolite, deren Gehalt nur in reifen <i>UGT84A9i</i>-Samen vermindert ist:			
33	Kämpferol-3-O-(sin-soph)-7-O-glc	0,74	0,38
35	Kämpferol-4'-O-(sin-glc)-3,7-di-glc	0,65	0,34
37	Kämpferol-3-O-soph-7-O-(sin-glc)	0,62	0,35
38	2-O-Sinapoyl-S-malat	0,60	0,04
39	1,2-Di-O-sinapoylgentiobiose	0,91	0,02
40	1,2-Di-O-sinapoylglucose	0,46	0,01
41	1,2,2'-Tri-O-sinapoylgentiobiose	n.d.	0,08
42	1,6-Di-O-sinapoylglucose	0,21	*
49	4-O-Hexosylkaffeoylcholin	0,99	0,38
50	O-Hexosyloxybenzoesäure	n.d.	*
58	2-O-Feruloyl-S-malat	n.d.	*
65	4-O-Hexosylcumaroylcholin	0,70	0,24
70	Di-O-hexosylsinapinsäure	0,53	0,30
71	4-O-Hexosylmethylsyringasäure	n.d.	*
82	UK#12 (Cholinester)	0,44	0,44
83	VC(4-O-8')G-sin	0,18	0,05
84	VC(4-O-8')-O-methyl-G-sin	n.d.	0,03
86	UK#3 - Sinapoylglucose-Konjugat	n.d.	*
95	UK#20 (unbekanntes Dihexosid)	0,69	0,28
Metabolite, deren Gehalt nur in reifen <i>UGT84A9i</i>-Samen erhöht ist:			
43	4-O- β -Glucosylsyringasäure	n.d.	5,67
51	4-O-Dihexosylsinapoylcholin	n.d.	11,27
53	SC-4-O-(hexosid-pentosid)	0,85	3,56
54	O-Pentosylsinapinsäure	n.d.	4,48
56	N-Sinapoyl-S-methylcysteinsulfoxid	n.d.	10,00
57	O-Hexosylferulasäure	0,86	2,09
59	4-O-Hexosylmethylsinapinsäure	1,40	100
61	UK#1 (phenolischer Cholinester)	n.d.	2,61
62	UK#2 (phenolischer Cholinester)	1,04	2,90
63	UK#3 (phenolischer Cholinester)	n.d.	6,03
64	UK#4 (phenolischer Cholinester)	1,80	5,05
72	UK#5 (Cholinester)	1,49	2,98
76	UK#8 (Cholinester)	n.d.	38,07
77	UK#9 (phenolischer Cholinester)	n.d.	4,49
79	UK#10 (Cholinester)	1,34	3,97
80	UK#11 (phenolischer Cholinester)	0,96	3,13

Neben der Analyse differenzieller Metabolite während der Samenentwicklung standen die metabolische Charakterisierung der Entwicklungsstadien und die Konzentrationsänderung während der Samenentwicklung der untersuchten 110 Metabolite im Vordergrund. Die Visualisierung der Metaboliten-Kinetiken ist in Abbildung 3-4 zusammengefasst. Sie stellt das Ergebnis einer hierarchischen, agglomerativen Clusteranalyse der 110 analysierten Metabolite dar. Die Anwendung der Clusteranalyse zur Charakterisierung des Metabolitenprofils während der Samenreife dient zur Identifizierung von Metabolitengruppen mit ähnlichen Entwicklungskinetiken.

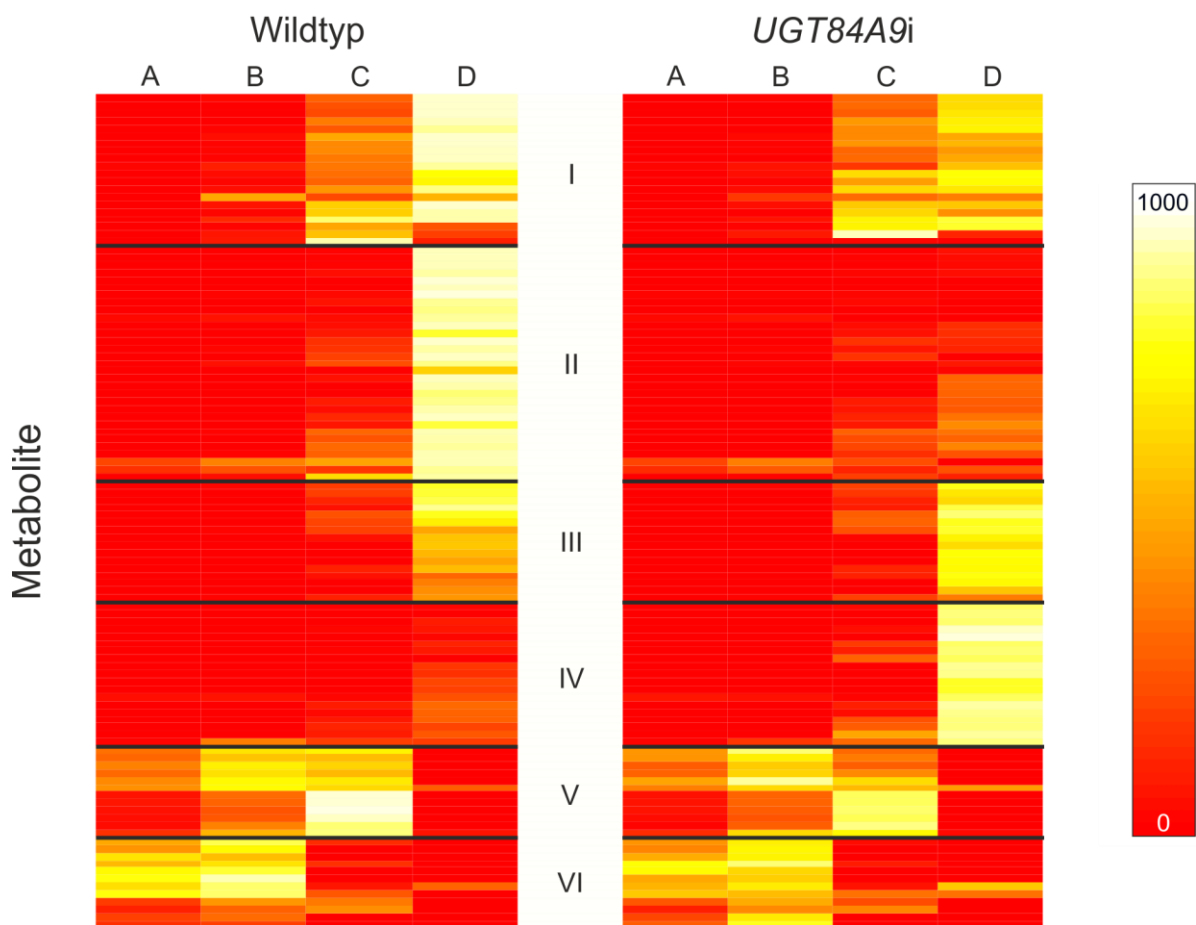


Abbildung 3-4: Hierarchische Clusteranalyse der quantifizierten Metabolite von Wildtyp- und *UGT84A9i*-Samen der Entwicklungsstadien A - D. Die Zeilen stellen die quantifizierten Metabolite aus Tabelle 6-10 des Anhangs dar, wobei die Reihenfolge identisch zu der in Tabelle 6-10 ist. Die Intensität der Metabolite ist entsprechend der Farbkodierung (rechts) dargestellt. Die Einteilung der Metabolite in die Cluster I bis VI ist durch die schwarzen Trennlinien gekennzeichnet.

Jede Zeile in Abbildung 3-4 repräsentiert einen quantifizierten Metabolit, wobei die Intensität entsprechend der Legende farblich kodiert ist. Um eine übersichtliche Farbkodierung zu gewährleisten, erfolgte eine Normierung der Intensitätswerte pro Metabolit auf den Faktor 1000. Weiterhin wurden die Ergebnisse beider

Kultivierungen zu einem repräsentativen Wert je Rapslinie zusammengefasst, so dass jeweils für Wildtyp und *UGT84A9i* je Samenentwicklungsstadium ein Wert in die Clusteranalyse eingegangen ist. Die Clusteranalyse ergab eine Einteilung der Metabolite in sechs Cluster. Diese sind durch die schwarzen Trennlinien voneinander separiert. Die Reihenfolge der Metabolite in Abbildung 3-4 entspricht der Reihenfolge in Tabelle 6-10 (Anhang). Zusätzlich ist in der Tabelle die Clusternummer angegeben.

Cluster I beinhaltet 20 Metabolite, die in den Samenentwicklungsstadien A und B nahezu nicht detektierbar waren und eine Intensitätszunahme von Stadium C zu D zeigten. Ein Vergleich zwischen Wildtyp und *UGT84A9i* ergab, dass diese Metabolite in transgenen Samen nur leicht oder gar nicht reduziert vorkamen. Zu diesem Cluster zählen beispielsweise phenolische Cholinester (FC, SC, VC), die mit Koniferyl- oder Sinapylalkohol verknüpft und teilweise zusätzlich noch mit einer Hexose konjugiert sind. Weiterhin sind zwei Spermidin-Konjugate sowie Benzoyl- und Vanilloylcholin vertreten.

Zu Cluster II können 31 Metabolite gezählt werden. Diese wurden fast ausschließlich in reifen Wildtyp-Samen (Stadium D) detektiert. Sie zeigten alle einen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp und *UGT84A9i*, wobei ihre Konzentration in transgenen Samen reduziert war. Hierzu zählen die Cholinester der Hydroxyzimtsäuren (Kaffeoyl-, Feruloyl-, 5-Hydroxyferuloyl- und Sinapoylcholin), Sinapoylglucose und davon abgeleitete Verbindungen, Sinapoyl- und Feruloylmalat und drei Kämpferol-Derivate.

Cluster III umfasst 16 Metabolite, die ebenso wie bei den vorherigen Clustern vorwiegend in reifen Samen zu finden waren. Für 14 von 16 Metabolite bestand kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und *UGT84A9i*. Die verbleibenden zwei Metabolite zeigten eine leichte Induktion in transgenen Samen und sind zwei unbekannte Cholinester. Das Cluster beinhaltet im Wesentlichen Hexoside von Hydroxymzimt- und Hydroxybenzoesäuren sowie von Syringoylcholin und Feruloylcholin. Weitere Komponenten des Clusters sind Nicotinoyl-, Cumaroyl- und 4-Hydroxybenzoylcholin.

Insgesamt 19 Metabolite können zu Cluster IV zugeordnet werden. Diese wurden wieder überwiegend in reifen Samen gefunden. Die Gruppe zeigte für alle Metabolite einen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp und *UGT84A9i*, wobei sie in transgenen Samen vermehrt detektiert wurden. Hierzu zählen Hexoside / Glucoside bzw. Pentoside von Sinapoylcholin, Sinapinsäure und Syringasäure. In die Klasse zählen ebenso zwei Sinapoylcholin-Addukte mit Koniferyl- bzw. Sinapylalkohol und einer Hexose.

Die letzten zwei Cluster, V und VI, beinhalten jeweils zwölf Metabolite. Im Gegensatz zu den Clustern I bis IV sind die entsprechenden Metabolite vorwiegend in den Samenentwicklungsstadien A und B (Cluster VI) sowie C (Cluster V) vertreten. Typische Vertreter von Cluster V sind Epicatechin sowie ein Procyanidin-Dimer und -Trimer. Zu Cluster VI gehören weiterhin vier Glucosinolate. Bis auf zwei Metabolite (O-Hexosylferulasäure und 4-O-Hexosylmethylsinapinsäure) konnte für die Verbindungen dieser zwei Cluster kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und *UGT84A9i* festgestellt werden.

Anhand Abbildung 3-4 lässt sich ebenso sehr gut erkennen, in welchen Samenentwicklungsstadien Veränderungen im Samenmetabolom von *UGT84A9i* im Vergleich zum Wildtyp auftreten und wann sie sich manifestieren. In Stadium A wurden keine signifikanten Unterschiede detektiert und in Stadium B nur einer (Feruloylcholin, Cluster II). Durch die farblich kodierte Darstellung der Mittelwerte in Abbildung 3-4 kann für einige Metabolite der Eindruck entstehen, dass es signifikante Unterschiede gäbe. Aufgrund der teilweise hohen Schwankungsbreite des Mittelwertes resultierte jedoch kein signifikanter Unterschied. In Entwicklungsstadium C traten die ersten deutlichen Unterschiede zwischen *UGT84A9i* und Wildtyp auf. Dies spiegelt sich in den Clustern II und IV wider. In reifen Samen wurden die zahlreichsten Veränderungen detektiert, was sich wiederum durch Cluster II und IV verdeutlicht.

3.1.1.4 Analyse von Primärmetaboliten während der Samenentwicklung

Die Analyse von Sekundärmetaboliten zeigte, dass bereits in Stadium C erste Veränderungen im Metabolitenprofil zu beobachten sind und in reifen Samen die meisten Veränderungen auftreten. Um mögliche Auswirkungen des veränderten Sekundärstoffwechsels auf den Primärmetabolismus zu entdecken, wurden die vier Samenstadien A, B, C und D hinsichtlich wichtiger Primärmetabolite wie Aminosäuren, anderen organischen Säuren und Kohlenhydrate mittels GC-MS analysiert und relativ quantifiziert. In Tabelle 6-15 im Anhang sind alle analysierten Primärmetabolite zusammengefasst (Insgesamt 46).

Im Gegensatz zu den vielen Veränderungen im Phenylpropanstoffwechsel wurden im Primärstoffwechsel nur wenige, geringfügige Veränderungen detektiert. Eine Zusammenstellung differenzieller Metabolite für Stadium C und D ist in Tabelle 3-3 zu sehen. Während der frühen Samenentwicklung (Stadium A und B) fanden sich keine quantitativen Veränderungen im Profil der Primärmetabolite zwischen *UGT84A9i* und Wildtyp. In Stadium C wurden vier differenzielle Metabolite detektiert. Dazu zählten die Aminosäuren Valin und Isoleucin sowie Galactonsäure und

Phosphorsäure. Diese Metabolite zeigten einen verminderten Gehalt in *UGT84A9i*-Samen. Nur zwei der vier signifikant veränderten Primärmetabolite konnten in Stadium D bestätigt werden: Galactonsäure und Phosphorsäure. Auch in reifen *UGT84A9i*-Samen waren sie im Vergleich zum Wildtyp reduziert. Andererseits konnte für die Metabolite Glycerinsäure und Fumarsäure nur in Stadium D eine signifikante Konzentrationsabnahme beobachtet werden.

Tabelle 3-3: Ergebnis der Analyse von Primärmetaboliten in Stadium C und D in *UGT84A9i*-Samen im Vergleich zum Wildtyp. Nicht signifikante Veränderungen sind in grau dargestellt.

Nr.	Metabolit	Verhältnis	Verhältnis
		<i>UGT84A9i</i> zu Wt Stadium C	<i>UGT84A9i</i> zu Wt Stadium D
2	L-Valin	0,42	0,91
4	L-Isoleucin	0,47	0,88
26	Glycerinsäure	0,52	0,43
27	Fumarsäure	0,88	0,30
36	Galactonsäure	0,44	0,50
44	Phosphorsäure	0,22	0,42

Die Monosaccharide Glucose und Fructose und das Disaccharid Saccharose repräsentieren die im Samen vorherrschenden Kohlenhydrate und wurden deshalb absolut quantifiziert (Abbildung 6-1 und Abbildung 6-2 Anhang). In der frühen Samenentwicklungsphase konnten Glucose und Fructose in hohen Mengen im Samen gefunden werden. Während des Übergangs zu Stadium D nahm der Anteil an Hexosen ab und die Menge an Saccharose zu. In reifen Samen wurde fast ausschließlich Saccharose gefunden. Für Glucose, Fructose und Saccharose konnte kein signifikanter Unterschied zwischen *UGT84A9i* und Wildtyp detektiert werden.

Diese Resultate zeigen, dass im Primärstoffwechsel nur marginale Veränderungen detektiert wurden und sich die Suppression von *UGT84A9* somit kaum auf ihn auswirkt.

3.1.1.5 Konzentrationsänderung von Cholin in reifen Rapssamen

Aufgrund der Konzentrationsabnahme einer Vielzahl von phenolischen Cholinestern für reife *UGT84A9i*-Samen war die Frage zu klären, ob dies mit einer Veränderung des Gehaltes an freiem Cholin einhergeht. Eine absolute Quantifizierung von Cholin ergab im Mittel eine 12-fache Erhöhung in reifen *UGT84A9i*-Samen im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 3-5). Um die negative Korrelation zwischen Sinapin-Gehalt und Cholin-Gehalt zu verifizieren, wurde überprüft, ob eine Bilanzierung zwischen Sinapinabsenkung und Cholinakkumulation möglich ist. Die Differenz des Sinapin-

Gehaltes zwischen Wildtyp und *UGT84A9i*-Samen betrug im Mittel 14,33 nmol/mg Frischgewicht. Die Zunahme an freiem Cholin in *UGT84A9i*-Samen betrug allerdings nur 3,99 nmol/mg Frischgewicht. Somit kann geschlussfolgert werden, dass durch die Sinapinabsenkung nicht-metabolisiertes Cholin zwar im Samen akkumuliert, aber nicht im selben Maße wie der Sinapin-Gehalt absinkt.

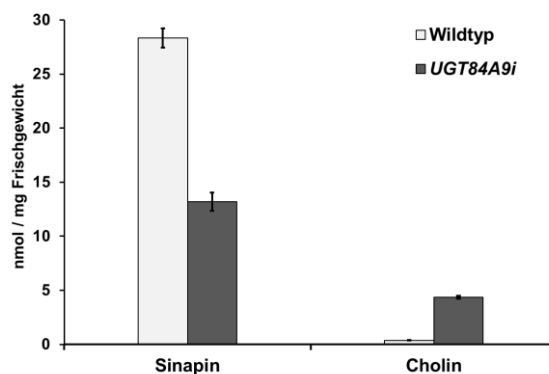


Abbildung 3-5: Konzentration von Sinapin und freiem Cholin für reife Wildtyp- und *UGT84A9i*-Samen.

3.1.1.6 Analyse von Zellwand-gebundenen Phenolen von reifen Rapssamen

Ausgehend von den Hydroxycimtsäuren des Phenylpropanstoffwechsels entstehen durch Reduktion die entsprechenden Aldehyde und durch weitere Reduktion die korrespondierenden Alkohole (Monolignole), die anschließend zu Lignin polymerisieren. Abgesehen von der Biosynthese von Lignin sind Hydroxycimtsäure-Derivate auch Bestandteile von Polysacchariden in Zellwandfraktionen (Carpita 1996; Fry 1982; Fry 1986) und dienen der Aufrechterhaltung der strukturellen Stabilität der Zellwände (Bidlack et al., 1992; Carpita 1996). Der Anteil von Hydroxycimtsäure-Derivaten, der durch alkalische Hydrolyse aus Zellwänden isoliert werden kann, wird als Zellwand-gebundene Phenole bezeichnet (Tan et al., 2004). Aufgrund der starken Sinapinabsenkung sowie den dadurch verursachten weit reichenden metabolischen Veränderungen wäre es denkbar, dass es ebenfalls Auswirkungen auf die Art und Konzentration Zellwand-gebundener Phenole gibt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde der Zellwand-gebundene HCA- und HBA-Pool sowie abgeleitete Alkohole und Aldehyde in reifen Samen untersucht. Tabelle 3-4 stellt die signifikanten Veränderungen zwischen *UGT84A9i* und Wildtyp zusammenfassend dar. Im Anhang in Tabelle 6-4 sind die detaillierten Ergebnisse wiedergegeben.

Tabelle 3-4: Ergebnisse der Analyse von Zellwand-gebundenen Phenolen in reifen *UGT84A9i*- und Wildtyp-Samen.

Metabolit	Verhältnis
	<i>UGT84A9i</i> zu Wildtyp
Ferulasäure	0,87
Sinapinsäure	0,54
Syringasäure	1,69
Syringaldehyd	1,41

Es konnten nur geringfügige Veränderungen von Zellwand-gebundenen Phenolen detektiert werden. Ferula- und Sinapinsäure waren in ihrem Gehalt in *UGT84A9i*-Samen leicht erniedrigt. Dies ist in Einklang mit der beobachteten Konzentrationserniedrigung von Sinapinsäure- und Ferulasäure-Derivaten der löslichen Metabolit-Fraktion. Im Gegensatz dazu wurde Syringasäure und Syringaldehyde vermehrt detektiert. Dies korreliert wiederum mit der leichten Zunahme an Syringasäure-Derivaten der löslichen Fraktion.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Suppression von *UGT84A9* nur geringfügige Auswirkungen auf die Zusammensetzung und den Gehalt von Zellwand-gebundenen Phenolen hat. Somit ist in Samen der Linie *UGT84A9i* keine Verschiebung innerhalb des Sinapinsäure-Pools von der löslichen zur Zellwand-gebundenen Fraktion zu beobachten.

3.1.1.7 Analyse von Hydroxymzimtsäure- und Hydroxybenzoessäure-Äquivalenten von reifen Rapssamen

Eine detailliertere quantitative Analyse von Hydroxymzimt- sowie Hydroxybenzoessäure-Äquivalenten wurde mit dem Ziel durchgeführt, die metabolischen Veränderungen der Samen quantitativ bewerten zu können. Zu diesem Zweck wurde die lösliche Fraktion nach Verseifung hinsichtlich ihrer Zusammensetzung und ihres Gehaltes von Hydroxymzimt- und Hydroxybenzoessäuren und den zugehörigen Alkoholen und Aldehyden untersucht. Die Ergebnisse der Analysen sind in Tabelle 3-5 zusammengefasst. Im Anhang in Tabelle 6-6 sind die detaillierten Ergebnisse aufgeführt.

Tabelle 3-5: Ergebnisse der Analyse von HCAs, HBAs und abgeleiteten Alkoholen und Aldehyden in verseiften methanolischen Extrakten von reifen Wildtyp- und *UGT84A9i*-Samen.

Metabolit	Verhältnis
	<i>UGT84A9i</i> zu Wildtyp
Ferulasäure	0,16
5-Hydroxyferulasäure	0,36
Sinapinsäure	0,43
Syringasäure	2,38
Sinapylaldehyd	2,27
Syringaldehyd	0,38

Für Ferula-, 5-Hydroxyferula- und Sinapinsäure konnte eine signifikante Erniedrigung in *UGT84A9i*-Samen nachgewiesen werden. Dies ist in Einklang mit der Tatsache, dass in der löslichen Fraktion der Samenextrakte eine starke Absenkung von Cholinestern der entsprechenden Säuren festgestellt wurde. Syringasäure konnte in erhöhtem Maße in den transgenen Samen detektiert werden. Dies deckt sich wiederum mit der Tatsache, dass in reifen *UGT84A9i*-Samen Syringasäure-Derivate vermehrt nachzuweisen waren. Sinapylaldehyd und Syringaldehyd zeigten zu den entsprechenden Säuren genau das entgegengesetzte Akkumulationsverhalten. Sinapylaldehyd lag vermehrt und Syringaldehyd vermindert in transgenen Samen vor.

Die Analyse der Hydroxyzimt- und Hydroxybenzoesäure-Äquivalente bestätigt die bereits gewonnene Information, dass die Suppression von *UGT84A9* die Verringerung der Konzentration einer Vielzahl von phenolischen Metaboliten verursacht, während einige phenolische Sameninhaltsstoffe induziert werden. Diese Induktion kann jedoch den starken Nettoverlust phenolischer Samenkomponenten nicht kompensieren.

3.1.1.8 Analyse wichtiger agronomischer Merkmale von reifen Rapssamen

Um zu überprüfen, ob die Suppression von *UGT84A9* Auswirkungen auf wichtige agronomische Merkmale des Rapssamens hat, wurden mithilfe der NIRS-Technik Öl, Protein- und Glucosinolatgehalt sowie Rohfaserkomponenten (NDF: Neutrale-Detergenz-Faser, ADF: Säure-Detergenz-Faser, ADL: Säure-Detergenz-Lignin) und Fettsäurezusammensetzung (Ölsäure C18:1, Linolensäure C18:3, Erucasäure C22:1) analysiert. Eine Zusammenstellung liefert Tabelle 3-6.

Der Ölgehalt in den Rapssamen sollte zwischen 50 % und 60 % liegen und der Proteingehalt zwischen 17 % bis 25 %. Dies traf sowohl für den Wildtyp als auch für

die zwei untersuchten *UGT84A9i*-Linien zu. Bei einer 00-Rapssorte sollte der Glucosinolat-Gehalt 25 $\mu\text{mol/g}$ Samen nicht überschreiten. Der tatsächliche Glucosinolat-Gehalt hängt von der angebauten Rapssorte und zusätzlich von bestimmten Anbaubedingungen, wie z.B. der Schwefelversorgung des Standortes ab (Schumann et al., 2000). Die Werte für Wildtyp und *UGT84A9i* lagen zwar leicht über diesem Richtwert, zeigten aber keine Unterschiede zueinander.

Die NDF-Fraktion umfasst die im Samen enthaltenen Hemicellulosen, Cellulose und Lignin. Zur ADF-Fraktion zählen Cellulose und Lignin. Aus der Differenz zwischen NDF und ADF ergibt sich der Gehalt an Hemicellulose. Die ADL-Fraktion erfasst das Lignin. Über die Differenz zwischen ADF und ADL kann der Gehalt an Cellulose bestimmt werden. Auch für diese drei Samencharakteristika wurde keine Unterschiede zwischen Wildtyp und *UGT84A9i* festgestellt.

Der Ölsäure-Gehalt sollte zwischen 51 % und 70 % und der Linolensäure-Gehalt zwischen 5 % und 14 % des Gesamtfettsäuregehaltes liegen. Der Gehalt an Erucasäure sollte bei 00-Rapssorten 2 % nicht überschreiten. Auch diese Richtwerte wurden von den Wildtyp- und *UGT84A9i*-Samen eingehalten, wobei kein Unterschied zwischen Wildtyp und *UGT84A9i* detektiert wurde.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass für die in Tabelle 3-6 aufgeführten agronomischen Merkmale kein Unterschied zwischen Wildtyp und *UGT84A9i* festgestellt werden konnte und somit kein negativer Einfluss der *UGT84A9i*-Suppression auf die wertbestimmenden Größen feststellbar ist.

Tabelle 3-6: Ergebnisse der NIRS Analysen wichtiger agronomischer Merkmale für Wildtyp und *UGT84A9i*-Rapssamen.

	Wildtyp	<i>UGT84A9i</i> (Linie 1)	<i>UGT84A9i</i> (Linie 2)
Öl-Gehalt %	44,43 \pm 1,54	45,67 \pm 0,72	43,97 \pm 4,44
Protein-Gehalt %	26,45 \pm 1,32	25,91 \pm 0,72	27,48 \pm 3,63
GSL ($\mu\text{mol/g}$)	27,59 \pm 6,38	24,23 \pm 2,83	31,34 \pm 7,38
NDF %	16,07 \pm 0,24	15,23 \pm 0,32	16,07 \pm 1,20
ADF %	10,99 \pm 1,08	9,43 \pm 0,36	11,41 \pm 2,16
ADL %	5,89 \pm 0,76	4,61 \pm 0,22	5,94 \pm 1,37
C18:1	68,80 \pm 0,45	67,03 \pm 1,55	68,46 \pm 0,46
C18:3	9,18 \pm 0,68	9,38 \pm 1,05	8,46 \pm 0,11
C22:1	< 2 %	< 2 %	< 2 %

3.1.2 Veränderungen während der Keimlingsentwicklung

Die Analyse der Metabolitenprofile während der Samenreifung für Wildtyp und *UGT84A9i* zeigte, dass die metabolischen Veränderungen, hervorgerufen durch die Suppression von *UGT84A9*, vorwiegend in reifen Samen sichtbar werden. Daraus ergab sich die Fragestellung, inwiefern sich das Metabolitenprofil während der Keimung bei Wildtyp und *UGT84A9i* verändert und eventuell angleicht. Zu diesem Zweck wurden die Keimblätter von 2, 4, 7, 10 und 14 Tage alten Keimlingen hinsichtlich ihres Metabolitenprofils untersucht. Hierbei erfolgte eine Beschränkung auf bereits identifizierte Sekundärmetabolite, da dieser Bereich des Samen-Metaboloms am stärksten von den Veränderungen betroffen war.

3.1.2.1 Konzentrationsänderung von Sinapoylmalat, Sinapoylglucose und Sinapin während der Keimlingsentwicklung

In Abbildung 3-6 ist die Quantifizierung der Metabolite Sinapoylmalat, Sinapoylglucose und Sinapin für *UGT84A9i* und Wildtyp dargestellt. Während der Keimung erfolgte die schnelle Umwandlung von Sinapin über freie Sinapinsäure zu Sinapoylglucose. Vier Tage nach Keimung konnte Sinapin in Wildtyp sowie in *UGT84A9i*-Samen nicht mehr detektiert werden. Sinapoylglucose erreichte in zwei Tage alten Keimblättern des Wildtyps die maximale Konzentration, welche danach wieder sukzessive abnahm. In *UGT84A9i*-Samen war dieser sprunghafte Anstieg der Sinapoylglucose-Konzentration in zwei Tage alten Keimblättern nicht zu sehen. Die Akkumulation von Sinapoylmalat begann im Wildtyp bereits zwei Tage nach Keimung und setzt sich über den betrachteten Zeitraum von 14 Tagen weiter fort. In *UGT84A9i*-Samen hingegen startete die Sinapoylmalatakkumulation erst in sieben Tage alten Keimblättern und nahm anschließend stetig zu, wobei die Konzentration nach 14 Tagen nur ca. 42 % des Wildtyps-Niveaus erreichte.

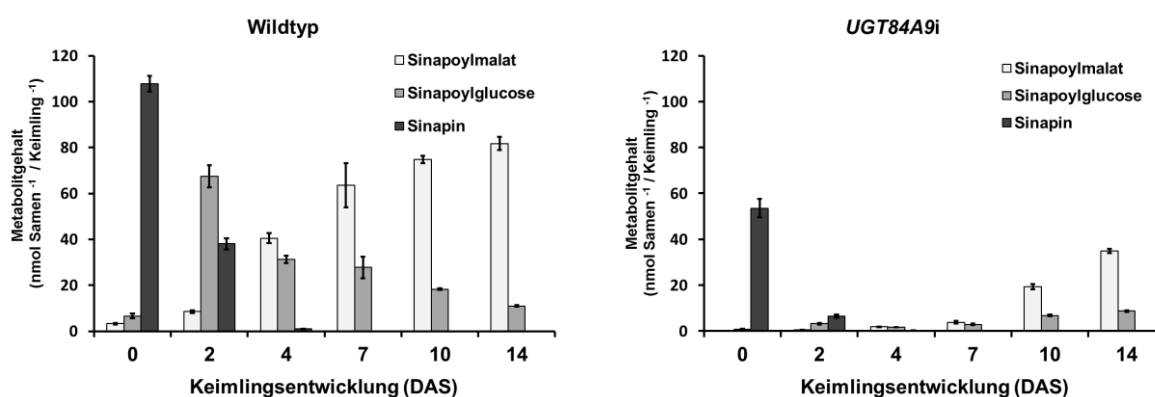


Abbildung 3-6: Konzentration von Sinapoylmalat, Sinapoylglucose und Sinapin während der Keimlingsentwicklung in Wildtyp und *UGT84A9i*.

3.1.2.2 Analyse von Sekundärmetaboliten

In Tabelle 3-7 ist die Anzahl differenzieller Metabolite während der Keimlingsentwicklung zusammengefasst. Die Anzahl differenzieller Metabolite verringerte sich dabei von 56 in reifen Samen auf 33 in 14 Tage alten Keimblättern. Der Tabelle ist zu entnehmen, dass eine kontinuierliche Abnahme der Anzahl signifikant verschiedener Metabolite während der Keimlingsentwicklung erfolgte.

Tabelle 3-7: Anzahl differenzieller Metabolite während der Keimlingsentwicklung von *UGT84A9i* im Vergleich zum Wildtyp.

Keimlings- stadium (DAS)	Anzahl differenzieller Metabolite		
	Gesamt	Induziert in <i>UGT84A9i</i>	Reduziert in <i>UGT84A9i</i>
0	56	22	34
2	61	23	38
4	48	20	28
7	45	20	25
10	40	15	25
14	33	16	17

Insgesamt 83 Metabolite wurden während der Keimlingsentwicklung relativ quantifiziert und anhand einer hierarchischen, agglomerativen Clusteranalyse in Gruppen mit ähnlichen Entwicklungskinetiken eingeteilt (Tabelle 6-11). Jede Zeile in Abbildung 3-7 repräsentiert einen quantifizierten Metabolit, wobei die Intensität entsprechend der Legende farblich kodiert ist. Um eine übersichtliche Farbkodierung zu gewährleisten, erfolgte eine Normierung der Intensitätswerte jedes Metaboliten auf den Faktor 1000.

Die Clusteranalyse ergab eine Einteilung der Metabolite in sechs Cluster. Diese sind durch die schwarzen Trennlinien voneinander separiert. Die Reihenfolge der Metabolite in Abbildung 3-7 entspricht der Reihenfolge in Tabelle 6-11 (Anhang). Zusätzlich ist in Tabelle 6-11 die Clusternummer angegeben.

Cluster I beinhaltet 26 Metabolite. Während der Keimlingsentwicklung wurden diese schnell metabolisiert und waren nach vier Tagen nicht mehr detektierbar. Ein Vergleich zwischen Wildtyp und *UGT84A9i* zeigte, dass diese Metabolite in transgenen Samen nur leicht oder gar nicht reduziert vorlagen. Zu diesem Cluster zählen beispielsweise phenolische Cholinester (FC, SC) die mit Koniferyl- oder Sinapylalkohol verknüpft und teilweise zusätzlich noch mit einer Hexose konjugiert sind. Weiterhin sind ein Spermidin-Konjugate sowie Nicotinoyl-, Benzoyl-, Vanilloyl-, Syringoyl-, Cumaroyl- und Sinapoylcholin vertreten.

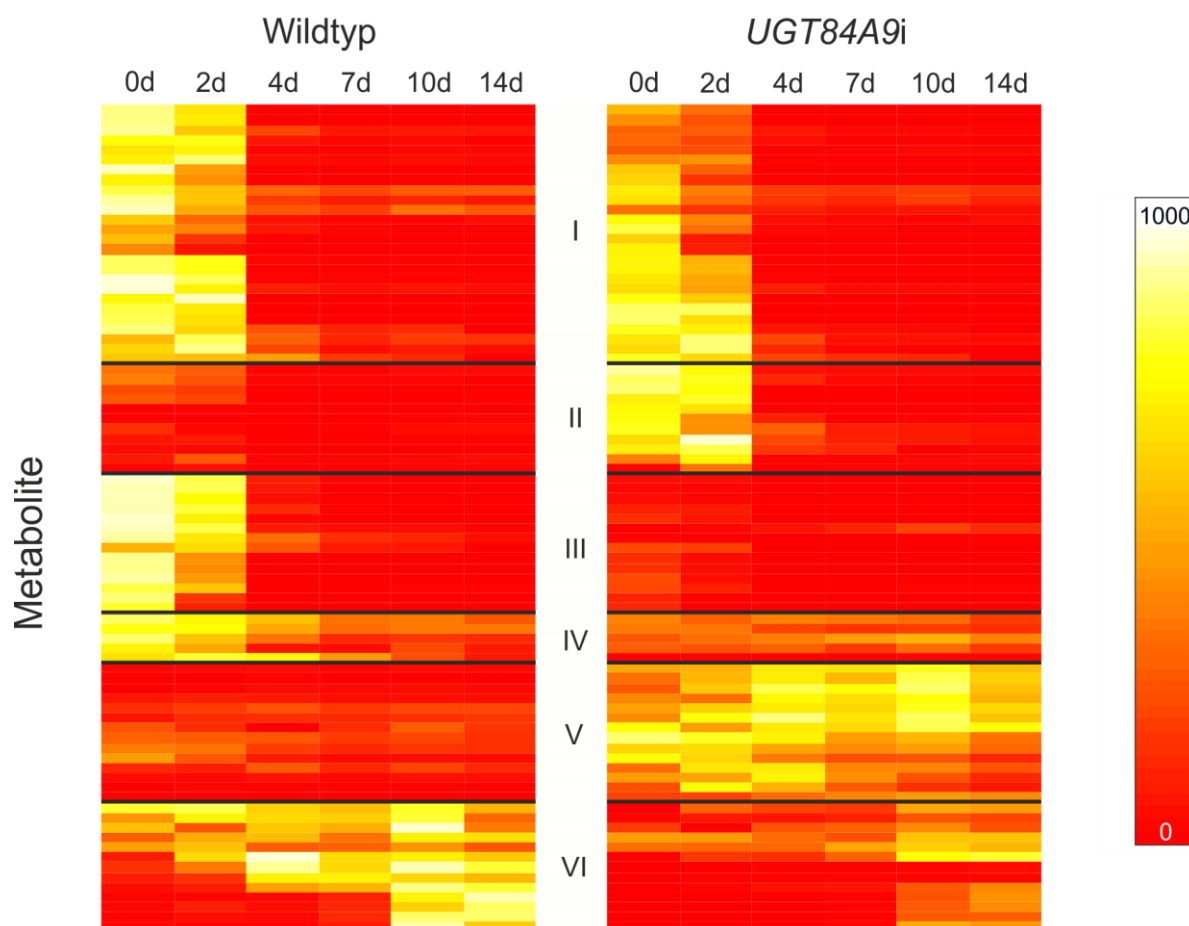


Abbildung 3-7: Hierarchische Clusteranalyse der quantifizierten Metabolite von Wildtyp- und *UGT84A9i*-Samen bzw. Keimlingen (Keimblättern; 2, 4, 7, 10, 14 DAS). Die Zeilen stellen die quantifizierten Metabolite aus Tabelle 6-11 dar, wobei die Reihenfolge identisch zu der in Tabelle 6-11 ist. Die Intensität der Metabolite ist entsprechend der Legende (rechts) farblich dargestellt. Die Einteilung der Metabolite in sechs Cluster ist durch die schwarzen Trennlinien gekennzeichnet.

Zu Cluster II können elf Metabolite gezählt werden. Diese waren fast ausschließlich in reifen *UGT84A9i*-Samen und zwei Tage alten Keimblättern detektierbar. Für zehn der elf Metabolite konnte ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und *UGT84A9i* nachgewiesen werden. Zu Cluster zwei gehören fünf unbekannte phenolische Cholinester sowie 4-O-Glucosylsinapoylcholin, 4-O-Hexosylmethylsinapinsäure und Kämpferol-3-O- β -sophorosid.

Cluster III umfasst 14 Metabolite, die ebenso wie bei den vorherigen Clustern vorwiegend in reifen Wildtyp-Samen und zwei Tage alten Keimblättern zu finden sind. Für alle Metabolite wurde ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und *UGT84A9i* festgestellt. Der Cluster beinhaltet Metabolite wie Cinnamoyl-, Kaffeoyl-, Feruloyl-, 5-Hydroxyferuloyl- und 3,4-Dimethoxycinnamoylcholin. Weiterhin sind drei Kämpferol-Derivate und mehrere phenolische Cholinester (FC, SC), die mit Koniferyl- oder Sinapylalkohol verknüpft sind, vertreten.

Insgesamt fünf Metabolite können zu Cluster IV zugeordnet werden. Diese sind wieder überwiegend in reifen Samen und zwei Tage alten Keimblättern zu finden. Die Gruppe zeigt für alle Metaboliten einen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp und *UGT84A9i*, wobei sie in Wildtyp-Samen vermehrt detektiert wurden. Dies betrifft unter anderem zwei Kämpferol-Derivate sowie 1,6-Di-O-sinapoylglucose.

Die letzten zwei Cluster, V und VI, beinhalten 14 bzw. 13 Metabolite. Im Gegensatz zu den Clustern I bis IV sind die entsprechenden Metabolite vorwiegend in Keimlingen vertreten. Metabolite aus Cluster V finden sich hauptsächlich in den Keimblättern von *UGT84A9i*-Pflanzen und für Cluster VI ist dies genau umgekehrt. Typische Vertreter von Cluster V sind Hexoside von Sinapoyl- und Syringoylcholin, Sinapinsäure und Syringasäure sowie von Sinapoylcholin, das mit Koniferyl- oder Sinapylalkohol verknüpft ist. Zu Cluster VI gehören Sinapoylglucose und davon abgeleitete Verbindungen wie beispielsweise 1,2-Di-O-sinapoylgentiobiose oder Sinapoylmalat sowie Hexoside von Hydroxyzimt- und Benzoensäuren (Benzoensäure, Vanillinsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure).

Eine detaillierte Auflistung aller quantifizierter Metabolite ist in Tabelle 6-11 im Anhang zu sehen. Die Reihenfolge der Metabolite entspricht der Reihenfolge in Abbildung 3-7. Zusätzlich ist die Clusternummer in der ersten Spalte vermerkt.

3.1.3 Auswirkungen des veränderten Metabolitenprofils auf die UVB-Stressantwort von Keimpflanzen

Während der Samenkeimung erfolgt durch das Enzym SCE (Sinapin-Esterase) die Spaltung von Sinapin in Sinapinsäure und Cholin. Die freigesetzte Sinapinsäure wird in der sich entwickelnden Keimpflanze durch die Aktivität der SGT zu Sinapoylglucose verestert und anschließend durch das Enzym SMT zu Sinapoylmalat konvertiert. Sinapoylmalat akkumuliert in den Vakuolen der Mesophyll- und Epidermiszellen der Blätter und dient dort als UV-Schutz. In *UGT84A9i*-Samen wurde ein signifikant erniedrigter Sinapin-Gehalt im Vergleich zu Wildtyp-Samen festgestellt, und in diesem Zusammenhang sollte der Einfluss von natürlicher UVB-Strahlung auf die Keimungsrate und Keimlingsentwicklung von transgenem Niedrig-Sinapin-Raps untersucht werden. Außerdem wurde der Frage nachgegangen, ob unter natürlicher UVB-Einstrahlung die Pflanzen vermehrt Sinapinsäureester oder Flavonoide zum Eigenschutz bilden.

Die Durchführung dieses Experimentes erfolgte am Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt in München in speziellen Versuchskammern der Abteilung „Experimentelle Umweltsimulation“ unter Anleitung von Dr. Andreas Albert. Zur genauen Untersuchung des Einflusses von UVB-Strahlung auf die Keimung und Keimlingsentwicklung erfolgte die Anzucht der Pflanzen in einem „Sonnensimulator“. Die Pflanzen wurden unmittelbar nach dem Aussäen auf Erde in die Sonnensimulatoren überführt und 16 Tage lang kultiviert. Als Kontrolle wurden Pflanzen angezogen, die keiner UVB-Strahlung ausgesetzt waren.

Zunächst wurde nach vier Tagen die Keimungsrate bestimmt. Zuvor wurden pro Linie (Wildtyp, *UGT84A9i* Linie 1 und *UGT84A9i* Linie 2) und Behandlung (Kontrolle und +UVB) 100 Samen auf Erde ausgesät. Sowohl die UVB-exponierten als auch die Kontrollsamensamen waren nach vier Tagen fast vollständig gekeimt, und es konnte somit weder ein Unterschied zwischen den Linien einer Behandlung noch zwischen den Behandlungen festgestellt werden.

Weiterhin wurden die Größe und Wuchsform der Keimlinge miteinander verglichen. In Abbildung 3-8 und Abbildung 3-9 sind Fotos von acht, elf und 16 Tage alten Keimlingen zu sehen. Es konnte kein wesentlicher Unterschied hinsichtlich der Entwicklung, Größe oder Wuchsform zwischen Wildtyp- und *UGT84A9i*-Pflanzen beobachtet werden. Es konnte allerdings beobachtet werden, dass UVB-exponierte Pflanzen eine Rotfärbung der Stängel und teilweise der Blätter zeigten. Dies ist als Antwort auf die UVB-Exposition zu interpretieren. Zusätzlich zeigten UVB-exponierte Pflanzen eine etwas dunklere Blattfärbung sowie leicht konvex geformte Blätter.

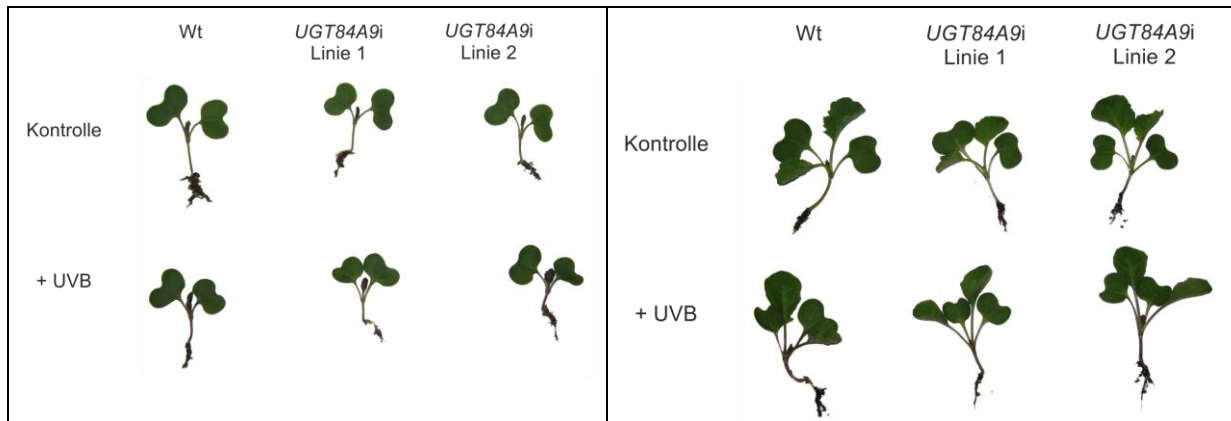


Abbildung 3-8: Acht (links) und elf (rechts) Tage alte Wildtyp- und *UGT84A9i*-Keimlinge des UVB-Expositionsexperimentes. Die obere Zeile entspricht den Kontrollpflanzen und die untere Zeile den UVB-exponierten Pflanzen. Dargestellt ist jeweils eine Pflanze pro Linie (v. l. n. r.: Wildtyp, *UGT84A9i*-Linie 1, *UGT84A9i*-Linie 2).

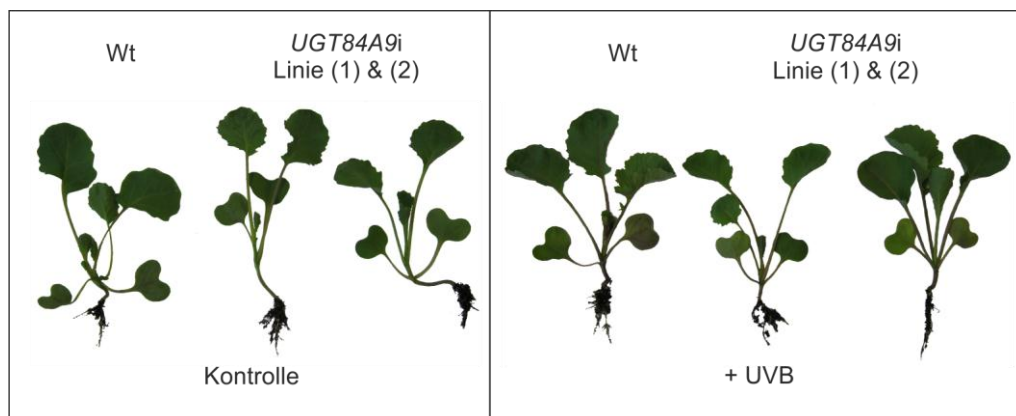


Abbildung 3-9: 16 Tage alte Wildtyp- und *UGT84A9i*-Keimlinge des UVB-Expositionsexperimentes. Die linke Grafik entspricht den Kontrollpflanzen und die rechte Grafik den UVB-exponierten Pflanzen. Dargestellt ist jeweils eine Pflanze pro Linie (v. l. n. r.: Wildtyp, *UGT84A9i*-Linie 1, *UGT84A9i*-Linie 2).

Weiterhin wurde nach vier, acht, elf und 16 Tagen Kultivierung von jeder Linie Pflanzenmaterial geerntet und die Keimblätter hinsichtlich löslicher phenolischer Metabolite mittels RP-HPLC-PDA analysiert. In Abbildung 3-10 und Abbildung 3-11 ist die absolute Quantifizierung der Metabolite Sinapoylglucose, Sinapin und Sinapoylmalat für Kontrollpflanzen sowie für UVB-exponierte Pflanzen zu sehen. Bereits vier Tage nach Keimung war in den Keimblättern von Wildtyp und *UGT84A9i*-Pflanzen Sinapin nur in geringer Menge detektierbar und acht Tage nach der Keimung unter dem Detektionslimit. Im Gegensatz dazu stieg der Sinapoylmalat-Gehalt während der Keimlingsentwicklung kontinuierlich an. Sinapoylglucose konnte über den dargestellten Zeitraum nur in geringen Konzentrationen nachgewiesen werden. Das Akkumulationsprofil von Sinapoylglucose, Sinapin und Sinapoylmalat unterschied sich kaum zwischen den Behandlungen (Kontrolle, +UVB) einer Linie.

Erwartungsgemäß ist der Unterschied zwischen Wildtyp und *UGT84A9i* größer als zwischen den Behandlungen einer Linie.

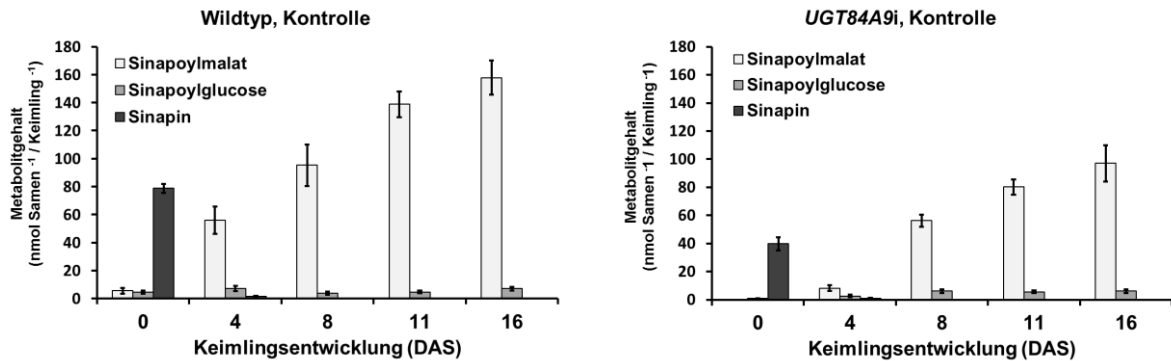


Abbildung 3-10: Akkumulation von Sinapoylmalat, Sinapoylglucose und Sinapin in reifen Samen bzw. 4, 8, 11 und 16 Tage alten Keimblättern von *UGT84A9i*- und Wildtyp-Pflanzen ohne erhöhte UVB-Exposition.

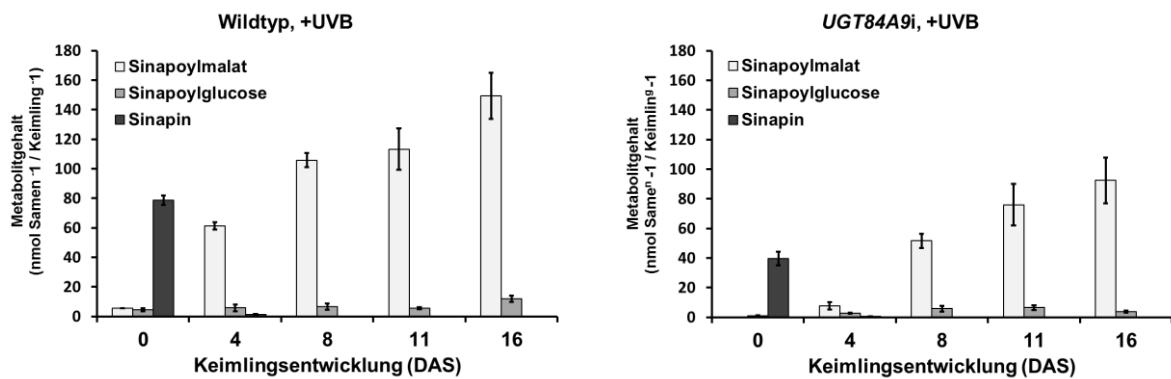


Abbildung 3-11: Akkumulation von Sinapoylmalat, Sinapoylglucose und Sinapin in reifen Samen bzw. 4, 8, 11 und 16 Tage alten Keimblättern für UVB-exponierte Wildtyp- und *UGT84A9i*-Pflanzen.

Die Metabolitenprofile der vier, acht, elf und 16 Tage alten Keimblätter ist in Abbildung 3-12 und Abbildung 3-13 illustriert. Die Keimblätter von vier Tage alten Keimlingen (Abbildung 3-12) zeigen zwischen Wildtyp und *UGT84A9i* noch deutliche Unterschiede im Metabolitenprofil. In den Wildtyp-Keimblättern wurde Sinapin vollständig zu Sinapinsäure und Cholin hydrolysiert und anschließend zu Sinapoylglucose und Sinapoylmalat umgewandelt. In den UVB exponierten Pflanzen begann zudem die Synthese von Quercetin-Derivaten (Peaks Q1, Q2 und Q3). In den Keimblättern von *UGT84A9i*-Pflanzen hingegen war Sinapoylmalat unter dem Detektionslimit und Sinapoylglucose nur in geringen Konzentrationen vorhanden. Das Fehlen von Sinapoylmalat in vier Tage alten *UGT84A9i*-Keimblättern wird auf den reduzierten Sinapin-Gehalt in reifen Samen und damit auf das Fehlen des Präkursors für die Sinapoylmalat-Biosynthese zurückgeführt. Auch in vier Tage alten UVB-exponierten *UGT84A9i*-Keimblättern konnte die Synthese von Quercetin-Derivaten (Q1, Q7) beobachtet werden.

In acht Tage alten Keimblättern ist für *UGT84A9i* die Akkumulation von Sinapoylmalat sowohl für die Kontrolle als auch die UVB-exponierten Pflanzen zu beobachten. Weiterhin wurde festgestellt, dass UVB-exponierte Pflanzen (Wildtyp und *UGT84A9i*) vermehrt Quercetin-Derivate synthetisieren (Q1 bis Q7), wohingegen in Kontrollpflanzen nur wenige Quercetin-Derivate detektierbar waren (Q2, Q3) und stattdessen Kämpferol-Derivate (K1, K2) dominierten. Der Vergleich zwischen Wildtyp und *UGT84A9i* (Kontrolle sowie UVB-Exposition) zeigte deutliche quantitative Unterschiede. Dagegen gab es kaum Unterschiede bezüglich des Vorhandenseins von Metaboliten, so dass es zu einer Annäherung der Metabolitenprofile zwischen Wildtyp und *UGT84A9i* kam.

Die HPLC-Elutionsprofile von elf und 16 Tage alten Keimblättern sind Abbildung 3-13 zu sehen. Für UVB-exponierte Pflanzen wurde wie bei acht Tage alten Keimblättern eine vermehrte Biosynthese von Quercetin-Derivaten gesehen (Q1 bis Q7). In den Keimblättern der Kontrollpflanzen überwogen wieder Kämpferol-Derivate (K1, K2).

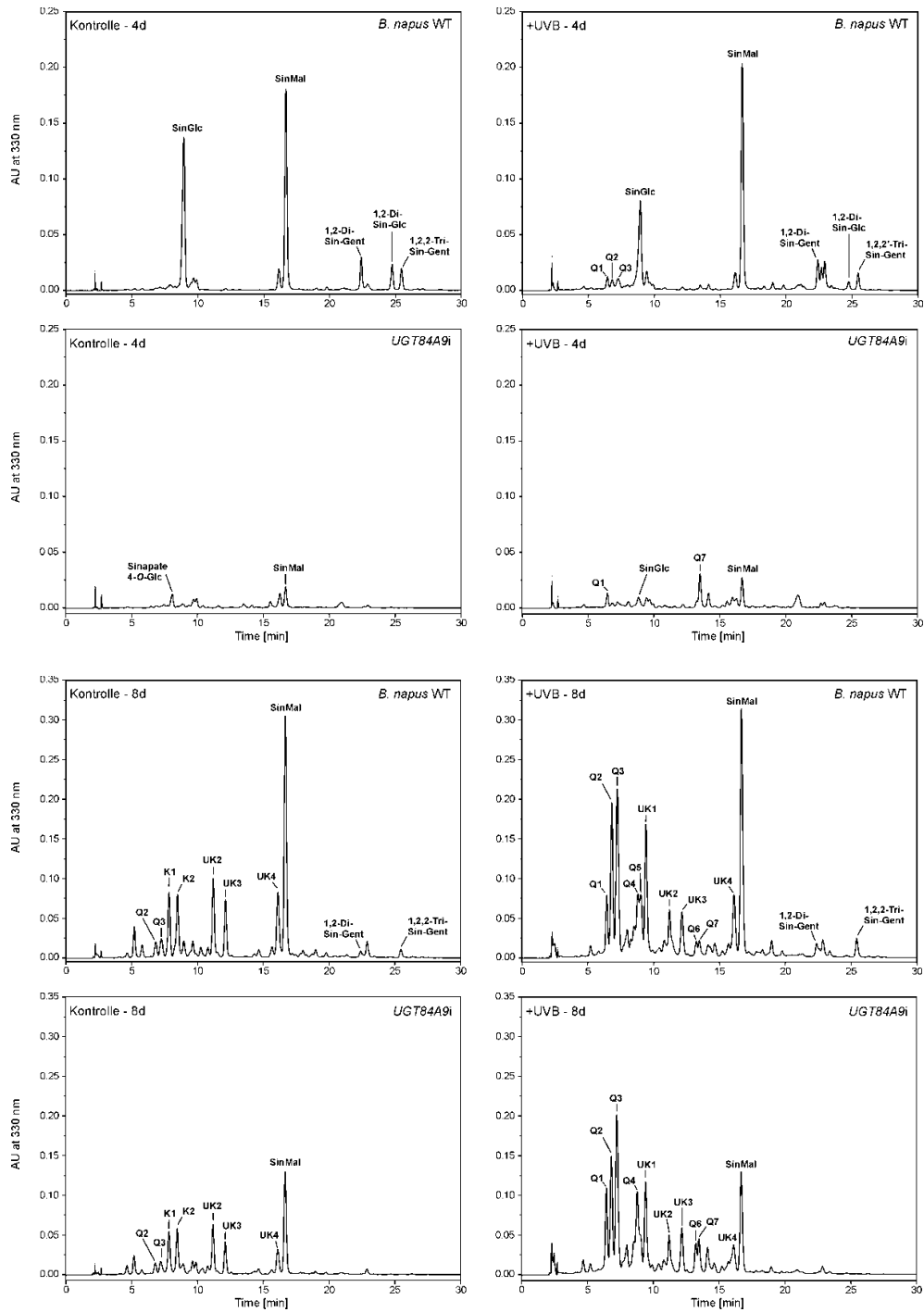


Abbildung 3-12: HPLC-Elutionsprofile methanolischer Extrakte von vier und acht Tage alten Wildtyp- und *UGT84A9i*-Keimblättern. Links sind die Elutionsprofile der Kontrollpflanzen und rechts die Elutionsprofile der UVB-exponierten Pflanzen dargestellt.

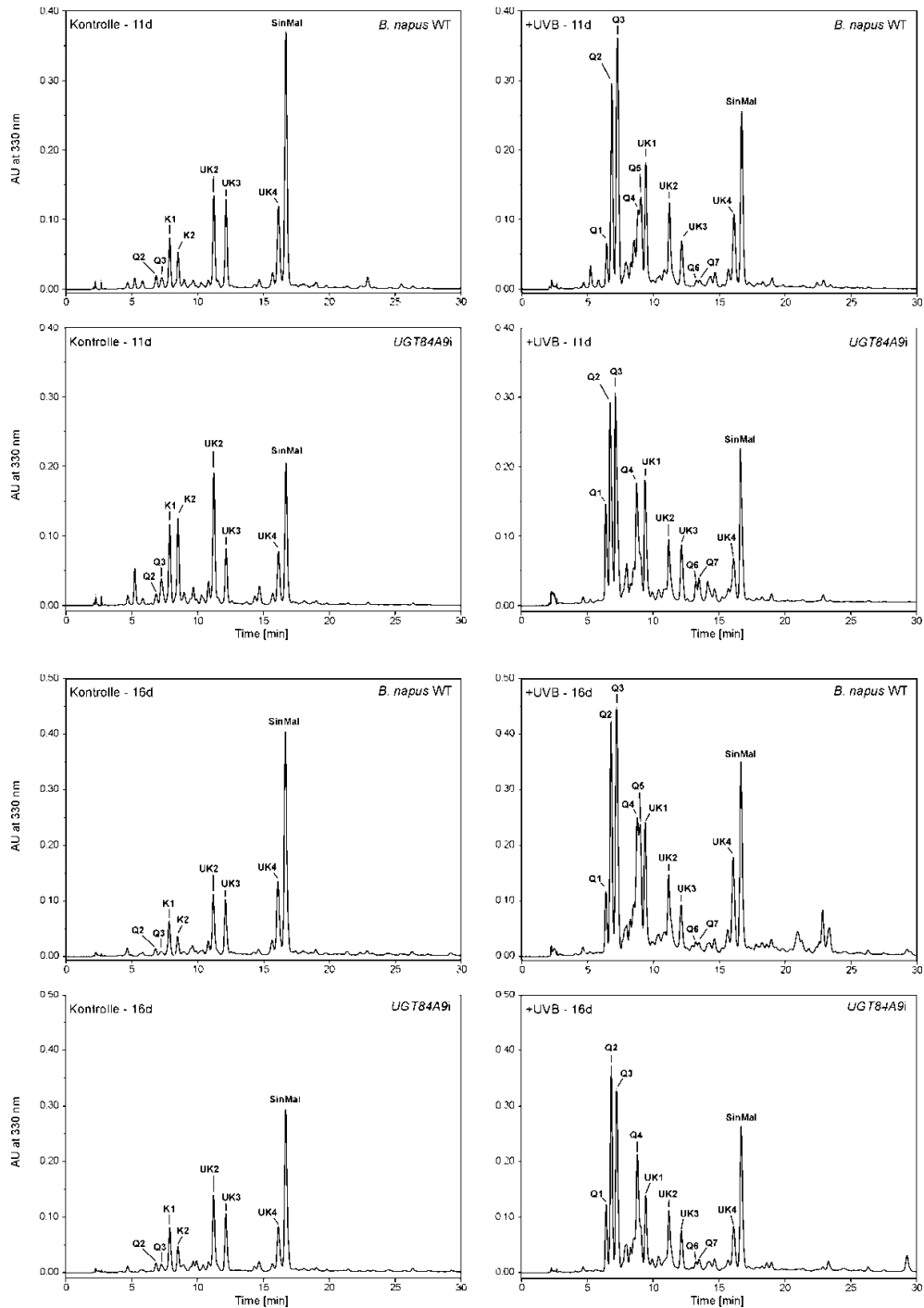


Abbildung 3-13: HPLC-Elutionsprofil methanolischer Extrakte von elf und 16 Tage alten Wildtyp- und *UGT84A9i*-Keimblättern. Links sind die Elutionsprofile der Kontrollpflanzen und rechts die Elutionsprofile der UVB-exponierten Pflanzen dargestellt.

Bereits die visuelle Inspektion der Metabolitenprofile von vier, acht, elf und 16 Tage alten Keimblättern von Wildtyp- und *UGT84A9i*-Pflanzen lässt erkennen, dass die Pflanzen als Antwort auf UVB-Einstrahlung vermehrt Flavonoide anstelle von Sinapinsäureestern bilden. Die Quantifizierung von Kämpferol- und Quercetin-

Derivaten ist in Abbildung 3-14 dargestellt. Hieraus geht hervor, dass vorwiegend Quercetin- anstelle von Kämpferol-Derivaten bei erhöhter UVB-Exposition gebildet werden, wobei dies gleichermaßen für Wildtyp wie für *UGT84A9i* zutrifft.

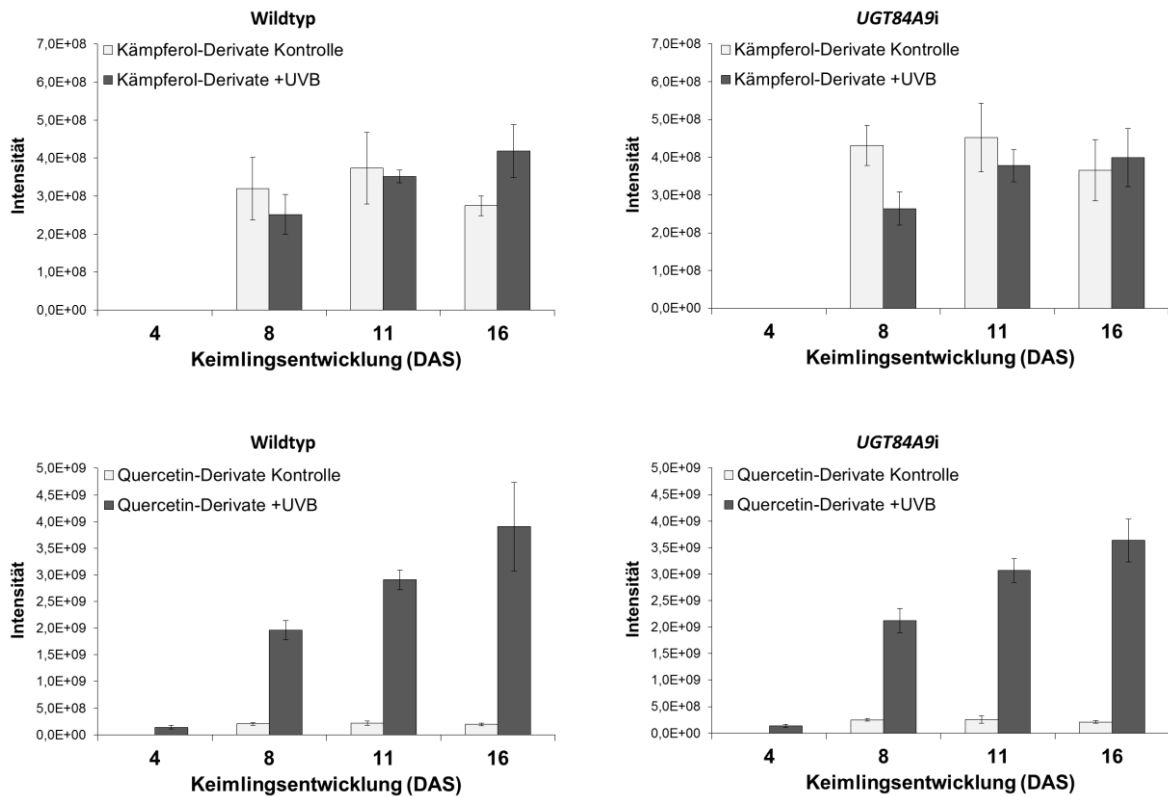


Abbildung 3-14: Relative Quantifizierung von Kämpferol- und Quercetin-Derivaten während der Keimlingsentwicklung für Wildtyp und *UGT84A9i*.

3.2 Veränderungen des Metabolitenprofils durch samenspezifische Co-Suppression von *UGT84A9* und *BnSCT*

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Metaboliten-Analysen für Rapspflanzen dargestellt, die samenspezifisch sowohl das Enzym UDP-Glucose:Sinapat-Glucosyltransferase (*UGT84A9*) als auch das Enzym 1-O-Sinapoylglucose:Cholin-Sinapoyltransferase (*SCT*) supprimieren. Zur Kennzeichnung der Pflanzen wird die Bezeichnung *UGT84A9i/BnSCTi* verwendet. Der entsprechende Wildtyp ist in diesem Fall die Sorte Lisora. Durch die kombinierte Suppression der Enzyme *UGT84A9* und *BnSCT* sollte, im Vergleich zu *UGT84A9i*-Samen, eine noch stärkere Absenkung des Sinapin- und Gesamt-Sinapinsäureester-Gehaltes erreicht werden.

Für das Profiling wurde die *UGT84A9i/BnSCTi*-Rapslinie mit der größten Gesamt-Sinapinsäureester-Absenkung selektiert. Diese Linie wurde zweimal kultiviert und beerntet. Demnach erfolgte die Untersuchung der Generationen T4 und T5. Es wurden nur solche Veränderungen im Metabolitenprofil als signifikant bewertet, die in beiden Kultivierungen auftraten.

Das Metabolitenprofil der *UGT84A9i/BnSCTi*-Rapslinie sowie des entsprechenden Wildtyps wurde für vier Stadien der Samenentwicklung (2, 3, 5 und 7 WAF) analysiert. Zusätzlich wurde für 2, 4, 7, 10 und 14 Tage alte Keimlinge die Konzentrationsänderung von Sinapin, Sinapoylglucose und Sinapoylmalat betrachtet.

3.2.1 Veränderungen während der Samenentwicklung

3.2.1.1 Konzentrationsänderung von Sinapoylmalat, Sinapoylglucose und Sinapin während der Samenentwicklung

Für *UGT84A9i/BnSCTi* und den Wildtyp wurde die Konzentrationsänderung der Metabolite Sinapoylmalat, Sinapoylglucose und Sinapin während der Samenentwicklung analysiert. Wie in Abbildung 3-15 zu sehen, nahm der Gehalt an Sinapoylglucose und Sinapoylmalat in Wildtyp-Samen während der Samenentwicklung zu, wobei im Vergleich zu Sinapin beide Metabolite in geringer Konzentration vorlagen. Sinapin begann im grünen, voll entwickelten Samen zu akkumulieren und erreichte nach einem sprunghaften Anstieg im reifen Samen die maximale Konzentration. In *UGT84A9i/BnSCTi*-Samen kam es bis zu Stadium C ebenfalls zu einer vergleichbaren Zunahme an Sinapin, Sinapoylglucose und Sinapoylmalat wie in Wildtyp-Samen. In reifen Samen war der Gehalt an Sinapin, Sinapoylglucose und Sinapoylmalat allerdings vermindert.

Veränderungen im Gehalt von Sinapin, Sinapoylglucose und Sinapoylmalat zwischen *UGT84A9i/BnSCTi*- und Wildtyp-Samen konnten nur in reifen Samen gezeigt werden.

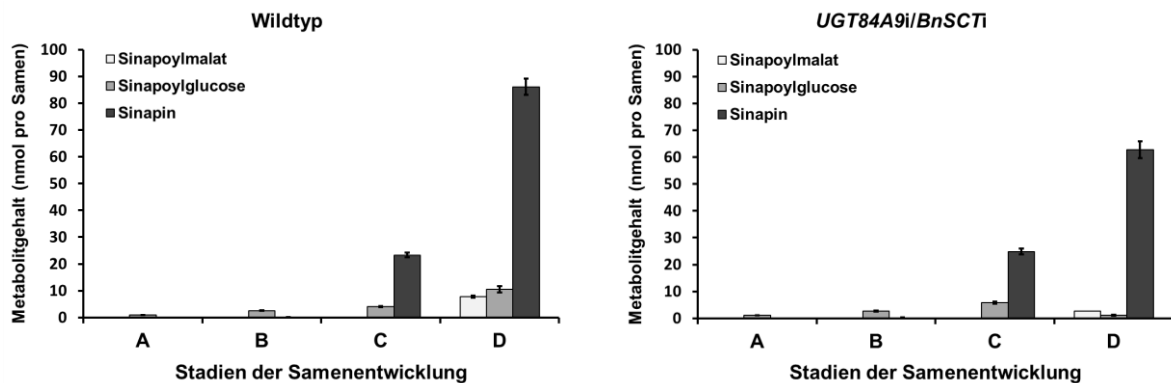


Abbildung 3-15. Konzentration von Sinapoylmalat, Sinapoylglucose und Sinapin während der Samenentwicklung (Stadium A, B, C, D) für Wildtyp und *UGT84A9i/BnSCTi*.

3.2.1.2 Sinapin und Gesamt-Sinapinsäureester-Gehalt in reifen Samen

In Abbildung 3-16 ist der Gehalt von Sinapin, restlichen Sinapinsäureestern sowie der Gesamt-Sinapinsäureester für reife Wildtyp- und *UGT84A9i/BnSCTi*-Samen der Generationen T4 und T5 dargestellt. Die *UGT84A9i/BnSCTi*-Linie zeigte für beide Kultivierungen eine stabile Absenkung des Sinapin-Gehaltes auf einen gemittelten prozentualen Wert von 73 %. Die Reduktion der verbleibenden Sinapinsäureester betrug im Mittel 38 %. Bezogen auf den Gesamt-Sinapinsäureester-Gehalt liegt die mittlere Absenkung bei 63 %.

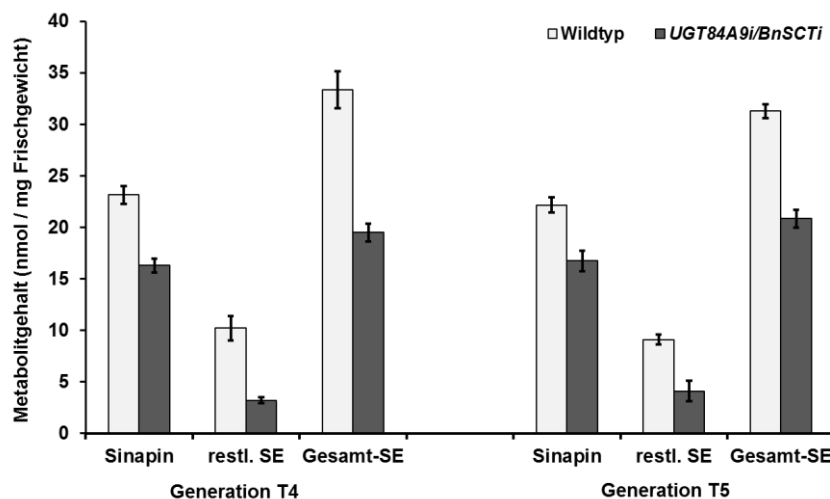


Abbildung 3-16: Konzentration von Sinapin, restlichen Sinapinsäureestern (restl. SE) und Gesamt-Sinapinsäureestern (Gesamt-SE) für reife Wildtyp- und *UGT84A9i/BnSCTi*-Samen. Dargestellt sind die Ergebnisse von zwei unabhängigen transgenen Rapslinien und zwei unabhängigen Kultivierungen.

Die detaillierten Ergebnisse der Quantifizierung sind im Anhang in Tabelle 6-2 zusammengefasst. Für die Generationen T4 und T5 lässt sich somit eine stabile Absenkung des Sinapin und Gesamt-Sinapinsäureester-Gehaltes dokumentieren.

3.2.1.3 Analyse von Sekundärmetaboliten während der Samenentwicklung

Die Auswirkungen der simultanen Suppression von *UGT84A9* und *BnSCT* auf den Phenylpropanstoffwechsel während der Samenentwicklung wurde für die vier Stadien A, B, C und D untersucht. Auch hier wurden wieder vorwiegend phenolische Sekundärstoffe analysiert. Tabelle 3-8 stellt für jedes Samenentwicklungsstadium die Anzahl differenzieller Metabolite dar. Für die Stadien der frühen Samenentwicklung wurden keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen. Erst mit dem Eintritt in Entwicklungsstadium C wurden zehn differenzielle Metabolite detektiert, wobei diese alle in *UGT84A9i/BnSCTi*-Samen einen erniedrigten Gehalt zeigten. In reifen, transgenen Samen wurden 28 reduzierte und 14 induzierte Sekundärstoffe ermittelt.

Tabelle 3-8: Anzahl differenzieller Metabolite in den Samenentwicklungsstadien A – D für den Vergleich Wildtyp – *UGT84A9i/BnSCTi*.

Samenstadium	Anzahl differenzieller Metabolite (reduziert + induziert in <i>UGT84A9i/BnSCTi</i>)
A	0
B	0+0
C	10+0
D	28+14

Die Veränderungen des Metabolitengehaltes für *UGT84A9i/BnSCTi* und Wildtyp ist für die Samenentwicklungsstadien C und D in Tabelle 3-9 dokumentiert. Die Nummerierung der Metabolite in Tabelle 3-9 entspricht der Nummerierung in Tabelle 6-12 (Anhang). Die Tabelle beinhaltet alle Metabolite, die in Stadium C und D signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und *UGT84A9i/BnSCTi* zeigen. Dabei erfolgt die Einteilung in fünf Kategorien.

Die erste Kategorie umfasst alle Metabolite, die in Stadium C und D eine etwa gleich bleibende signifikante Konzentrationsabnahme zeigten. Hierzu gehören Vanilloyl-, Feruloyl- und Syringoylcholin. In der zweiten Kategorie sind alle Metabolite, deren Veränderungen im Metabolitengehalt sich vom Übergang von Stadium C zu D aufheben bzw. abnehmen. Hierzu zählen drei Cholinester sowie die 4-O-Hexoside von Vanilloyl- und Syringoylcholin.

In der dritten Kategorie sind alle Metabolite, deren Gehalt sich in transgenen Samen während der Samenentwicklung weiter vermindert hat und sich der Effekt aus Stadium C in Stadium D weiter verstärkt. Diese Kategorie beinhaltet allerdings nur

zwei Metabolite: 3,4-Dimethoxycinnamoylcholin sowie einen unbekanntes Cholinester. Für die Metabolite Sinapin und Sinapoylglucose konnte in Stadium C keine Konzentrationsveränderung festgestellt werden.

Die letzten beiden Kategorien beinhalten alle Metabolite, die nur in reifen Samen eine Konzentrationsänderung aufweisen. Dies umfasst 22 reduzierte und 14 induzierte Verbindungen. Zu den reduzierten Verbindungen gehören z. B. 1-O-Sinapoylglucose sowie davon abgeleitete Derivate und verschiedene phenolische Cholinester. Induzierte Verbindungen sind vorwiegend glycosilierte Hydroxyzimt- oder Hydroxybenzoesäuren.

Tabelle 3-9: Metabolite mit verändertem Gehalt in Samen von *UGT84A9i/BnSCTi* für die Samenentwicklungsstadien C und D. Signifikante Veränderungen sind in schwarz dargestellt; nicht signifikante Veränderungen in grau; * unter dem Detektionslimit in *UGT84A9i/BnSCTi*; n.d. – nicht detektierbar.

Nr.	Metabolit	Verhältnis <i>UGT84A9i/BnSCTi</i> zu Wt	
		Stadium C	Stadium D
Veränderungen im Metabolitengehalt von <i>UGT84A9i/BnSCTi</i>, die im Verlauf der Samenentwicklung konstant bleiben:			
7	Vanilloylcholin	*	*
13	Feruloylcholin	0,11	0,11
55	Syringoylcholin	*	*
Veränderungen im Metabolitengehalt von <i>UGT84A9i/BnSCTi</i>, die sich im Verlauf der Samenentwicklung abschwächen:			
3	4-O-Hexosylvanilloylcholin	0,31	0,54
4	4-O-Hexosylsyringoylcholin	*	0,90
24	Cinnamoylcholin	*	n.d.
62	UK#2 (phenolischer Cholinester)	0,41	1,30
72	UK#5 (Cholinester)	0,14	0,24
Veränderungen im Metabolitengehalt von <i>UGT84A9i/BnSCTi</i>, die sich im Verlauf der Samenentwicklung verstärken (Konzentrationsabnahme):			
23	3,4-Dimethoxycinnamoylcholin	0,23	0,18
79	UK#10 (Cholinester)	0,29	0,17
Metabolite, deren Gehalt nur in reifen <i>UGT84A9i/BnSCTi</i>-Samen vermindert ist:			
8	Kaffeoylcholin	n.d.	*
9	5-Hydroxyferuloylcholin	0,82	0,18
16	Sinapoylcholin	1,07	0,73
21	SC(4-O-8')S	0,72	0,41

Tabelle 3-9 (Fortsetzung).

Nr.	Metabolit	Verhältnis <i>UGT84A9i/BnSCTi</i> zu Wt	
		Stadium C	Stadium D
Metabolite, deren Gehalt nur in reifen <i>UGT84A9i/BnSCTi</i>-Samen vermindert ist:			
27	FC(4-O-8')S-di-sin	1,21	0,19
28	FC(4-O-8')G-di-sin	1,07	0,22
29	SC(4-O-8')G-di-sin	0,71	0,19
34	1-O-Sinapoylglucose	1,20	0,14
38	2-O-Sinapoyl-S-malat	3,46	0,18
39	1,2-Di-O-sinapoylgentiobiose	0,89	0,10
40	1,2-Di-O-sinapoylglucose	0,57	0,14
41	1,2,2'-Tri-O-sinapoylgentiobiose	1,01	0,23
42	1,6-Di-O-sinapoylglucose	1,01	0,08
50	O-Hexosyloxybenzoesäure	n.d.	0,12
57	O-Hexosylferulasäure	n.d.	*
58	2-O-Feruloyl-S-malat	n.d.	*
69	Cumaroylcholin	n.d.	0,24
71	4-O-Hexosylmethylsyringasäure	n.d.	0,07
77	UK#9 (phenolischer Cholinester)	n.d.	*
83	VC(4-O-8')G-sin	n.d.	*
84	VC(4-O-8')-O-methyl-G-sin	n.d.	0,07
86	UK#3 - Sinapoylglucose-Konjugat	n.d.	0,21
Metabolite, deren Gehalt nur in reifen <i>UGT84A9i/BnSCTi</i>-Samen erhöht ist:			
6	4-O-Glucosylsinapoylcholin	3,69	8,36
10	FC(4-O-8')G-4-O'-hexosid	2,15	2,27
11	FC(4-O-8')S-4-O'-hexosid	1,53	2,43
15	SC(4-O-8')G-4-O'-hexosid	2,16	2,93
43	4-O-β-Glucosylsyringasäure	n.d.	100
47	Kämpferol-3-O-(sin-soph)	n.d.	4,75
48	Kämpferol-3-O-glc-4'-O-(sin-glc)	n.d.	2,20
51	4-O-Dihexosylsinapoylcholin	n.d.	8,20
52	4-O-Hexosylferuloylcholin	1,57	2,69
53	SC-4-O-(hexosid-pentosid)	n.d.	100
59	4-O-Hexosylmethylsinapinsäure	n.d.	100
64	UK#4 (phenolischer Cholinester)	1,36	5,46
76	UK#8 (Cholinester)	n.d.	33,96
78	Sinapin-4-O-deoxyhexosid	n.d.	100

3.2.1.4 Analyse von Primärmetaboliten während der Samenentwicklung

Auch für wichtige Primärmetabolite wie Aminosäuren, organische Säuren und Kohlenhydrate wurden die Auswirkungen der simultanen Suppression von *UGT84A9* und *BnSCT* während der Samenentwicklung untersucht. Die Zusammenstellung differenzieller Primärmetabolite in Stadium C und D für *UGT84A9i/BnSCTi*-Samen ist in Tabelle 3-10 zu finden. Im Primärstoffwechsel wurden, analog zu den Veränderungen im Sekundärstoffwechsel, erste Veränderungen für transgene Samen in Stadium C detektiert. In Stadium C wurden acht Metabolite als signifikant reduziert bewertet. In reifen Samen konnte dieser Effekt jedoch nicht bestätigt werden. Lediglich Glucarsäure war sowohl in Stadium C als auch D induziert. Zusätzlich wurden in reifen Samen Ribonsäure und Phosphorsäure in leicht erhöhten Konzentrationen nachgewiesen. Für *UGT84A9i/BnSCTi*-Samen konnten somit im Primärstoffwechsel nur geringfügige Veränderungen beobachtet werden.

Tabelle 3-10: Ergebnis der Analyse von Primärmetaboliten der Entwicklungsstadien C und D für den Vergleich *UGT84A9i/BnSCTi* – Wildtyp. Nicht signifikante Veränderungen sind in grau dargestellt.

Nr.	Metabolit	Verhältnis <i>UGT84A9i/BnSCTi</i> zu Wt	
		Stadium C	Stadium D
8	L-Threonin	0,41	0,91
12	L-Glutamat	0,37	1,30
15	L-Glutamin	0,40	1,08
16	L-Arginin	0,26	0,86
17	L-Histidin	0,39	1,51
20	L-Tryptophan	0,44	1,45
21	β-Alanin	0,43	1,78
23	L-Ornithin	0,28	0,65
32	Ribonsäure	1,27	2,07
39	Glucarsäure	2,00	2,00
44	Phosphorsäure	0,57	2,06

Weiterhin wurde die drei abundantesten Kohlenhydrate Glucose, Fructose und Saccharose absolut quantifiziert (Abbildung 6-3, Abbildung 6-4, Anhang). Für diese Metabolite konnte kein signifikanter Unterschied im Gehalt zwischen transgenen Samen und Wildtyp festgestellt werden.

3.2.1.5 Konzentrationsänderung von Cholin in reifen Rapssamen

Die Absenkung einer Vielzahl phenolischer Cholinester in *UGT84A9i/BnSCTi*-Samen könnte mit einer Zunahme des Gehaltes an freiem Cholin verbunden sein. Um dies zu verifizieren, wurde eine absolute Quantifizierung von freiem Cholin durchgeführt. Diese ergab im Mittel eine 8-fache Erhöhung in *UGT84A9i/BnSCTi*-Samen (Abbildung 3-17). Die Zunahme an freiem Cholin in *UGT84A9i/BnSCTi*-Samen betrug im Mittel 3,12 nmol/mg Frischgewicht. Die Differenz des Sinapin-Gehaltes zwischen Wildtyp und *UGT84A9i/BnSCTi* betrug hingegen 6,14 nmol/mg Frischgewicht. Somit akkumulierte das durch die Sinapinabsenkung überschüssige freie Cholin nur partiell in transgenen Samen.

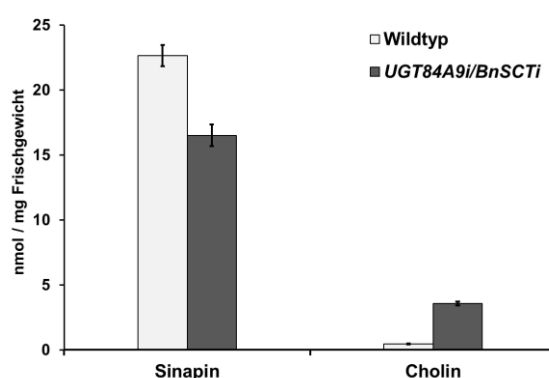


Abbildung 3-17: Konzentration von Sinapin und freiem Cholin für reifen Wildtyp- und *UGT84A9i/BnSCTi*-Samen.

3.2.1.6 Analyse von Zellwand-gebundenen Phenolen von reifen Rapssamen

Zur Klärung der Frage, ob die Sinapinabsenkung und die damit verbundenen Stoffwechselveränderungen eine Auswirkung auf Zellwand-gebundene Phenole bewirken, wurde der Zellwand-gebundene HCA- und HBA-Pool sowie abgeleitete Alkohole und Aldehyde in reifen Samen analysiert. Die signifikanten Veränderungen zwischen *UGT84A9i/BnSCTi* und Wildtyp sind in Tabelle 3-11 zusammengefasst. Die detaillierten Ergebnisse sind im Anhang in Tabelle 6-5 vermerkt.

Tabelle 3-11: Ergebnisse der Analyse von Zellwand-gebundenen Phenolen in reifen *UGT84A9i/BnSCTi*- und Wildtyp-Samen.

Metabolit	Verhältnis
	<i>UGT84A9i/BnSCTi</i> zu Wildtyp
Ferulasäure	1,45
Vanillinsäure	1,25
Syringasäure	2,01
Syringaldehyd	1,82

In transgenen Samen konnten nur geringfügige Veränderungen von Zellwand-gebundenen Phenolen nachgewiesen werden. Ferula-, Vanillin- und Syringasäure hatten in *UGT84A9i/BnSCTi*-Samen einen leicht erhöhten Gehalt. Dies gilt ebenso für Syringaldehyd.

Die simultane Suppression von *UGT84A9* und *BnSCT* hat demzufolge nur geringfügige Auswirkungen auf den Gehalt von Zellwand-gebundenen Phenolen und es ist keine Verschiebung des Sinapinsäure-Pools von der löslichen Fraktion zu Zellwand-gebundenen Phenolen zu beobachten.

3.2.1.7 Analyse von Hydroxyzimtsäure- und Hydroxybenzoesäure-Äquivalenten von reifen Rapssamen

Um eine verbesserte semi-quantitative Bewertung der metabolischen Veränderungen zu erreichen, wurde eine Analyse von Hydroxyzimt- und Hydroxybenzoesäure-Äquivalenten durchgeführt. Hierzu wurde die lösliche Fraktion nach Verseifung hinsichtlich ihrer Zusammensetzung und ihres Gehaltes von Hydroxyzimt- und Hydroxybenzoesäuren und den zugehörigen Alkoholen und Aldehyden untersucht. Signifikante Ergebnisse sind in Tabelle 3-12 zusammengefasst. Im Anhang in Tabelle 6-7 sind die detaillierten Ergebnisse vermerkt.

Tabelle 3-12: Ergebnisse der Analyse von HCAs, HBAs und abgeleiteten Alkoholen und Aldehyden in verseiften methanolischen Extrakten von reifen Wildtyp- und *UGT84A9i/BnSCTi*-Samen.

Metabolit	Verhältnis
	<i>UGT84A9i/BnSCTi</i> zu Wildtyp
<i>p</i> -Cumarsäure	0,26
Kaffeesäure	0,58
Ferulasäure	0,18
Sinapinsäure	0,63
Sinapylaldehyd	1,79
Syringaldehyd	0,68

Eine signifikante Erniedrigung in *UGT84A9i/BnSCTi*-Samen konnte für Cumar-, Kaffee-, Ferula- und Sinapinsäure sowie Syringaldehyd detektiert werden. Sinapylaldehyd hingegen wurde in transgenen Samen vermehrt detektiert. Die Absenkung der Hydroxyzimtsäuren deckt sich mit der Konzentrationserniedrigung der entsprechenden Cholinester und bestätigt die bereits beobachteten metabolischen Veränderungen in transgenen Samen. Die gleichzeitig beobachtete

Induktion einiger phenolischer Sameninhaltsstoffe kann jedoch nicht den Nettoverlust der phenolischen Hauptkomponenten kompensieren.

3.2.1.8 Analyse wichtiger agronomischer Merkmale von reifen Rapssamen

Mithilfe der NIRS-Technik wurde überprüft, ob die simultane Suppression von *UGT84A9* und *BnSCTi* einen Einfluss auf wichtige agronomische Merkmale wie Öl-, Protein- und Glucosinolatgehalt sowie Rohfaserkomponenten (NDF: Neutrale-Detergenz-Faser, ADF: Säure-Detergenz-Faser, ADL: Säure-Detergenz-Lignin) und die Fettsäurezusammensetzung (Ölsäure C18:1, Linolensäure C18:3, Erucasäure C22:1) hat. Die Ergebniszusammenstellung ist in Tabelle 3-13 zu finden.

Der Ölgehalt in den Rapssamen sollte zwischen 50 % und 60 % liegen und der Proteingehalt zwischen 17 % bis 25 %. Sowohl der Wildtyp als auch die *UGT84A9i/BnSCTi*-Linie erfüllen diese Kriterien. Bei einer 00-Rapssorte sollte der Glucosinolat-Gehalt zusätzlich 25 µmol/g Samen nicht überschreiten. Auch diese Werte liegen für beide Rapslinien unter diesem Grenzwert, wobei die transgene Linie einen deutlich niedrigeren Glucosinolat-Gehalt besitzt als der Wildtyp.

Auch für die drei Samencharakteristika NDF, ADF und ADL konnten keine bedeutsamen Unterschiede zwischen Wildtyp und *UGT84A9i/BnSCTi* festgestellt werden.

Der Ölsäure-Gehalt sollte zwischen 51 % und 70 % und der Linolensäure-Gehalt zwischen 5 % und 14 % liegen. Der Gehalt an Erucasäure sollte bei 00-Rapssorten 2 % nicht überschreiten. Auch diese Richtwerte werden von den Wildtyp- und *UGT84A9i/BnSCTi*-Samen eingehalten, wobei kein Unterschied zwischen Wildtyp und *UGT84A9i/BnSCTi* detektiert wurde.

Für die erhobenen agronomischen Merkmale in Tabelle 3-13 konnte kein gravierender Unterschied zwischen Wildtyp und *UGT84A9i/BnSCTi* festgestellt werden.

Tabelle 3-13: Ergebnisse der NIRS Analysen wichtiger agronomischer Merkmale für Wildtyp und *UGT84A9i/BnSCTi*.

	Wildtyp	<i>UGT84A9i/BnSCTi</i>		Wildtyp	<i>UGT84A9i/BnSCTi</i>
Öl-Gehalt %	48,78 ± 1,71	45,01 ± 1,25	ADL %	5,19 ± 0,37	5,79 ± 0,40
Protein-Gehalt %	21,58 ± 1,71	21,79 ± 0,36	C18:1	63,74 ± 1,39	63,93 ± 1,63
GSL (µmol/g)	15,75 ± 1,92	9,95 ± 2,44	C18:3	10,16 ± 0,50	9,37 ± 0,39
NDF %	15,46 ± 0,48	17,61 ± 0,65	C22:1	< 2 %	< 2 %
ADF %	10,25 ± 0,62	12,35 ± 0,48			

3.2.2 Veränderungen während der Keimlingsentwicklung

Die Analyse des Metabolitenprofils von *UGT84A9i/BnSCTi*-Samen und des Wildtyps zeigte insbesondere in reifen Samen für Sekundärmetabolite eine Vielzahl von Veränderungen. Um die Konzentrationsänderung der Metabolite Sinapin, Sinapoylglucose und Sinapoylmalat während der Keimung zu beurteilen, wurden die Keimblätter von 2, 4, 7, 10 und 14 Tage alten Keimlingen analysiert.

3.2.2.1 Konzentrationsänderung von Sinapoylmalat, Sinapoylglucose und Sinapin während der Keimlingsentwicklung

Die Quantifizierung der Metabolite Sinapin, Sinapoylmalat und Sinapoylglucose während der Keimlingsentwicklung ist für *UGT84A9i/BnSCTi* und den Wildtyp in Abbildung 3-18 dargestellt. In der Keimungsphase erfolgte eine rasche Metabolisierung von Sinapin für *UGT84A9i/BnSCTi* und den Wildtyp. Bereits nach vier Tagen konnte in beiden Rapslinien kein Sinapin mehr detektiert werden. In Wildtyp-Keimlingen erreicht Sinapoylglucose zwei Tage nach Keimung die maximale Konzentration und diese fiel dann fortwährend ab. In transgenen Keimlingen erreichte Sinapoylglucose ebenso in zwei Tage alten Keimlingen die maximale Konzentration, jedoch war der Anstieg im Vergleich zum Wildtyp nicht so groß. Die Sinapoylmalat-Akkumulation startete im Wildtyp bereits zwei Tage nach Keimung und setzte sich über den analysierten Zeitraum von 14 Tagen weiter fort. In *UGT84A9i/BnSCTi* war ebenso eine sukzessive Zunahme von Sinapoylmalat während der Keimlingsentwicklung zu beobachten, jedoch war die Konzentration in transgenen Samen im Vergleich zum Wildtyp verringert.

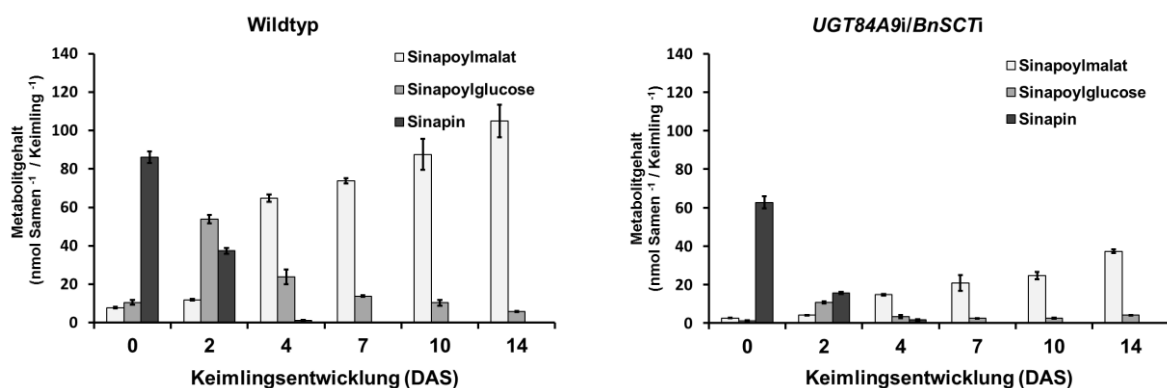


Abbildung 3-18: Konzentration von Sinapoylmalat, Sinapoylglucose und Sinapin während der Keimlingsentwicklung in Wildtyp und *UGT84A9i/BnSCTi*.

3.3 Veränderungen des Metabolitenprofils durch kombinierte samenspezifische Suppression von *UGT84A9* und Überexpression von *BnSCE3*

Wie bereits in der Einleitung (Kapitel 1.4) und dem Ergebnisteil (Kapitel 3.1 und 3.2) vorgestellt, gibt es verschiedene Strategien zur Absenkung des Sinapin- und Gesamt-Sinapinsäureester-Gehaltes in *B. napus*.

Die samenspezifische Suppression von *UGT84A9* resultierte in einer mittleren Absenkung des Sinapin-Gehaltes auf 50 % und des Gesamt-Sinapinsäureester-Gehaltes auf 44 % im Vergleich zum Wildtyp. Für diese Rapslinien wurde somit sowohl ein verminderten Gehalt von Sinapin als auch eine starke Abnahme von anderen Sinapinsäureestern, vor allem Derivate der 1-O-Sinapoylglucose, beobachtet.

Die Überexpression einer Sinapinesterase (*BnSCE3*) war die bisher erfolgreichste Strategie und resultierte in nahezu Sinapin-freien Rapslinien (Clauß et al., 2011). Für diese Rapslinien wird die Bezeichnung *BnSCE3OE* verwendet, wobei OE „Over Expression“ bedeutet. Diese Linien zeigten einen Sinapin-Gehalt von unter 5 % des Wildtyp-Niveaus. Abgesehen von Sinapin wurde in *BnSCE3OE*-Rapslinien allerdings nur eine marginale Konzentrationsänderung anderer Sinapinsäureester detektiert.

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde eine weitere Strategie zur Absenkung von Sinapinsäureestern in *B. napus* verfolgt: die gleichzeitige Suppression von *UGT84A9* und die Überexpression von *BnSCE3*. Das Ziel dieser Vorgehensweise war die Erzeugung nahezu Sinapin-freier Rapslinien, die gleichzeitig eine starke Absenkung anderer Sinapinsäureester aufweisen. Um das Potenzial dieses Ansatzes zu überprüfen wurde in einem „Proof of Principle“-Experiment eine Kreuzung von *UGT84A9i*- und *BnSCE3OE*-Rapspflanzen durchgeführt (Bezeichnung: *UGT84A9i/BnSCE3OE*) und die reifen Samen der uniformen F1-Generation hinsichtlich quantitativer Veränderungen des Metabolitenprofils analysiert. Hierzu wurden folgende Rapslinien in die Analyse einbezogen: *UGT84A9i/BnSCE3OE*, *UGT84A9i*, *BnSCE3OE*, Wildtyp Lisora (Wildtyp zu *BnSCE3OE*) und Wildtyp Drakkar (Wildtyp zu *UGT84A9i*).

3.3.1 Veränderungen in reifen Samen

3.3.1.1 Sinapin- und Gesamt-Sinapinsäureester-Gehalt

In Abbildung 3-19 sind die Ergebnisse der Quantifizierung von Sinapin, restlichen Sinapinsäureestern und Gesamt-Sinapinsäureestern in reifen Samen

zusammengefasst. Die detaillierten Angaben sind Tabelle 6-3 des Anhangs zu entnehmen. Die *BnSCE3OE*-Linie zeigte einen verbleibenden Sinapin-Gehalt von ca. 1 % im Vergleich zum Wildtyp (Lisora). Der Sinapin-Gehalt in *UGT84A9i*-Samen hingegen zeigte einen Gehalt von 57 % des Wildtyp-Niveaus (Drakkar). Die Kreuzung aus *UGT84A9i* und *BnSCE3OE* zeigte bezogen auf beide Wildtypen einen restlichen Sinapin-Gehalt von maximal 1 %. Die Konzentration verbleibender Sinapinsäureester unterscheidet sich stark zwischen *UGT84A9i*- und *BnSCE3OE*-Samen mit 15 % und 64 %. Durch die kombinierte Suppression von *UGT84A9* und Überexpression von *BnSCE3* kann der Gehalt verbleibender Sinapinsäureester auf ca. 17 % reduziert werden. Der Gesamt-Sinapinsäureester-Gehalt für *BnSCE3OE*-Samen reduziert sich somit auf 32 % und für *UGT84A9i*-Samen auf 44 % des jeweiligen Wildtyp-Niveaus. Die *UGT84A9i/BnSCE3OE*-Samen zeigten eine Reduktion auf 6 % – 8 % bezogen auf den Gehalt der Wildtypen Drakkar und Lisora.

Somit zeigt sich, dass die simultane Suppression von *UGT84A9* und die Überexpression von *BnSCE3* sowohl den Sinapin- als auch den Gesamt-Sinapinsäureester-Gehalt sehr stark erniedrigt.

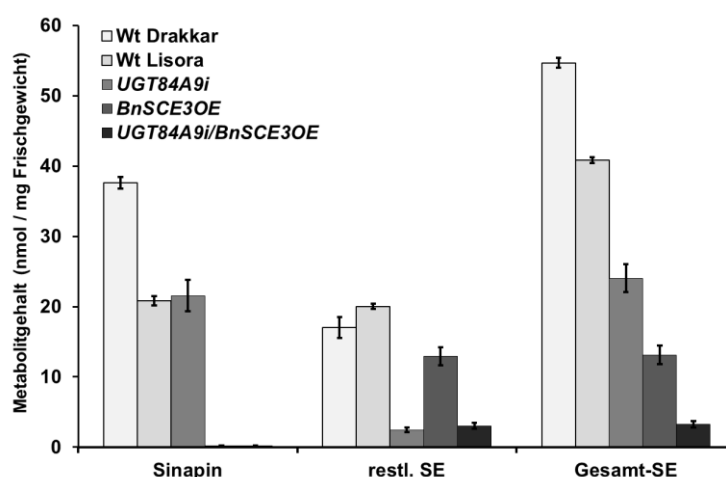


Abbildung 3-19: Konzentration von Sinapin, restlichen Sinapinsäureestern (restl. SE) und Gesamt-Sinapinsäureestern (Gesamt SE) für reife Samen der Linien Wildtyp Drakkar, Wildtyp Lisora, *UGT84A9i*, *BnSCE3OE* und *UGT84A9i/BnSCE3OE*.

3.3.1.2 Analyse von Sekundärmetaboliten

Um die Auswirkungen der kombinierten Suppression von *UGT84A9* und Überexpression von *BnSCE3* auf den Phenylpropanstoffwechsel detaillierter zu erfassen wurden reife *UGT84A9i/BnSCE3OE*-Samen hinsichtlich ihres Sekundärstoffgehaltes untersucht. In die Analyse einbezogen wurden die Parentalgeneration der *UGT84A9i/BnSCE3OE*-Pflanzen (*UGT84A9i*, *BnSCE3OE*) sowie die entsprechenden Wildtypen (Drakkar, Lisora). Folgende Vergleiche wurden

zur Identifizierung signifikanter Unterschiede durchgeführt: (1) *UGT84A9i* und Wildtyp Drakkar, (2) *BnSCE3OE* und Wildtyp Lisora, (3) *UGT84A9i/BnSCE3OE* und Wildtyp Drakkar und (4) *UGT84A9i/BnSCE3OE* und Wildtyp Lisora.

Die sich daraus ergebenden differenziellen Metabolite wurden in vier Kategorien eingeteilt. In der ersten Kategorie sind alle Metabolite, die in beiden transgenen Elternlinien (*UGT84A9i*, *BnSCE3OE*) und in den Kreuzungslinien (*UGT84A9i/BnSCE3OE*) im Vergleich zum Wildtyp in Hinblick auf ihre Konzentration signifikant erniedrigt oder erhöht sind (Tabelle 3-14). Die Anzahl signifikant reduzierter Metabolite beläuft sich auf 18 und die Anzahl erhöhter Metabolite auf 16. Zu den Metaboliten mit erniedrigtem Gehalt zählen beispielsweise die Cholinester der Hydroxyzimtsäuren (Kaffeoyl-, Feruloyl-, 5-Hydroxyferuloyl-, Sinapoylcholin), ein Kämpferol-Derivat sowie Sinapoyl- und Feruloylmalat. Weitere reduzierte Metabolite sind phenolische Cholinester (Feruloyl- und Sinapoylcholin), die mit Koniferyl- oder Syringylalkohol verknüpft sind und teilweise noch zusätzliche Sinapoyleinheiten tragen. Fast alle reduzierten Metabolite dieser Kategorie wurden in *UGT84A9i/BnSCE3OE*-Samen nur in sehr geringen Mengen detektiert. Zu den erhöht vorliegenden Sekundärstoffen zählen vorwiegend Hexoside bzw. Glucoside von Hydroxymzimt- und Hydroxybenzoesäuren und deren Cholinester sowie einige unbekannte phenolische Cholinester.

Tabelle 3-14: Statistisch signifikant veränderte Metabolite in reifen Samen der Linien *BnSCE3OE*, *UGT84A9i* sowie *UGT84A9i/BnSCE3OE* im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp. Wt (L) – Wildtyp Lisora; Wt (D) – Wildtyp Drakkar; * Metabolitgehalt unter dem Detektionslimit in den entsprechenden transgenen Rapslinien.

Nr.	Metabolit	Verhältnis			
		<i>BnSCE3OE</i> zu Wt (L)	<i>UGT84A9i</i> zu Wt (D)	<i>UGT84A9i/ BnSCE3OE</i> zu Wt (D)	<i>UGT84A9i/ BnSCE3OE</i> zu Wt (L)
8	Kaffeoylcholin	0,09	0,50	0,02	0,04
9	5-Hydroxyferuloylcholin	0,03	0,25	*	*
13	Feruloylcholin	0,07	0,21	*	*
16	Sinapoylcholin	0,09	0,57	0,01	0,01
18	FC(4-O-8')S	0,26	0,40	*	*
21	SC(4-O-8')S	0,31	0,45	*	*
23	3,4-Dimethoxycinnamoylcholin	*	0,07	*	*
26	FC(5-8')G	0,04	0,48	*	*
27	FC(4-O-8')S-di-sin	0,07	0,06	*	*
28	FC(4-O-8')G-di-sin	0,09	0,19	*	*
29	SC(4-O-8')G-di-sin	0,07	0,19	*	*
30	Kaffeoylgentiobiose	0,17	0,16	*	*

Tabelle 3-14 (Fortsetzung).

Nr.	Metabolit	Verhältnis			
		<i>BnSCE3OE</i> zu Wt (L)	<i>UGT84A9i</i> zu Wt (D)	<i>UGT84A9i/</i> <i>BnSCE3OE</i> zu Wt (D)	<i>UGT84A9i/</i> <i>BnSCE3OE</i> zu Wt (L)
33	Kämpferol-3-O-(sin-soph) -7-O-glc	0,47	0,45	0,07	0,09
38	2-O-Sinapoyl-S-malat	0,19	0,05	0,04	0,03
42	1,6-Di-O-sinapoylglucose	0,35	*	*	*
50	O-Hexosyloxybenzoesäure	*	*	*	*
58	2-O-Feruloyl-S-malat	*	*	*	*
86	UK#3 - Sinapoylglucose-Konjugat	0,41	0,02	0,04	0,05
4	4-O-Hexosylsyringoylcholin	31,93	6,96	10,76	30,12
15	SC(4-O-8')G-4-O'-hexosid	61,13	9,80	25,01	35,17
17	SC(4-O-8')S-4-O'-hexosid	69,83	3,35	3,83	50,62
43	4-O-β-Glucosylsyringasäure	4,24	5,67	5,46	13,56
45	4-O-β-Glucosyl-E-sinapinsäure	22,47	12,10	24,52	30,43
46	Kämpferol-3-O-β-soph	13,38	8,49	5,21	19,46
47	Kämpferol-3-O-(sin-soph)	9,69	16,84	8,77	19,41
51	4-O-Dihexosylsinapoylcholin	14,77	10,99	8,24	3,56
53	SC-4-O-(hexosid-pentosid)	77,66	5,76	6,16	21,04
54	O-Pentosylsinapinsäure	3,66	3,03	5,35	4,45
61	UK#1 (phenolischer Cholinester)	34,28	4,66	47,17	58,13
62	UK#2 (phenolischer Cholinester)	15,32	4,47	6,38	21,20
63	UK#3 (phenolischer Cholinester)	18,73	10,36	14,78	20,64
72	UK#5 (Cholinester)	3,20	3,56	9,29	3,18
78	Sinapin-4-O-deoxyhexosid	44,54	100	13,32	16,24
79	UK#10 (Cholinester)	3,26	2,77	14,92	2,69

In der zweiten Kategorie sind diejenigen Metabolite, die in *UGT84A9i*- und *UGT84A9i/BnSCE3OE*-Samen einen signifikanten Unterschied zeigten, aber nicht in *BnSCE3OE*-Samen (Tabelle 3-15). Demzufolge könnte der beobachtete Effekt in *UGT84A9i/BnSCE3OE*-Samen ausschließlich durch die Suppression von *UGT84A9* verursacht werden. Die Metabolite dieser Klasse sind in transgenen Samen ausschließlich erniedrigt. Hierzu zählen insgesamt elf Verbindungen, worunter sich mehrere Kämpferol-Derivate sowie Sinapoylglucose und davon abgeleitete Verbindungen wie z. B. 1,2-Di-O-sinapoylgentiobiose oder 1,2-Di-O-sinapoylglucose

befinden. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass die Konzentrationsabnahme der anderen Sinapinsäureester (außer Sinapin) in *UGT84A9i/BnSCE3OE*-Samen durch die Suppression von *UGT84A9* bedingt wird.

Tabelle 3-15: Statistisch signifikant veränderte Metabolite in reifen Samen der Linien *UGT84A9i* sowie *UGT84A9i/BnSCE3OE* im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp. Die nicht signifikanten Veränderungen der Linie *BnSCE3OE* sind grau hinterlegt. Wt (L) – Wildtyp Lisora; Wt (D) – Wildtyp Drakkar; * Metabolitgehalt unter dem Detektionslimit in den entsprechenden transgenen Rapslinien.

Nr.	Metabolit	Verhältnis			
		<i>BnSCE3OE</i> zu Wt (L)	<i>UGT84A9i</i> zu Wt (D)	<i>UGT84A9i</i> / <i>BnSCE3OE</i> zu Wt (D)	<i>UGT84A9i</i> / <i>BnSCE3OE</i> zu Wt (L)
32	Kämpferol-3-O-soph-7-O-glc	1,22	0,57	0,10	0,46
34	1-O-Sinapoylglucose	0,61	0,01	0,06	0,05
35	Kämpferol-4'-O-(sin-glc)-3,7-di-glc	0,70	0,38	0,05	0,35
37	Kämpferol-3-O-soph-7-O-(sin-glc)	0,79	0,53	*	0,01
39	1,2-Di-O-sinapoylgentiobiose	0,66	0,05	0,07	0,08
40	1,2-Di-O-sinapoylglucose	1,01	0,03	0,13	0,19
41	1,2,2'-Tri-O-sinapoylgentiobiose	0,88	0,10	0,11	0,26
70	O-Dihexosylsinapinsäure	1,00	0,35	*	*
71	4-O-Hexosyl-methylsyringasäure	0,84	0,07	0,10	0,12
83	VC(4-O-8')G-sin	1,32	0,07	*	*
85	UK#13 (phenolischer Cholinester)	0,75	0,44	0,26	0,56

Die dritte Kategorie beinhaltet nun im Gegensatz zur zweiten Kategorie diejenigen Metabolite, die in *BnSCE3OE*- und *UGT84A9i/BnSCE3OE*-Samen signifikant verändert sind, aber nicht in *UGT84A9i*-Samen (Tabelle 3-16). Diese Veränderungen in *UGT84A9i/BnSCE3OE*-Samen sollten nur durch Überexpression von *BnSCE3* verursacht sein. Dies betrifft lediglich vier Metabolite: Benzoylcholin, Feruloylcholin und Sinapoylcholin, die mit Koniferylalkohol verknüpft sind sowie ein strukturell unbekannter Cholinester.

Tabelle 3-16: Statistisch signifikant veränderte Metabolite in reifen Samen der Linien *BnSCE3OE* sowie *UGT84A9i/BnSCE3OE* im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp. Die nicht signifikanten Veränderungen der Linien *UGT84A9i* sind grau hinterlegt. Wt (L) – Wildtyp Lisora; Wt (D) – Wildtyp Drakkar; * Metabolitgehalt unter dem Detektionslimit in den entsprechenden transgenen Rapslinien.

Nr.	Metabolit	Verhältnis			
		<i>BnSCE3OE</i> zu Wt (L)	<i>UGT84A9i</i> zu Wt (D)	<i>UGT84A9i/ BnSCE3OE</i> zu Wt (D)	<i>UGT84A9i/ BnSCE3OE</i> zu Wt (L)
14	Benzoylcholin	0,06	1,77	0,27	0,26
19	FC(4-O-8')G	0,10	0,65	0,01	0,01
22	SC(4-O-8')G	0,06	0,56	*	0,01
74	UK#6 (phenolischer Cholinester)	*	1,98	*	*
82	UK#12 (Cholinester)	0,04	1,78	*	*

Zur letzten und vierten Klasse zählen Metabolite, die in *BnSCE3OE*- und *UGT84A9i*-Samen signifikante Veränderungen aufweisen und diese interessanterweise nicht in *UGT84A9i/BnSCE3OE*-Samen bestätigt werden konnten (Tabelle 3-17). Alle Metabolite dieser Kategorie wurden in *BnSCE3OE*- und *UGT84A9i*-Samen in erhöhter Konzentration gefunden. Dies betrifft einen unbekanntes phenolischen Cholinester sowie drei Hexoside bzw. Glucoside von Hydroxyzimtsäuren bzw. deren Cholinestern. Erstaunlicherweise befindet sich auch 4-O-Glucosylsinapoylcholin in dieser Klasse.

Tabelle 3-17: Statistisch signifikant veränderte Metabolite in reifen Samen der Linien *BnSCE3OE* sowie *UGT84A9i* im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp. Die nicht signifikanten Veränderungen der Linien *UGT84A9i/BnSCE3OE* sind grau hinterlegt. Wt (L) – Wildtyp Lisora; Wt (D) – Wildtyp Drakkar.

Nr.	Metabolit	Verhältnis			
		<i>BnSCE3OE</i> zu Wt (L)	<i>UGT84A9i</i> zu Wt (D)	<i>UGT84A9i/ BnSCE3OE</i> zu Wt (D)	<i>UGT84A9i/ BnSCE3OE</i> zu Wt (L)
6	4-O-Glucosylsinapoylcholin	6,40	14,81	1,85	1,55
59	4-O-Hexosyl- methylsinapinsäure	100	100	1,01	1,03
64	UK#4 (phenolischer Cholinester)	4,97	10,99	1,86	1,62
67	4-O-Hexosyl-5- hydroxyferuloylcholin	2,08	4,34	2,65	0,83

3.3.1.3 Analyse von Zellwand-gebundenen Phenolen

Um die Auswirkungen der Sinapinsäureester-Suppression auf Zellwand-gebundene Phenole zu untersuchen, wurde der Zellwand-gebundene HCA- und HBA-Pool sowie abgeleitete Alkohole und Aldehyde in reifen Samen analysiert. Das Ergebnis der Untersuchung ist in Tabelle 3-18 zusammengefasst. Wie bereits zuvor wurden folgende Vergleiche angestellt: (1) *UGT84A9i* und Wildtyp Drakkar, (2) *BnSCE3OE* und Wildtyp Lisora, (3) *UGT84A9i/BnSCE3OE* und Wildtyp Drakkar und (4) *UGT84A9i/BnSCE3OE* und Wildtyp Lisora.

Tabelle 3-18: Ergebnisse der Analyse von Zellwand-gebundenen Phenolen in reifen Samen der Linien *BnSCE3OE*, *UGT84A9i* sowie *UGT84A9i/BnSCE3OE* im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp. Nicht signifikante Veränderungen sind grau hinterlegt. Wt (L) – Wildtyp Lisora; Wt (D) – Wildtyp Drakkar.

Metabolit	Verhältnis			
	<i>BnSCE3OE</i> zu Wt (L)	<i>UGT84A9i</i> zu Wt (D)	<i>UGT84A9i/ BnSCE3OE</i> zu Wt (D)	<i>UGT84A9i/ BnSCE3OE</i> zu Wt (L)
<i>p</i> -Cumarsäure	0,84	0,78	0,47	0,56
Kaffeesäure	0,69	0,61	0,64	0,78
Ferulasäure	1,02	0,85	0,74	0,97
5-Hydroxyferulasäure	0,71	0,33	0,31	0,45
Sinapinsäure	0,60	0,41	0,30	0,49
Benzoesäure	1,06	1,25	0,87	0,87
Vanillinsäure	0,92	0,46	0,93	1,47
Syringasäure	1,79	1,17	1,59	2,03
Koniferylaldehyd	0,67	1,61	1,96	1,43
Sinapylaldehyd	0,83	0,99	1,48	1,51
4-Hydroxybenzaldehyd	0,49	0,95	1,42	1,32
Vanillaldehyd	0,56	0,96	1,43	1,51
Syringaldehyd	1,02	1,16	2,11	2,39
Koniferylalkohol	0,62	1,38	1,95	1,54
Sinapylalkohol	4,15	0,81	2,15	3,48

Nur für Sinapinsäure als Zellwand-gebundenes Phenol konnte in allen transgenen Linien (*BnSCE3OE*, *UGT84A9i*, *UGT84A9i/BnSCE3OE*) eine signifikante Verringerung detektiert werden. Dies korreliert mit der Absenkung des Gesamt-Sinapinsäureester-Gehaltes der löslichen Fraktion der reifen Samen. Die Komponenten *p*-Cumarsäure und Sinapylalkohol zeigten nur in *BnSCE3OE*- und

UGT84A9i/BnSCE3OE- und nicht in *UGT84A9i*-Samen eine signifikante Veränderung. Hierbei ist *p*-Cumarsäure reduziert und Sinapylalkohol in transgenen Samen erhöht. Die Verbindungen Syringaldehyd und Sinapylaldehyd sind ausschließlich in *UGT84A9i/BnSCE3OE*-Samen erhöht.

Falls signifikante Veränderungen vorliegen, sind Hydroxyzimt- und Hydroxybenzoesäuren reduziert und die entsprechenden Aldehyde und Alkohole erhöht. Der Grad der Erniedrigung bzw. Erhöhung überschreitet nicht den Faktor 3,3, so dass im Vergleich zu den Veränderungen im Sekundärstoffgehalt nur geringe Veränderungen festgestellt wurden und demzufolge keine Verschiebung des Sinapinsäure-Pools von der löslichen Fraktion zu Zellwand-gebundenen Phenolen zu beobachten ist.

3.3.1.4 Analyse von Hydroxyzimtsäure- und Hydroxybenzoesäure-Äquivalenten

Zur besseren semiquantitativen Bewertung der metabolischen Veränderungen in reifen Samen wurde eine Analyse von Hydroxyzimt- und Hydroxybenzoesäure-Äquivalenten durchgeführt. Hierzu wurde die lösliche Fraktion nach Verseifung hinsichtlich ihrer Zusammensetzung und ihres Gehaltes von Hydroxyzimt- und Hydroxybenzoesäuren und den abgeleiteten Alkoholen und Aldehyden untersucht. In Tabelle 3-19 sind die Ergebnisse zusammenfassend dargestellt. Falls signifikante Veränderungen auftreten, werden sie für alle transgenen Samen (*BnSCE3OE*, *UGT84A9i*, *UGT84A9i/BnSCE3OE*) mit der gleichen Tendenz (alle erhöht bzw. alle reduziert) vorgefunden. Eine signifikante Erniedrigung konnte für Cumar-, Ferula-, 5-Hydroxyferula- und Sinapinsäure sowie Vanillaldehyd, Syringaldehyd und Sinapylalkohol detektiert werden. Sinapylaldehyd und Syringasäure hingegen wurden in transgenen Samen in erhöhter Menge detektiert.

Die Konzentrationsverringerung der Hydroxyzimtsäuren korreliert mit der Absenkung der entsprechenden Cholinester und bestätigt die bereits beobachteten metabolischen Veränderungen in transgenen Samen. Die gleichzeitig beobachtete Konzentrationserhöhung einiger phenolischer Sameninhaltsstoffe kann jedoch nicht den Nettoverlust der phenolischen Hauptkomponenten kompensieren.

Tabelle 3-19: Ergebnisse der Analyse von HCAs, HBAs und zugehörigen Alkoholen und Aldehyden in verseiften methanolischen Extrakten von reifen Samen der Linien *BnSCE3OE*, *UGT84A9i* sowie *UGT84A9i/BnSCE3OE* im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp. Nicht signifikante Veränderungen sind grau hinterlegt. Wt (L) – Wildtyp Lisora; Wt (D) – Wildtyp Drakkar.

Metabolit	Verhältnis			
	<i>BnSCE3OE</i> zu Wt (L)	<i>UGT84A9i</i> zu Wt (D)	<i>UGT84A9i/ BnSCE3OE</i> zu Wt (D)	<i>UGT84A9i/ BnSCE3OE</i> zu Wt (L)
<i>p</i> -Cumarsäure	0,53	0,66	0,25	0,13
Kaffeesäure	1,24	0,90	0,81	0,63
Ferulasäure	0,24	0,13	0,04	0,03
5-Hydroxyferulasäure	0,54	0,56	0,12	0,10
Sinapinsäure	0,26	0,45	0,04	0,06
Benzoesäure	0,93	1,03	0,73	0,84
Vanillinsäure	1,38	0,51	0,82	1,30
Syringasäure	2,52	2,37	2,25	3,77
Koniferylaldehyd	0,59	0,76	0,76	0,86
Sinapylaldehyd	9,26	5,40	8,96	15,46
4-Hydroxybenzaldehyd	0,88	0,84	0,49	0,66
Vanillaldehyd	0,26	0,51	0,21	0,18
Syringaldehyd	0,24	0,41	0,12	0,17
Sinapylalkohol	0,15	0,32	0,03	0,04

3.3.1.5 Analyse von Primärmetaboliten

Ähnlich wie die Analyse von Sekundärstoffen wurden für die transgenen Linien Primärmetabolite untersucht, um den Einfluss der Suppression von *UGT84A9* und der Überexpression von *BnSCE3* auf den Primärstoffwechsel zu beurteilen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-20 zusammengestellt. Auch hier erfolgt wieder die Einteilung signifikant veränderter Metabolite in vier Kategorien.

Die erste Kategorie umfasst signifikante Veränderungen, die in allen transgenen Linien auftreten. Dazu zählen Fumarsäure, Galactonsäure und Galactitol. Fumarsäure ist hierbei in allen transgenen Linien reduziert. Galactonsäure und Galactitol sind in *BnSCE3OE*- und *UGT84A9i/BnSCE3OE*-Samen erhöht und im Gegensatz dazu in *UGT84A9i*-Samen reduziert.

Zur zweiten Kategorie zählt Glucose. Sie ist nur in *UGT84A9i*- und *UGT84A9i/BnSCE3OE*-Samen signifikant reduziert. In Anlehnung daran beinhaltet die dritte Kategorie Metabolite, die nur in *BnSCE3OE*- und *UGT84A9i/BnSCE3OE*-Samen Veränderungen aufweisen. Eine signifikante Reduktion zeigte die

Aminosäure Asparagin. Für vier Metabolite konnte ein erhöhter Gehalt festgestellt werden. Dazu zählen die Aminosäuren Cystein und Histidin und die organischen Säuren 2-Hydroxyglutar- und Äpfelsäure.

Zur vierten Kategorie zählen Metabolite, die ausschließlich in *UGT84A9i/BnSCE3OE*-Samen signifikante Veränderungen zeigten. Dies sind ausnahmslos erhöhte Metabolite, wobei fünf davon Aminosäuren sind (Arginin, Homoserin, Lysin, Methionin, Ornithin). Insbesondere Homoserin und Methionin zeigen eine starke Induktion. Weitere erhöhte Metabolite sind 4-Hydroxybuttersäure, Bernsteinsäure und Nicotinamin.

Tabelle 3-20: Ergebnis der Analyse von Primärmetaboliten für reife Samen der Linien *BnSCE3OE*, *UGT84A9i* sowie *UGT84A9i/BnSCE3OE* im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp. Signifikante Unterschiede sind schwarz hervorgehoben und nicht signifikante Unterschiede in grau dargestellt. Wt (L) – Wildtyp Lisora; Wt (D) – Wildtyp Drakkar.

Nr.	Metabolit	Verhältnis			
		<i>BnSCE3OE</i> zu Wt (L)	<i>UGT84A9i</i> zu Wt (D)	<i>UGT84A9i/ BnSCE3OE</i> zu Wt (D)	<i>UGT84A9i/ BnSCE3OE</i> zu Wt (L)
1	Fumarsäure	0,12	0,06	0,16	0,08
2	Galactonsäure	2,59	0,43	3,17	5,02
3	Galactitol	3,10	0,44	10,28	14,98
4	Glucose	0,55	0,32	0,35	0,46
7	L-Asparagin	0,46	1,17	0,49	0,37
8	2-Hydroxyglutarsäure	2,36	0,60	2,93	3,72
10	Äpfelsäure	3,09	1,18	2,85	2,75
11	L-Cystein	2,49	1,32	3,67	2,70
12	L-Histidin	2,24	0,86	6,21	11,75
13	4-Hydroxybuttersäure	1,70	0,64	2,52	3,49
14	Bernsteinsäure	1,61	1,12	2,72	2,35
15	L-Arginin	1,05	1,08	2,73	2,69
16	L-Homoserin	0,88	0,99	16,61	34,58
17	L-Lysin	1,54	0,91	3,23	3,90
18	L-Methionin	1,40	0,88	9,09	14,01
19	L-Ornithin	1,38	1,26	6,75	5,76
20	Nicotinamin	1,50	1,04	2,95	2,68

3.3.2 Veränderungen während der Keimlingsentwicklung

Die Analyse der Metabolitenprofile für reife *BnSCE3OE*-, *UGT84A9i*- und *UGT84A9i/BnSCE3OE*-Samen zeigte für Primär- und Sekundärmetabolite weit reichende Veränderungen. Im Phenylpropanstoffwechsel wurden mit dem fast vollständigen Verschwinden von Sinapin und Gesamtsinapinsäureestern in *UGT84A9i/BnSCE3OE*-Samen die deutlichsten Auswirkungen beobachtet. Um die Veränderungen der Metabolite Sinapin, Sinapoylglucose und Sinapoylmalat während der Keimung zu beurteilen wurden die Keimblätter von vier, acht, zwölf, 16 und 20 Tage alten Keimlingen analysiert.

3.3.2.1 Konzentrationsänderung von Sinapoylmalat, Sinapoylglucose und Sinapin während der Keimlingsentwicklung

Die Quantifizierung der Metabolite Sinapoylmalat, Sinapoylglucose und Sinapin während der Samenentwicklung ist für *BnSCE3OE*, *UGT84A9i*, *UGT84A9i/BnSCE3OE* und die Wildtypen Lisora und Drakkar in Abbildung 3-20 dargestellt.

Für beide Wildtypen und *UGT84A9i* ist eine rasche Metabolisierung von Sinapin während der Keimungsphase zu erkennen. Nach vier Tagen konnte Sinapin nicht oder kaum noch detektiert werden. In den Wildtypen erreichte Sinapoylglucose in vier Tage alten Keimblättern die maximale Konzentration um anschließend wieder abzufallen. Die Akkumulation von Sinapoylmalat beginnt in Wildtyp-Keimblättern nach vier Tagen und sie setzt sich bis zum 20. Tag sukzessive fort. In transgenen Keimlingen (*BnSCE3OE*, *UGT84A9i*, *UGT84A9i/BnSCE3OE*) beginnt sie im Vergleich zum Wildtyp verzögert. Erst nach acht bzw. 12 Tagen steigt der Sinapoylmalat-Gehalt an und erreichte nach 20 Tagen noch nicht das Wildtyp-Niveau.

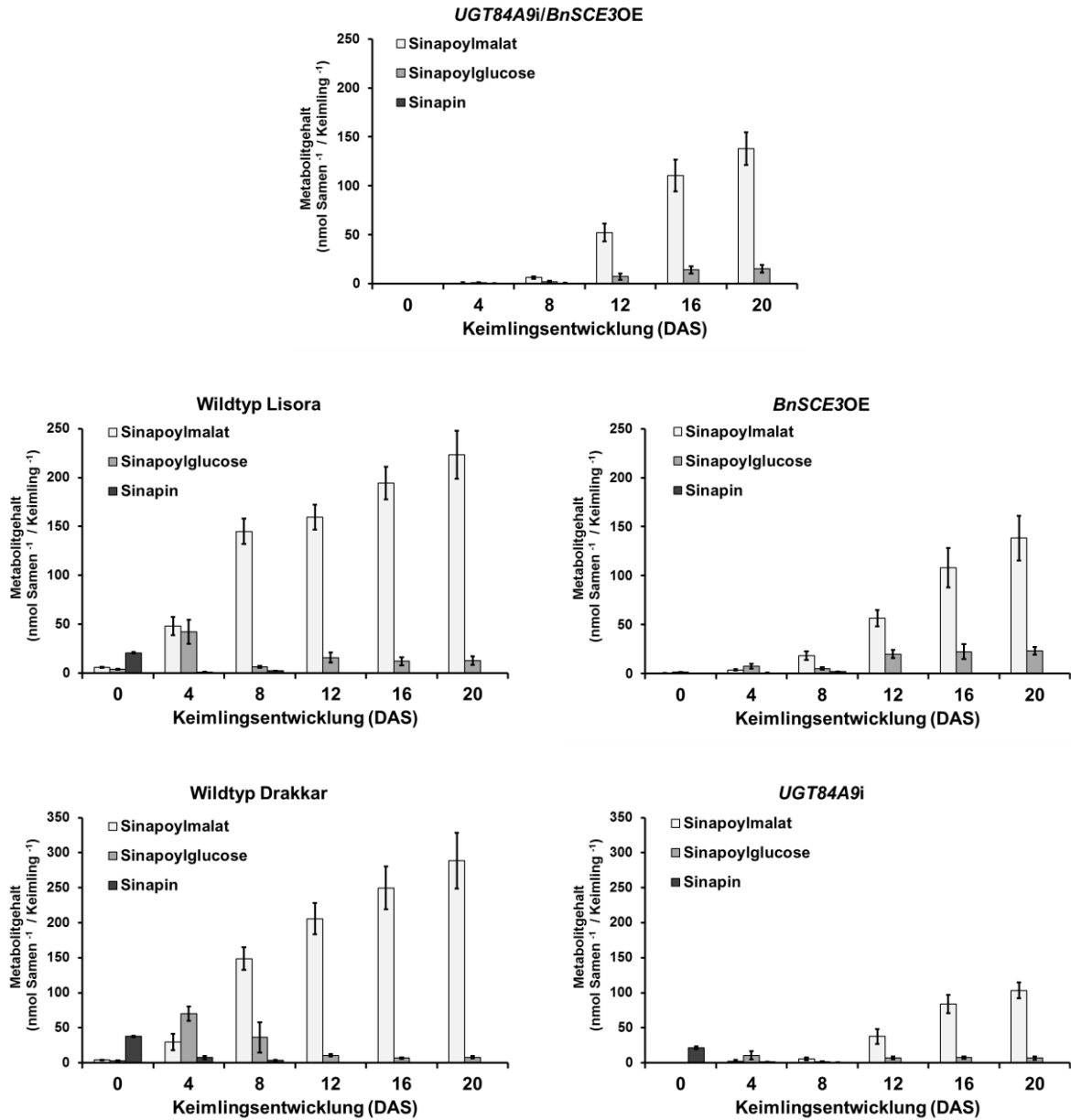


Abbildung 3-20: Akkumulation von Sinapoylmalat, Sinapoylglucose und Sinapin in reifen Samen bzw. 4, 8, 12, 16 und 20 Tage alten Keimblättern der Linien *UGT84A9i/BnSCE3OE*, *BnSCE3OE*, *UGT84A9i*, Wildtyp Lisora und Wildtyp Drakkar.

4 Diskussion

4.1 Absenkung von Sinapin und weiteren Sinapinsäureestern in reifen Niedrig-Sinapin-Rapssamen

Raps ist weltweit gesehen eine der wichtigsten Ölpflanzen und wird überwiegend zur Produktion von Speiseöl verwendet (<http://www.gmo-safety.eu>; Hajdich et al., 2006). Nach der Extraktion des Öls enthält das resultierende Rapsmehl etwa 40 % Proteine (Fenwick 1982). Die Verwendung des Rapsmeihls als wertvolle Proteinquelle für Mensch und Tier ist jedoch aufgrund antinutritiver Inhaltsstoffe der Samenschale (Faserstoffe, Proanthocyanidine) und des Embryos (Sinapinsäureester) nur eingeschränkt möglich (Kozłowska et al., 1990; Shahidi et al., 1992; Bell 1993). Um die Nutzung von Rapsmehl als Nahrungs- und Futtermittel uneingeschränkt zu ermöglichen, wurden verschiedene Strategien zur Absenkung des Gehaltes an Sinapinsäureestern verfolgt. Voraussetzung dafür war die Identifizierung von Schlüsselgenen des Phenylpropanstoffwechsels in *Arabidopsis* und *Brassica* (Milkowski et al., 2010). Die Strategien zur Absenkung der Sinapinsäureester in *B. napus* umfassten sowohl die Antisense- als auch dsRNA*i*-vermittelte Suppression von Genen des generellen Phenylpropanstoffwechsels wie BnC3H, BnC4H und BnCOMT (Bhinu et al., 2009). Dies führte jedoch nicht zur gewünschten starken Absenkung des Sinapinsäureester-Gehaltes. In den entsprechenden *Arabidopsis* Mutanten wurde festgestellt, dass Veränderungen im generellen Phenylpropanstoffwechsel zu unerwünschten Effekten wie Pollensterilität oder Zwergwuchs führten (Franke et al., 2002; Franke et al., 2002; Schillmiller et al., 2009). Erfolgreiche Strategien zur Absenkung der Sinapinsäureester in *B. napus* basierten bisher überwiegend auf der Suppression bzw. Überexpression von Enzymen des Sinapinsäurestoffwechsels wie UGT84A9 (Hüsken et al., 2005) und BnSCE3 (Clauß et al., 2011). Die Suppression des Enzyms UGT84A9 bewirkte bis zur T4-Generation eine Absenkung des Sinapin-Gehaltes auf 45 % des Wildtyp-Niveaus (Hüsken et al., 2005). Die Überexpression einer Sinapinesterase resultierte in nahezu Sinapin-freien Rapssamen (Clauß et al., 2011).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die umfassende Charakterisierung qualitativer und quantitativer metabolischer Veränderungen im Sekundär- und Primärstoffwechsel der Niedrig-Sinapin-Linien *UGT84A9i*, *UGT84A9i/BnSCTi* und *UGT84A9i/BnSCE3OE*, wobei die simultane Suppression des Enzyms UGT84A9 und die Überexpression einer Sinapinesterase (BnSCE3) einen neuen Ansatz zur Absenkung der Sinapinsäureester darstellt. Im Folgenden wird die Absenkung der antinutritiven Sinapinsäureester in diesen Linien diskutiert (Tabelle 4-1). Zur

besseren Bewertung der Ergebnisse werden zusätzlich die Resultate der Rapslinie *BnSCE3OE* präsentiert. Die effizienteste Strategie zur Reduktion der Sinapinsäureester war die Überexpression einer Sinapinesterase und die gleichzeitige Suppression des Enzyms UGT84A9 (*UGT84A9i/BnSCE3OE*). Dies führte zu einer Abnahme des Sinapin-Gehaltes auf maximal 1 % des Wildtyp-Niveaus. Die zusätzlich analysierte Rapslinie *BnSCE3OE* weist mit einem verbleibenden Sinapin-Gehalt von 0,87 % eine vergleichbare Reduktion auf. Die alleinige dsRNAi-vermittelte Suppression des Enzyms UGT84A9 (*UGT84A9i*) resultierte in einer Absenkung des Sinapin-Gehaltes auf 50 % des Wildtyp-Niveaus. Den geringsten Effekt zeigten transgene Rapssamen, die simultan die Enzyme UGT84A9 und BnSCT supprimierten (*UGT84A9i/BnSCTi*). Hier wurde lediglich eine Reduktion des Sinapin-Gehaltes auf 73 % des Wildtyp-Niveaus beobachtet.

Neben der Verminderung des Sinapin-Gehaltes ist die Konzentration der restlichen Sinapinsäureester ausschlaggebend für eine erfolgreiche Absenkung des Gesamt-Sinapinsäureester-Gehaltes. Die Linien *UGT84A9i* und *UGT84A9i/BnSCE3OE* zeigen eine ähnliche Reduktion der restlichen Sinapinsäureester auf 15 % und ca. 16,5 % des Wildtyp-Niveaus. Der verbleibende Sinapin-Gehalt unterscheidet sich jedoch mit 50 % und 1 % erheblich voneinander. Die Rapslinie *BnSCE3OE*, die nur eine Sinapinesterase überexprimiert, zeigt eine genauso starke Absenkung des Sinapin-Gehaltes wie die Linie *UGT84A9i/BnSCE3OE*, aber im Gegensatz dazu eine deutlich schwächere Absenkung der restlichen Sinapinsäureester auf 65 % des Wildtyp-Niveaus. Dies lässt die Vermutung zu, dass die starke Absenkung des Sinapin-Gehaltes in *UGT84A9i/BnSCE3OE*-Samen überwiegend durch die Überexpression von BnSCE3 bedingt wird und die starke Absenkung der restlichen Sinapinsäureester durch die Suppression des Enzyms UGT84A9 verursacht wird. Die kombinierte Suppression der Enzyme UGT84A9 und BnSCT resultierte nur in einer geringen Abnahme des Sinapin-Gehaltes auf 73 % des Wildtyp-Niveaus sowie einer Reduktion der restlichen Sinapinsäureester auf 38 %. Ergebnisse der alleinigen Suppression der BnSCT zeigten eine signifikante Absenkung des Sinapin-Gehaltes, die jedoch durch die gleichzeitige Akkumulation von Sinapoylglucose ausgeglichen wurde (Weier et al., 2008; Bhinu et al., 2009). Dies ist ebenso für die Arabidopsis-Mutante *sng2* bekannt (Shirley et al., 2001), die eine Mutation im Gen für die SCT trägt. Die Abnahme des Sinapin-Gehaltes in *UGT84A9i/BnSCTi*-Samen wird somit hauptsächlich durch die Suppression von *UGT84A9* verursacht. Durch die vermehrte Akkumulation von Sinapoylglucose, bedingt durch die Suppression von *BnSCT*, werden vermehrt andere, von Sinapoylglucose abgeleitete Sinapinsäureester, gebildet.

Zusammenfassend konnte für die Linien *UGT84A9i/BnSCE3OE*, *BnSCE3OE*, *UGT84A9i* und *UGT84A9i/BnSCTi* eine Absenkung des Gesamt-Sinapinsäureester-Gehaltes auf 7 %, 32 %, 44 % und 63 % des Wildtyp-Niveaus ermittelt werden. Im Vergleich zu bisher berichteten Strategien zur Verringerung des Sinapinsäureester-Gehaltes in *B. napus* Samen stellt die kombinierte Suppression des Enzyms *UGT84A9* und die Überexpression des Enzyms *BnSCE3* den erfolgreichsten Ansatz dar.

Tabelle 4-1 Verbleibender Gehalt (%) von Sinapin, restlichen Sinapinsäureestern (SE) und Gesamt-Sinapinsäureestern (Gesamt-SE) für reife Samen der Linien *UGT84A9i/BnSCTi*, *UGT84A9i*, *BnSCE3OE* und *UGT84A9i/BnSCE3OE* im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp.

Linie	Sinapin-Gehalt [%]	restliche SE, Gehalt in [%]	Gesamt-SE, Gehalt in [%]
Wildtyp Lisora			
<i>UGT84A9i/BnSCE3OE</i>	1,02	15	8
Wildtyp Drakkar			
<i>UGT84A9i/BnSCE3OE</i>	0,56	18	6
Wildtyp Lisora			
<i>BnSCE3OE</i>	0,87	65	32
Wildtyp Drakkar			
<i>UGT84A9i</i>	50	15	44
Wildtyp Drakkar			
<i>UGT84A9i/BnSCTi</i>	73	38	63

Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Konzentrationsabnahme der Sinapinsäureester für zwei unabhängige *UGT84A9i*-Linien bis in die Generationen T6 und T7 vorhanden ist und somit der *dsRNAi*-Effekt stabil in die Folgegenerationen vererbt wurde. Für *A. thaliana* konnte die Vererbung des *dsRNAi*-Effektes bis in die T5-Generation nachgewiesen werden (Stoutjesdijk et al., 2002). Für Kulturpflanzen wurde die stabile Vererbung des *dsRNAi*-Effektes in die Generationen T2 oder T3 beschrieben (Byzova et al., 2004; Townsend et al., 2007). Gleichermaßen konnte für die Generationen T4 und T5 der *UGT84A9i/BnSCTi*-Linie die stabile Absenkung des Sinapinsäureester-Gehaltes nachgewiesen werden. Die Analyse der Kreuzungslinien *UGT84A9i/BnSCE3OE* diente zum Nachweis des Reduktionspotenzials dieser Strategie bezogen auf die Sinapinsäureester. Analysen zur Stabilität des Niedrig-Sinapin-Merkmals waren kein Bestandteil dieser Arbeit.

4.2 Metabolische Veränderungen in reifen Niedrig-Sinapin-Rapssamen

4.2.1 Veränderungen von Sekundärmetaboliten

Zur Charakterisierung der metabolischen Veränderungen in reifen Rapssamen der Linien *UGT84A9i*, *UGT84A9i/BnSCTi* und *UGT84A9i/BnSCE3OE* wurden umfangreiche Analysen von Primär- und Sekundärmetaboliten durchgeführt. Neben der Konzentrationsabnahme von Sinapin konnte insbesondere für die Linien *UGT84A9i* und *UGT84A9i/BnSCE3OE* für eine Vielzahl phenolischer Sekundärstoffe der löslichen Fraktion signifikante Veränderungen nachgewiesen werden. Hierbei wurden sowohl signifikant in ihrer Konzentration erhöhte als auch entsprechend erniedrigte Metabolite identifiziert. Zur besseren Darstellung der aufgetretenen Änderungen werden zusätzlich die Ergebnisse der Rapslinie *BnSCE3OE* diskutiert.

Durch die Suppression des Enzyms *UGT84A9*, welches die Synthese von Sinapoylglucose aus Sinapinsäure und UDP-Glucose katalysiert, sollte formal gesehen freie Sinapinsäure im Samen akkumulieren. Die kombinierte Suppression von *UGT84A9* und *BnSCT* sollte zusätzlich die Bildung von Sinapoylcholin aus Sinapoylglucose und Cholin vermindern. Die Überexpression der Sinapinesterase *BnSCE3* bewirkt die Spaltung von Sinapoylcholin zu Sinapinsäure und Cholin. Formal betrachtet, wird in allen genannten Rapslinien (*UGT84A9i*, *UGT84A9i/BnSCTi*, *BnSCE3OE* und *UGT84A9i/BnSCE3OE*) freie Sinapinsäure gebildet, welche theoretisch akkumulieren müsste. Die Akkumulation einer hohen Konzentration reaktiver freier Säuren führt zu Zellschädigungen und somit zur Beeinträchtigung der Samenentwicklung. Dieser Effekt wurde jedoch in keiner der analysierten Rapslinien beobachtet, so dass vermutet wird, dass durch anfängliche Akkumulation von Sinapinsäure weitere Mechanismen ihrer Diversifikation wirken.

So konnte für alle transgenen Rapslinien eine Konzentrationsabnahme der im Stoffwechselweg synthetisierten Cholinester der Hydroxycimtsäuren wie Kaffeoylcholin, Feruloylcholin, 5-Hydroxyferuloylcholin und das davon abgeleitete 3,4-Dimethoxycinnamoylcholin beobachtet werden (Tabelle 4-2). Der Grad der Reduktion steht in direktem Zusammenhang mit dem Grad der Sinapinabsenkung. Im Gegensatz dazu sind die Cholinester der Hydroxybenzoesäuren nur z. T. reduziert bzw. induziert und es lässt sich keine direkte Korrelation zum verbleibenden Sinapin-Gehalt ableiten. Auch werden Veränderungen von verschiedenen Kämpferol-Derivaten ersichtlich (Tabelle 4-2). So sind z. B. vier Kämpferol-Derivate, die u. a. mit Sinapoyl-Resten konjugiert sind, in *UGT84A9i*- und in *UGT84A9i/BnSCE3OE*-Samen signifikant reduziert. Diese Beobachtungen lassen

einen negativen Feedbackmechanismus vermuten, der zu einem reduzierten Kohlenstoff-Fluss im Phenylpropanstoffwechsel von 4-Cumarsäure zu Sinapinsäure führt.

Sinapinsäureester, die von Sinapoylglucose abgeleitet sind, wie beispielsweise 1,2-Di-O-sinapoylglucose und 2-O-Sinapoylmalat sowie die Phenylpropan-Derivate Kaffeoylgentiobiose und 2-O-Feruloylmalat zeigen für reife Samen der Rapslinien *UGT84A9i/BnSCTi*, *UGT84A9i* und *UGT84A9i/BnSCE3OE* ebenso einen vermindernten Gehalt. Für *UGT84A9i/BnSCTi*-Samen ist die Abnahme der Konzentration jedoch nicht so stark ausgeprägt wie für *UGT84A9i* und *UGT84A9i/BnSCE3OE*. Dies ist höchstwahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass durch die Suppression des Enzyms BnSCT eine vermehrte Akkumulation von Sinapoylglucose erfolgt und dieses zentrale Intermediat weit gehend zu durch Sinapoylreste modifizierte Metabolite umgesetzt wird. Die Rapslinie *BnSCE3OE* hingegen zeigt keine Abnahme von Sinapoylglucose und Sinapoylglucose-Derivaten mit Ausnahme von 1,6-Di-O-sinapoylglucose und 2-O-Sinapoylmalat. Dies ist in Übereinstimmung mit der Tatsache, dass in dieser Rapslinie durch Überexpression einer Sinapinesterase das vorhandene Sinapin abgebaut wird und die verbleibenden Sinapinsäureester davon nur marginal betroffen sind. Dies wird ebenso durch die Analyse der Esterase-Substratspezifität der BnSCE3 (Clauß et al., 2008) untermauert. Das Enzym zeigt gegenüber Sinapoylglucose und Sinapoylmalat keine Aktivität, wohingegen verschiedene Hydroxyzimtsäure-Cholinester durch das Enzym hydrolysiert werden. Die kombinierte Suppression von *UGT84A9* und Überexpression von *BnSCE3* führt sowohl zu einer Absenkung des Sinapin-Gehaltes als auch von weiteren Sinapinsäureestern (Tabelle 4-2).

Tabelle 4-2 Metabolite mit erniedrigtem Gehalt in reifen Samen der Linien *UGT84A9i/BnSCTi*, *UGT84A9i*, *BnSCE3OE* und *UGT84A9i/BnSCE3OE* im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp. Signifikante Veränderungen sind in schwarz dargestellt; nicht signifikante Veränderungen in grau; k. V. – keine Veränderung; n. d. – nicht detektierbar; * Metabolitengehalt in den entsprechenden transgenen Rapslinien unter dem Quantifizierungslimit.

Nr.	Metabolit	Verhältnis zum Wildtyp			
		<i>UGT84A9i/BnSCTi</i>	<i>UGT84A9i</i>	<i>BnSCE3OE</i>	<i>UGT84A9i/BnSCE3OE</i>
24	Cinnamoylcholin	n.d.	0,08	n.d.	n.d.
69	Cumaroylcholin	0,24	k. V.	*	*
8	Kaffeoylcholin	*	0,33	0,09	0,03
13	Feruloylcholin	0,11	0,11	0,07	*
9	5-Hydroxyferuloylcholin	0,18	0,14	0,03	*
23	3,4-Dimethoxycinnamoylcholin	0,18	0,11	*	*
16	Sinapoylcholin	0,73	0,50	*	*
14	Benzoylcholin	n.d.	k. V.	0,06	0,27
5	4-Hydroxybenzoylcholine	n.d.	k. V.	3,11	k. V.
7	Vanilloylcholin	*	k. V.	k. V.	k. V.
55	Syringoylcholin	*	k. V.	2,67	k. V.
34	1-O-Sinapoylglucose	0,14	*	k. V.	0,06
39	1,2-Di-O-sinapoylgentiobiose	0,10	0,02	k. V.	0,08
40	1,2-Di-O-sinapoylglucose	0,14	0,01	k. V.	0,16
41	1,2,2'-Tri-O-sinapoylgentiobiose	0,23	0,08	k. V.	0,19
42	1,6-Di-O-sinapoylglucose	0,08	*	0,35	*
30	Kaffeoylgentiobiose	k. V.	0,36	0,17	*
38	2-O-Sinapoyl-S-malat	0,18	0,04	0,19	0,04
58	2-O-Feruloyl-S-malat	*	*	*	*
32	Kämpferol-3-O-soph-7-O-glc	k. V.	0,36	k. V.	0,28
33	Kämpferol-3-O-(sin-soph)-7-O-glc	k. V.	0,50	0,47	0,08
35	Kämpferol-4'-O-(sin-glc)-3,7-di-glc	k. V.	0,34	k. V.	0,20
37	Kämpferol-3-O-soph-7-O-(sin-glc)	n. d.	0,35	k. V.	*

Abgesehen von dem verminderten Kohlenstoff-Fluss im Phenylpropanstoffwechsel von 4-Cumarsäure zu Sinapinsäure und der damit verbundenen Konzentrationsabnahme einer Vielzahl von Sekundärstoffen (Tabelle 4-3) wurden gleichfalls verschiedene Sekundärstoffe detektiert, die in transgenen Samen in erhöhter Konzentration vorlagen. Dies sind insbesondere glycosylierte Derivate von

Sinapinsäure und Sinapin wie 4-O- β -Glucosyl-*E*-sinapinsäure, 4-O-Glucosylsinapin, 4-O-Dihexoylsinapoylcholin oder Sinapoylcholin-4-O-(hexosid-pentosid). Glycosylierte Hydroxyzimtsäuren und Hydroxybenzoesäuren können als Ester (Verknüpfung der Hexose an die Carboxylgruppe) oder Glycoside (Verknüpfung der Hexose an die phenolische Hydroxylgruppe) vorkommen. Die Ester besitzen ein hohes Gruppenübertragungspotenzial und treten üblicherweise als Zwischenprodukte des Phenylpropanstoffwechsels auf. Die Glycoside werden hingegen als Detoxifizierungsprodukte gebildet und dienen somit dem Schutz vor reaktiven freien Säuren (Vickery 1981; Vogt et al., 2000). Die Glycoside werden anschließend in die Vakuole abtransportiert und können dort gespeichert werden. Das Auftreten glycosylierter HCA- und HBA-Konjugate kann somit als Mechanismus diskutiert werden, der die Akkumulation freier, reaktiver Säuren in der Pflanzenzelle verhindert bzw. vermindert. Die Glycosylierung als Prozess der Detoxifizierung ist in der Pflanzenwelt bereits vielfach beschrieben. So wurde die Akkumulation von phenolischen Glycosiden in transgenen Pappelpflanzen beschrieben (Meyermans et al., 2000; Suzuki et al., 2010). Auch die Analyse von T3-Samen der *BnSCE3OE*-Rapslinien zeigten diesen Konjugationsprozess (Clauß et al., 2011). Gleichfalls wurde in *Arabidopsis* *ugt84A2*-Mutanten, die eine Mutation im Enzym SGT besaßen, dieser Prozess beobachtet (Meißner et al., 2008). Für diese Mutanten konnte ebenfalls eine Zunahme an 4-O-Glucosylsinapin beobachtet werden.

Für die Rapslinien *UGT84A9i/BnSCTi*, *UGT84A9i* und *BnSCE3OE* ist insbesondere die starke Konzentrationserhöhung von 4-O-Glucosylsinapin zu nennen. Die Rapslinie *UGT84A9i/BnSCTi* zeigt ebenso eine Erhöhung von 4-O-Hexosylferuloylcholin und die Linie *BnSCE3OE* zeigt für alle Cholinester der HCA und HBA eine deutliche Induktion. Für die Linie *UGT84A9i/BnSCE3OE* wurden keine glycosylierten HCA-Cholinester detektiert. Allerdings wurde eine Zunahme von 4-O-Hexosylsyringoylcholin beobachtet.

Das Auftreten glycosylierter HBA-Verbindungen kann durch eine Kettenverkürzung von C₆-C₃-Einheiten zu C₆-C₁-Einheiten diskutiert werden. In der Literatur werden hierzu zwei Mechanismen postuliert. Einerseits ist eine Kettenverkürzung ähnlich zu den Reaktionen der β -Oxidation der Fettsäuren möglich (Yazaki et al., 1991; Loscher et al., 1994) und andererseits wird eine Lyase-Reaktion ohne Beteiligung von Koenzym A diskutiert (Sircar et al., 2008).

Tabelle 4-3 Metabolite mit erhöhtem Gehalt in reifen Samen der Linien *UGT84A9i/BnSCTi*, *UGT84A9i*, *BnSCE3OE* und *UGT84A9i/BnSCE3OE* im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp. Signifikante Veränderungen sind in schwarz dargestellt; nicht signifikante Veränderungen in grau; k. V. – keine Veränderung, n. d. – nicht detektierbar.

Nr.	Metabolit	Verhältnis zum Wildtyp			
		<i>UGT84A9i/BnSCTi</i>	<i>UGT84A9i</i>	<i>BnSCE3OE</i>	<i>UGT84A9i/BnSCE3OE</i>
65	4-O-Hexosylcumaroylcholin	k. V.	0,24	3,35	k. V.
49	4-O-Hexosylkaffeoylcholin	k. V.	0,38	6,29	k. V.
52	4-O-Hexosylferuloylcholin	2,69	k. V.	2,93	k. V.
67	4-O-Hexosyl-5-hydroxyferuloylcholin	k. V.	k. V.	2,08	k. V.
6	4-O-Glucosylsinapoylcholin	8,36	11,63	6,40	k. V.
2	4-O-Hexosyloxybenzoylcholin	k. V.	0,37	3,95	k. V.
3	4-O-Hexosylvanilloylcholin	k. V.	k. V.	8,44	k. V.
4	4-O-Hexosylsyringoylcholin	k. V.	k. V.	31,93	20
43	4-O-β-Glucosylsyringasäure	100	5,67	4,24	9,51
45	4-O-β-Glucosyl- <i>E</i> -sinapinsäure	k. V.	11,43	22,47	27,48
46	Kämpferol-3-O-β-soph	k. V.	5,12	13,38	12,34
15	SC(4-O-8')G-4-O'-hexosid	2,93	3,79	61,13	30,09
17	SC(4-O-8')S-4-O'-hexosid	k. V.	3,24	69,83	27,23
51	4-O-Dihexosylsinapoylcholin	8,20	11,27	14,77	5,90
53	SC-4-O-(hexosid-pentosid)	100	3,56	77,66	13,60

4.2.2 Veränderung von Hydroxyzimtsäure- und Hydroxybenzoesäure-Äquivalenten

Die quantitative Analyse von Hydroxyzimt- und Hydroxybenzoesäure-Äquivalenten sowie den entsprechenden Aldehyden und Alkoholen wurde durchgeführt, um die metabolischen Veränderungen im Samen besser bewerten zu können. Hierbei konnte für alle Linien einheitlich beobachtet werden, dass Hydroxyzimtsäuren-Äquivalente in verringerter Menge vorlagen und somit ein Nettoverlust von HCAs zu verzeichnen war, der die Vermutung des negativen Feedback-Mechanismus unterstützt. Die Konzentrationszunahme von Syringasäure deutet auf den Mechanismus der Kettenverkürzung von C₆-C₃- zu C₆-C₁-Einheiten (Sinapinsäure -> Syringasäure) hin. Dies stimmt zudem mit der Beobachtung überein, dass in transgenen Samen Syringasäure-Derivate, insbesondere 4-O-β-Glucosylsyringasäure, vermehrt detektiert wurden. Die Analyse der entsprechenden

Aldehyde ergab eine Konzentrationszunahme von Sinapylaldehyd. Die Akkumulation des Aldehyds erscheint hier im Gegensatz zur Akkumulation der Säure als nicht problematisch.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass die Veränderungen von HCA- und HBA-Äquivalenten die beobachteten Veränderungen der analysierten Sekundärstoffe und den Nettoverlust von HCA-Konjugaten widerspiegeln.

4.2.3 Veränderung von Zellwand-gebundenen Phenolen

Verschiedene Verzweigungen des Phenylpropanstoffwechsels führen, ausgehend von Cumaroyl-CoA, zu Verbindungen wie Flavonoiden, löslichen Hydroxyzimtsäureestern oder Lignin, welches nach Zellulose das zweithäufigste Biopolymer der Pflanzenwelt ist (Boudet 1998). Lignin wird aus den Monolignolen 4-Cumaryl-, Koniferyl- und Sinapylalkohol durch radikalische Polymerisierung aufgebaut und entsprechend dem Aryl-Rest in 4-Hydroxyphenyl-, Guaiacyl- und Syringyl-Lignin eingeteilt (Boerjan et al., 2003). Abgesehen von der Biosynthese von Lignin sind Hydroxyzimtsäure-Derivate unter anderem Bestandteile von unlöslichen Polymeren wie Cutin oder Suberin oder von Polysacchariden in Zellwandfraktionen (Carpita 1996; Fry 1982; Fry 1986; Hartley et al., 1989; Mathew et al., 2004; Wallace et al., 1994). Sowohl die konjugierten als auch die freien Derivate sind für die strukturelle Stabilität der Zellwände von großer Bedeutung (Bidlack et al., 1992; Carpita 1996). Der Anteil von Hydroxyzimtsäure-Derivaten, der durch alkalische Hydrolyse aus Zellwänden isoliert werden kann, wird als Zellwand-gebundene Phenole bezeichnet (Tan et al., 2004). Konzentrationsänderungen von Zellwand-gebundenen Phenolen konnten z. B. für *A. thaliana ugt84A3*-Null-Mutanten gezeigt werden (Meißner et al., 2008). Der Ausfall der UGT84A3, einer HCA-Glycosyltransferase, führt zu einer Konzentrationsabnahme von 4-Cumarsäure, jedoch nicht von Ferulasäure und Sinapinsäure in den Zellwand-gebundenen Phenolen.

Um die Auswirkungen der Suppression bzw. Überexpression der entsprechenden Genprodukte auf die Fraktion der Zellwand-gebundenen Phenole abzuschätzen, wurde das Zellwandmaterial reifer Samen dahingehend untersucht. Für alle analysierten Samen der verschiedenen Rapslinien wurden nur marginale Veränderungen festgestellt. Erwähnenswert ist vor allem eine Konzentrationserniedrigung von Sinapinsäure für die Linien *UGT84A9i*, *BnSCE3OE* und *UGT84A9i/BnSCE3OE*. Die beobachteten Konzentrationszu- bzw. abnahme überschreitet jedoch nicht den Faktor 3,5, so dass insgesamt betrachtet nur marginale Konzentrationsveränderungen für Zellwand-gebundene Phenole detektiert werden konnten und eine starke Veränderung von löslichen zu Zellwand-

gebundenen Anteilen nicht auftritt, insbesondere, da die Menge von Zellwandgebundenen Phenolen im Vergleich zu den löslichen von untergeordneter Bedeutung sind.

Neben der stabilisierenden Funktion wurde die biologische Bedeutung von Zellwandgebundenen Phenolen hinsichtlich der Abwehr von Pathogenen unter anderem bei *A. thaliana* (Tan et al., 2004), *Lycopersicon esculentum* (Beimen et al., 1992), *Solanum tuberosum* (Keller et al., 1996) oder *Musa acuminata* (De Ascensao et al., 2003) untersucht. Die Infektion von *A. thaliana*-Blättern mit *Pseudomonas syringae* sowie die Infektion von Wurzeln mit *Phythium sylvaticum* führte zu einer Konzentrationszunahme von Zellwand-assoziierten Phenolen (Tan et al., 2004). Die Bedeutung von Hydroxyzimtsäure-Derivaten wird insbesondere für die Arabidopsis-Mutante *ref3* (C4H) (Schilmiller et al., 2009) ersichtlich, die eine Mutation in der C4H hat und somit ein Enzym des generellen Phenylpropanstoffwechsels nicht funktionell exprimiert werden kann. Die Pflanzen zeigen erhöhte Anfälligkeit gegenüber Pilzbefall und Veränderungen im Lignin-Gehalt sowie von Monolignolen (Schilmiller et al., 2009).

Die Konzentrationsveränderungen von Zellwandgebundenen Phenolen der Rapslinien *UGT84A9i*, *BnSCE3OE* und *UGT84A9i/BnSCE3OE* sind zwar als gering einzustufen, jedoch sollte die Anfälligkeit gegenüber Pathogenen in weiteren Experimenten analysiert werden. Insbesondere junge Keimpflanzen der Rapslinien *UGT84A9i*, *BnSCE3OE* und *UGT84A9i/BnSCE3OE* könnten durch den stark verringerten Gehalt an Sinapinsäureestern, insbesondere Sinampoylmalat, anfälliger gegenüber Pathogenen sein.

4.2.4 Veränderung des Cholingehaltes

Der Metabolit Cholin ist in Form von Phosphatidylcholin ein essenzieller Bestandteil biologischer Membranen (Rhodes et al., 1993; Kent 1995). Während der Keimung von *B. napus* wird Sinapoylcholin zu Sinapinsäure und Cholin gespalten und das freigesetzte Cholin kann in die Biosynthese von Phosphatidylcholin eingehen (Strack 1981). Aufgrund des verminderten Sinapin-Gehaltes der in dieser Arbeit analysierten Rapslinien war es von Bedeutung zu wissen, wie sich die Konzentration von freiem Cholin in reifen Samen ändert. Für die Linien *UGT84A9i/BnSCTi* und *UGT84A9i* konnte mit abnehmendem Sinapin-Gehalt ein zunehmender Gehalt freien Cholins beobachtet werden. Clauß et al. (2011) beschreiben diese Beobachtung ebenso für *BnSCE3OE*-Samen und auch die Arabidopsis-Mutante *sin1* zeigt eine Akkumulation von Cholin bei gleichzeitiger Reduktion von Sinapin (Chapple et al., 1992). Die Gegenüberstellung der molaren Menge von freiem Cholin und dem vermindertem

Sinapin-Gehalt zeigte jedoch, dass in transgenen Samen nur ein Teil des Cholins akkumuliert, das normalerweise in Form von Sinapin gespeichert wird. Die Akkumulation des verbleibenden, freien Cholins scheint für die Rapslinien *UGT84A9i/BnSCTi* und *UGT84A9i*, im Gegensatz zu freien HCAs und HBAs, offenbar keinen nachteiligen Effekt auf den Samenstoffwechsel zu bewirken. Die Analyse des Cholingehaltes der Rapslinie *UGT84A9i/BnSCE3OE* konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden. Aufgrund der Erkenntnisse der anderen untersuchten transgenen Rapslinien wird jedoch auch hier eine erhöhte Akkumulation von freiem Cholin erwartet.

Der erhöhte Gehalt an freiem Cholin könnte auch zu einer Verbesserung des Gebrauchswertes von *B. napus*-Samen für den Menschen beitragen (Zeisel et al., 2009). Cholin wird benötigt für die Synthese des Neurotransmitters Acetylcholin, ist in Form von Phospholipiden an der Signaltransduktion beteiligt oder am Aufbau von Lipoproteinen und fungiert als Methylgruppendedonor (Zeisel et al., 2009; Penry et al., 2008). Andererseits kann Cholin in Betain umgesetzt werden. Betain wurde bereits in verschiedenen Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen nachgewiesen und wird vorwiegend durch eine zweistufige Synthese über Betainaldehyd gebildet (Hanson et al., 1983). Mikroorganismen wie *Arthrobacter pascens* können Betain in einem einstufigen Prozess mittels einer Cholinoxidase (COX) aus Cholin synthetisieren (Rozwadowski et al., 1991). Die physiologische Bedeutung von Betain liegt vor allem im Schutz vor osmotischen Stress (Wyn Jones 1984) durch Stabilisierung von Membranen und Enzymen bei Austrocknung. Für Betain konnte im Zusammenhang mit Kälte- und Trockenstress die protektive Funktion gezeigt werden (Krall et al., 1989; Jolivet et al., 1983; Jolivet et al., 1982; Zhao et al., 1992). Die Integration einer Expressionskassette für eine bakterielle Cholinoxidase wurde bereits für Tabak, Arabidopsis und *B. napus* durchgeführt und bei entsprechendem Vorhandensein von Cholin als Substrat für die Cholinoxidase konnten erhöhte Betainkonzentrationen detektiert werden (Huang et al., 2000; Huang et al., 2008; Nuccio et al., 1998). Die Integration einer Cholinoxidase in *UGT84A9i*, *BnSCE3OE* und *UGT84A9i/BnSCE3OE* Pflanzen erscheint eine viel versprechende Option zur Steigerung der Fitness der Pflanzen.

4.2.5 Veränderung von Primärmetaboliten

Von den Linien *UGT84A9i*, *UGT84A9i/BnSCTi*, *BnSCE3OE* und *UGT84A9i/BnSCE3OE* wurden reife Samen hinsichtlich Veränderungen von Metaboliten des Primärstoffwechsels wie Aminosäuren, andere organischen Säuren und Kohlenhydrate analysiert. Mit zunehmender Abnahme des Sinapinsäureester-Gehaltes wurde eine Zunahme signifikant veränderter Primärmetabolite beobachtet.

Die Veränderungen der Linie *UGT84A9i/BnSCTi* konnten für die anderen transgenen Rapslinien nicht reproduziert werden. Allerdings konnte für die Linien *UGT84A9i*, *BnSCE3OE* und *UGT84A9i/BnSCE3OE* eine starke Konzentrationsabnahme von Fumarsäure festgestellt werden. Die Linien *BnSCE3OE* und *UGT84A9i/BnSCE3OE* wiesen zusätzlich für L-Asparagin eine Konzentrationsabnahme auf. Alle anderen signifikant veränderten Metabolite zeigten erhöhte Konzentrationen. L-Cystein und L-Histidin sowie Äpfelsäure und 2-Hydroxyglutarsäure waren in den Linien *BnSCE3OE* und *UGT84A9i/BnSCE3OE* induziert. Für die Linie *UGT84A9i/BnSCE3OE* konnten sieben weitere Metabolite in erhöhter Konzentration detektiert werden. Hierbei handelt es sich um L-Arginin, L-Homoserin, L-Lysin, L-Methionin, L-Ornithin, Nicotinamin und die Verbindung 4-Hydroxybuttersäure.

Die Grad der Induktion bzw. Reduktion signifikant veränderter Verbindungen nimmt hierbei mit zunehmender Verminderung des Gesamt-Sinapinsäureester-Gehaltes zu, so dass sich die beobachteten Effekte verstärken bzw. neue Effekte hinzukommen. Für die Linien *UGT84A9i* und *BnSCE3OE* überschreitet die Induktions- bzw. Reduktionsrate nicht den Faktor 3,3. Die Linie *UGT84A9i/BnSCE3OE* zeigt jedoch für 9 Metabolite Induktionsraten über 3,3. Insbesondere L-Homoserin, L-Methionin, L-Histidin, L-Ornithin, Galactitol und Galactonsäure zeigen eine starke Konzentrationszunahme.

Die Absenkung des Gesamt-Sinapinsäureester-Gehaltes durch die vorgestellten Strategien bewirkt somit auch Veränderungen im Primärmetabolismus der Rapsamen. Der Metabolit Fumarsäure, ein Intermediat des Zitronensäurezyklus, zeigt bereits bei einer Absenkung des Gesamt-Sinapinsäureester-Gehaltes auf 44 % des Wildtyp-Niveaus eine signifikante Konzentrationsabnahme (*UGT84A9i*). Kommt es zur weiteren Abnahme des Sinapinsäureester-Gehaltes (*BnSCE3OE*: Sinapinsäureestergehalt 32 % des Wildtyp-Niveaus) werden weitere Auswirkungen auf den Zitronensäurezyklus erkenntlich. Die Metabolite Äpfelsäure und 2-Hydroxyglutarsäure zeigen eine Konzentrationszunahme. In *Arabidopsis* konnte gezeigt werden, dass 2-Hydroxyglutarsäure durch das Enzym 2-Hydroxyglutarat-Dehydrogenase in α -Ketoglutarsäure, einem weiteren Intermediat des Zitronensäurezyklus, konvertiert wird (Engqvist et al., 2011). Die Reduktion des Sinapinsäureester-Gehaltes auf 7 % resultiert zusätzlich in einer Induktion der Metabolite Bernsteinsäure und 4-Hydroxybuttersäure. Für *Arabidopsis* wurde gezeigt, dass 4-Hydroxybuttersäure aus Bernsteinsäure-semialdehyd, einer Vorstufe von Bernsteinsäure, synthetisiert werden kann (Bouché et al., 2004). Auch hier wird die Beziehung zum Zitronensäurezyklus ersichtlich.

Die Konzentrationsänderungen verschiedener Aminosäuren in den Samen der Linien *BnSCE3OE* und *UGT84A9i/BnSCE3OE* lassen sich direkt in Zusammenhang mit den Veränderungen von Zwischenprodukten des Zitronensäurezyklus diskutieren. Intermediate dieses wichtigen Stoffwechselweges sowie der Glykolyse und des Pentosephosphatweges bilden die Ausgangssubstrate für die Biosynthese der Aminosäuren. Aus dem Zitronensäurezyklus-Intermediat Oxalacetat werden die in transgenen Samen veränderten Aminosäuren L-Asparagin, L-Homoserin, L-Methionin und L-Lysin synthetisiert. Die Verbindung α -Ketoglutarat ist das Ausgangssubstrat für die Aminosäuren L-Ornithin und L-Arginin. Die Aminosäuren L-Cystein und L-Histidin leiten sich von 3-Phosphoglycerat (Glykolyse) bzw. Ribose-5-phosphat (Pentosephosphatweg) ab.

Aus den Ergebnissen der Metabolitenanalysen geht hervor, dass insbesondere für die Rapslinie *UGT84A9i/BnSCE3OE* eine Vielzahl von signifikant veränderten Primärmetaboliten nachgewiesen wurde. Die weit reichenden Änderungen können für diese Linie auch durch die starke Überexpression der Sinapinesterase und der damit verbundenen möglichen Fehllokalisation in anderen Zellkompartimenten und den daraus beeinträchtigten Stoffwechselwegen diskutiert werden.

Auch in anderen Studien konnten weit reichende Veränderungen des pflanzlichen Metabolismus durch die Absenkung des Sinapin-Gehalts nachgewiesen werden. So wurden für die Arabidopsis-Mutante *sct* sowohl Veränderungen im Metabolom als auch Transkriptom detektiert (Huang et al., 2009). Auch die Anfälligkeit gegenüber Pathogenen war für *sct*-Pflanzen erhöht. Dauwe et al. (2007) beschreiben die Analyse von Tabakpflanzen, die eine Suppression der Gene für die Enzyme CCR (Cinnamoyl-CoA-Reduktase) und/oder CAD (Cinnamylalkohol-Dehydrogenase) aufweisen. In diesen Pflanzen sind die entscheidenden Enzyme für die Synthese von Monolignolen und dem daraus abgeleiteten Polymer Lignin supprimiert. Sowohl die Analyse der Metabolitengehalte als auch der Transkript-Abundanz zeigten eine Vielzahl von signifikanten Veränderungen. Diese Beispiele demonstrieren die Wichtigkeit von entsprechenden Profiling-Studien, um die vielfältige Regulation des Metabolismus zu verstehen und zu bewerten. In Hinblick auf die Bewertung von genetisch veränderten Nutzpflanzen als Lebensmittel ist insbesondere das Konzept der „stoffliche Entsprechung“ (engl. substantial equivalence) von Bedeutung (Miller 1999). Das Konzept geht davon aus, dass neu entwickelte Lebensmittel bei gleicher Zusammensetzung wie bereits existierende Lebensmittel keine weiteren Sicherheitsprüfungen bedürfen. Die Voraussetzung zum Nachweis der stofflichen Entsprechung sind umfassende Analysen zur Charakterisierung des Metaboloms unter Verwendung entsprechender Profiling-Techniken.

4.3 Samenspezifische Suppression der Sinapinsäureester

Gentechnische Methoden erlauben, im Gegensatz zur traditionellen Mutationszüchtung, eine gerichtete, sequenzspezifische Hemmung und durch Wahl geeigneter Promotoren eine entwicklungs- und gewebespezifische Suppression von Genen. Gleiches trifft auf die Überexpression zu. Bei der Transformation von *B. napus* kommen vielfach samenspezifische Promotoren zum Einsatz, die ausschließlich in einem definierten Entwicklungsstadium im Samen aktiv sind (Sjödahl et al., 1995; Ellerstrom et al., 1996). Auch für andere Pflanzen wie Tabak (Chen et al., 2003), *A. thaliana* (Byzova et al., 2004) oder Baumwolle (Sunilkumar et al., 2006) wurde die gewebespezifische Suppression verschiedener Gene gezeigt.

Um eine samenspezifische Suppression der Enzyme BnSCT und UGT84A9 sowie die Überexpression der Sinapinesterase (BnSCE3) zu erzielen, wurden für die RNAi-Konstrukte bzw. für die Expressionskassette der samenspezifische Napin-Promoter aus *B. napus* genutzt (Hüsken et al., 2005; Weier et al., 2008; Clauß et al., 2011). Speicherproteine wie Napin oder Cruciferin akkumulieren während der Samenentwicklung und dienen während der Keimung als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle. Während der frühen Embryogenese, in der der Embryo eine Reihe von Zellteilungen durchläuft und alle Grundstrukturen angelegt werden, ist keine Akkumulation von Napin zu verzeichnen. In den voll ausgebildeten Koteltydonen (ca. 25 Tage nach Blühbeginn) ist ein stark zunehmender Gehalt an Napin zu beobachten. Nach weiteren 20 Tagen (ca. 45 Tage nach Blühbeginn), wenn der Same in die Austrocknungsphase übergeht, kommt es zu keiner weiteren Akkumulation (Crouch et al., 1981; Höglund et al., 1992). Der Nachweis von mRNA des Speicherproteins Napin ist bereits während der frühen Embryogenese, ca. 18 Tage nach Blühbeginn, möglich. Anschließend kommt es zu einer stetigen Zunahme von mRNA (bis 33 Tage nach Blühbeginn). Während der späten Samenreife kommt es zur Abnahme der mRNA und in reifen Samen ist nahezu kein Transkript mehr detektierbar (Delisle et al., 1989). Napin wird während der Keimung abgebaut und es ist keine weitere Neusynthese zu verzeichnen, so dass die Expression des Speicherproteins streng samenspezifisch erfolgt. Aufgrund der guten Korrelation zwischen Transkript-Abundanzen der Gene *UGT84A9* und *BnSCT* (Milkowski et al., 2004) mit der Transkript-Abundanz des Napin-Gens sollte eine samenspezifische Suppression der Gene *UGT84A9* und *BnSCT* möglich sein.

Die Bedeutung einer entwicklungs- und/oder gewebespezifischen Suppression einzelner Gene wird am Beispiel der Arabidopsis-Mutante *fah1*, die eine Mutation in der F5H hat, ersichtlich (Chapple et al., 1992). Aufgrund des Unvermögens Sinapinsäureester zu synthetisieren zeigen diese Pflanzen während der Keimungs-

und Wachstumsphase unter Einwirkung von UV-Strahlung erhebliche morphologische und physiologische Schäden (Landry et al., 1995), die auf die Abwesenheit von Sinapinsäureestern als UV-Schutz zurückzuführen sind (Li et al., 1993; Sheahan 1996).

Für die zwei analysierten *UGT84A9i*-Rapslinien konnte für die Generation T5 gezeigt werden, dass diese Linien eine verminderte Akkumulation von *UGT84A9*-Transkript während der Samenreifung und frühen Keimlingsentwicklung zeigten (Mittasch 2008). Hierbei wurden die Samenentwicklungsstadien C (5 WAF; voll entwickelter, grüner Embryo) und D (7 WAF; reife Samen) sowie 2, 4, 7, 10 und 14 Tage alte Keimlinge analysiert. Für Wildtyp-Samen wurden in den Stadien C und D Transkriptmengen von *UGT84A9* in hoher Abundanz detektiert. Für die *UGT84A9i*-Linien konnte in Stadium C nahezu kein *UGT84A9*-Transkript ermittelt werden. In reifen Samen hingegen wurde eine verbleibende Menge von *UGT84A9*-Transkript nachgewiesen, die jedoch deutlich niedriger war als in Wildtyp-Samen. Dieses Ergebnis zeigt, dass der RNAi-Effekt nicht zum vollständigen Silencing des Gens *UGT84A9* führt und somit eine Erklärung für die unvollständige Reduktion von Sinapin und anderen Sinapinsäureestern in diesen Rapslinien liefert.

In Keimlingen des Wildtyps wurde ebenso *UGT84A9*-Transkript nachgewiesen, wobei eine kontinuierliche Abnahme von zwei Tage alten Keimlingen zu 14 Tage alten Keimlingen erfolgte und nach dieser Zeit nahezu kein Transkript mehr nachweisbar war. Für Keimlinge der *UGT84A9i*-Linien (2, 4, 7 und 10 Tage) wurden reduzierte Transkriptmengen festgestellt und nach 14 Tagen eine vergleichbare Abundanz zum Wildtyp. Der zu beobachtende RNAi-Effekt in Keimlingen der *UGT84A9i*-Linien lässt sich allerdings nicht darauf zurückführen, dass die Suppressionskassette während der Keimung aktiv ist, da in Keimlingen keine *de novo*-Synthese des Speicherproteins Napin erfolgt. Der RNAi-Effekt wird in diesem Fall durch die verbleibende *UGT84A9*-Transkript-Menge während der Samenreifung verursacht.

Die Analyse der *UGT84A9*-Transkript-Abundanz lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Suppression des Enzyms *UGT84A9* samenspezifisch erfolgt. Um diese Erkenntnisse auf der Ebene des Stoffwechsels zu überprüfen, wurden sowohl Rapssamen verschiedener Entwicklungsstadien als auch Keimlinge hinsichtlich qualitativer und quantitativer Veränderungen von Sameninhaltsstoffen analysiert. Für *UGT84A9i*-Samen der Entwicklungsstadien A und B wurden keine signifikanten Veränderungen hinsichtlich analysierter Metabolite detektiert. Erst in der Entwicklungsphase C (5 WAF; voll entwickelter, grüner Embryo) konnten erste Konzentrationsänderungen von Sameninhaltsstoffen detektiert werden. In dieser

Phase der Samenentwicklung wurde, wie bereits erläutert, eine reduzierte *UGT84A9*-Transkriptmenge beobachtet, so dass das Auftreten signifikant veränderter Metabolite mit dem Auftreten des RNAi-Effektes korreliert. In Samenentwicklungsstadium C wurden für Sinapoylglucose und für Hydroxyzimtsäure-abgeleitete Cholinester verminderte Konzentrationen gefunden, jedoch nicht für Sinapin selbst. Gleichzeitig wurden bereits in diesem Stadium eine Zunahme von 4-O- β -Glucosyl-*E*-sinapinsäure und 4-O-Glucosylsinapoylcholin beobachtet. Diese Erkenntnisse unterstützen die Hypothese eines negativen Feedbackmechanismus, der durch anfängliche Akkumulation von Sinapinsäure einen verminderten Kohlenstoff-Fluss von 4-Cumarsäure zu Sinapinsäure bewirkt und gleichzeitig durch Glycosylierung die Detoxifizierung freier, reaktiver Säuren bewirkt. Die Analyse der reifen Samen lieferte, wie bereits geschildert, eine Vielzahl signifikant veränderter Metabolite und lässt die Auswirkungen des RNAi-Effektes auf den gesamten Stoffwechsel deutlich werden.

Die Analyse von Keimblättern (2, 4, 7, 10 und 14 Tage nach Aussaat) der Linien *UGT84A9i* zeigte mit zunehmender Keimlingsentwicklung die kontinuierliche Abnahme signifikant veränderter Metabolite, so dass der Rückgang des RNAi-Effektes beobachtet werden kann. Um den Effekt des verminderten Sinapin-Gehaltes in reifen Samen auf die Keimlingsentwicklung und somit auf die Fitness der Pflanzen genauer zu untersuchen, wurden Keimblätter hinsichtlich quantitativer Veränderungen bereits identifizierter Sekundärstoffe der reifen Samen analysiert.

Während der Keimlingsentwicklung der Wildtyp-Pflanzen wird die in Form von Sinapin und anderen Sinapinsäureestern vorhandene Sinapinsäure für die Synthese von Sinapoylmalat mobilisiert, welches in der Vakuole von Epidermiszellen akkumuliert und dort als Schutz vor UVB-Strahlung dient (Li et al., 1993; Sheahan 1996; Bharti et al., 1997). In Keimblättern von *UGT84A9i* wurde eine verzögerte Akkumulation von Sinapoylmalat beobachtet, wobei nach 14 Tagen etwa die Hälfte des Sinapoylmalatgehaltes von Wildtyp-Keimblättern erreicht wurde.

Während der Keimlingsentwicklung ist insbesondere die Konzentrationsänderung der in *UGT84A9i*-Samen signifikant veränderten Metabolite interessant. Hierbei konnte beobachtet werden, dass eine Vielzahl induzierter Metabolite, vor allem die durch den postulierten Detoxifizierungsmechanismus glycosylierten Verbindungen während der Keimung kurzzeitig einen weiteren Konzentrationsanstieg zeigten (bis 4 Tage nach Keimung) und anschließend metabolisiert wurden und die somit entstehende Sinapinsäure in die Synthese von Sinapoylmalat einging. Diese Beobachtung lässt sich durch den anfänglich noch vorhandenen RNAi-Effekt in Keimlingen begründen. Während der Keimung wird das vorhandene Sinapin durch das Enzym

Sinapinesterase in Sinapinsäure und Cholin gespalten (Nurmann et al., 1979; Strack et al., 1980). Aufgrund der immer noch vorhandenen Suppression des Enzyms UGT84A9 wird die akkumulierende Sinapinsäure durch Glucosylierung detoxifiziert. Während der fortschreitenden Keimung kommt es jedoch zur Abnahme des RNAi-Effektes und somit zur Synthese von Sinapoylglucose, welches anschließend durch das Enzym SMT zu Sinapoylmalat umgewandelt wird.

Ein weiterer wichtiger Aspekt während der Keimung ist die Bereitstellung von Cholin als Ausgangssubstrat für Phosphatidylcholin, das als essenzieller Bestandteil von Zellmembranen fungiert (Rhodes et al., 1993; Kent 1995). Das während der Samenentwicklung gebildete Sinapin kann als Speicherform von Cholin diskutiert werden (Strack 1981). Allerdings war die Abnahme des Sinapin-Gehaltes in *UGT84A9i*-Samen mit einer Akkumulation von freiem Cholin verbunden, die offenbar weder auf die Samenentwicklung noch auf die Keimlingsentwicklung einen negativen Effekt ausübte.

Insgesamt konnte während der Keimung der *UGT84A9i*-Rapslinien im Gewächshaus weder eine verminderte Keimungsrate noch morphologische Veränderungen der Pflanzen festgestellt werden. Diese Beobachtungen sowie die Ergebnisse der Metabolitenanalysen während der Keimung lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Suppression des Enzyms UGT84A9 samenspezifisch erfolgt und die Fitness der Pflanze unter Gewächshausbedingungen durch Verminderung des Sinapinsäureester-Gehaltes nicht beeinträchtigt ist.

Für die Rapslinien *UGT84A9i/BnSCTi*, *BnSCE3OE* und *UGT84A9i/BnSCE3OE* wurden während der Keimung nur die Konzentrationsänderung der Metabolite Sinapin, Sinapoylglucose und Sinapoylmalat analysiert. Hierbei wurde ebenso wie für *UGT84A9i*-Keimlinge beobachtet, dass die Akkumulation von Sinapoylmalat verzögert ist und erst nach etwa 8 bis 12 Tagen nach Aussaat beginnt und nach einem Zeitraum von 20 Tagen das Wildtyp-Niveau noch nicht erreicht wurde. Die kontinuierliche Zunahme von Sinapoylmalat zeigt jedoch auch für diese Pflanzen, dass die Keimlingsentwicklung unter Gewächshausbedingungen nicht beeinträchtigt erscheint und Suppression bzw. Überexpression der entsprechenden Enzyme samenspezifisch erfolgt. Allerdings wäre zur Verifikation dieser Hypothese die Analyse der entsprechenden Transkripte und Metabolite notwendig.

4.4 Einfluss der UVB-Exposition auf die Keimlingsentwicklung von *UGT84A9i*

Während der Samenkeimung von *B. napus* erfolgt durch das Enzym Sinapinesterase die Spaltung von Sinapin zu Sinapinsäure und Cholin (Nurmann et al., 1979; Strack et al., 1980). Anschließend wird Sinapinsäure durch die Aktivität der UGT84A9 zu Sinapoylglucose verestert und darauf folgend durch das Enzym SMT zu Sinapoylmalat konvertiert (Tkotz et al., 1980; Strack 1982; Chapple et al., 1992; Mock et al., 1992; Lehfeldt et al., 2000). Sinapoylmalat akkumuliert in den Vakuolen der epidermalen und subepidermalen Zellschichten (Strack et al., 1985) und schützt das darunter liegende photosynthetisch aktive Gewebe vor schädigender UV-Strahlung (Li et al., 1993; Sheahan 1996; Bharti et al., 1997). Neben der Akkumulation von Phenylpropanen zum Schutz vor UV-Strahlung werden von Pflanzen ebenso Flavonoide gebildet (Li et al., 1993; Sheahan 1996). Strahlung im UV-Bereich (UVB: 280-315 nm, UVA: 315-400 nm) führt zu Schädigung der DNA (Stapleton 1992; Bharti et al., 1997) und physiologischer Prozesse wie z. B. der Photosynthese durch Abbau von Proteinen des Photosystems II (Booij-James et al., 2000). Flavonoide zeigen Absorptionseigenschaften im Wellenlängenbereich von 240-285 nm (A-Ring) sowie zwischen 300-400 nm (B-Ring) (Markham et al., 1975) und Phenylpropane im Wellenlängenbereich von 300 bis 330 nm (Sheahan 1996).

In *UGT84A9i*-Samen wurde ein signifikant erniedrigter Sinapin-Gehalt im Vergleich zu Wildtyp-Samen festgestellt. Infolgedessen fehlt den *UGT84A9i*-Linien während der frühen Keimlingsentwicklung die daraus freigesetzte Sinapinsäure zur Synthese des UV-Schutzpigmentes Sinapoylmalat. Dementsprechend findet die Synthese von Sinapoylmalat in *UGT84A9i*-Keimlingen im Vergleich zum Wildtyp verzögert statt und die Konzentration in den transgenen Keimlingen erreicht nicht den Wert in Wildtyp-Keimlingen. Um zu überprüfen, ob der Mangel an Sinapoylmalat eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber UV-Stress bedingt, wurde der Einfluss natürlicher UVB-Strahlung auf die Keimungsrate und Keimlingsentwicklung von transgenem Niedrig-Sinapin-Raps untersucht. Weiterhin wurde der Frage nachgegangen, ob unter natürlicher UVB-Einstrahlung die Pflanzen vermehrt Sinapinsäureester oder Flavonoide zum Eigenschutz bilden. Zu diesem Zweck wurden pro Linie (Wildtyp, *UGT84A9i* Linie 1 und *UGT84A9i* Linie 2) und Behandlung (+/- UVB) 100 Samen auf Erde ausgesät und danach in einem sog. „Sonnensimulator“ überführt. Die Bestimmung der Keimungsrate nach vier Tagen zeigte weder einen Unterschied zwischen den Linien einer Behandlung noch zwischen den Behandlungen selbst. Auch hinsichtlich Größe und Wuchsform der Keimlinge konnten keine wesentlichen Unterschiede festgestellt werden.

Der Vergleich der Sinapoylmalat-Akkumulation innerhalb einer Linie (Wildtyp Kontrolle vs. Wildtyp +UVB; *UGT84A9i* Kontrolle vs. *UGT84A9i* +UVB) zeigte während der Keimlingsentwicklung keine Unterschiede, so dass durch die erhöhte UVB-Einstrahlung keine Induktion der Sinapoylmalat-Synthese beobachtet werden konnte. Allerdings zeigten die *UGT84A9i*-Keimlinge im Vergleich zum Wildtyp wieder eine verminderte Sinapoylmalat-Konzentration.

Außerdem wurde die Konzentration von Flavonoiden, dargestellt durch die Anzahl von Quercetin- und Kämpferol-Derivaten sowohl zwischen den Linien als auch zwischen den Behandlungen verglichen. Hierbei wurde festgestellt, dass Wildtyp und *UGT84A9i*-Keimlinge unter UVB-Einstrahlung vermehrt Quercetin-Derivate synthetisierten, wohingegen die Konzentration von Kämpferol-Derivaten unverändert blieb. Interessanterweise konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Quercetin-Derivate zwischen Wildtyp und *UGT84A9i* beobachtet werden. Die Konzentrationszunahme der Quercetin-Derivate im Vergleich zur Kontrolle betrug bei 8d DAS, 11d DAS und 16d DAS das 9-, 13- und 18-fache. Aus diesen Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass *UGT84A9i* Keimlinge auch bei erhöhter UVB-Einstrahlung durch die Synthese von Flavonoiden einen effektiven Schutz vor schädigender UVB-Strahlung aufbauen. Die Analyse weiterer HPLC-Peaks, die anhand ihres Absorptionsspektrums als Phenylpropanoide klassifiziert wurden, ergab erhöhte Konzentrationen in UVB-exponierten Keimblättern, wobei wie bei den Flavonoiden kein Unterschied zwischen Wildtyp und *UGT84A9i* festgestellt wurde. Die Konzentration an Flavonoiden war jedoch etwa um den Faktor 2 größer als die Konzentration der Phenylpropanoide (abzüglich Sinapoylmalat).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bei erhöhter UVB-Exposition vermehrt Flavonoide in Form von Quercetin-Derivaten sowohl in Wildtyp als auch in *UGT84A9i*-Keimblättern gebildet werden. Zusätzlich kommt es zu einer Akkumulation von Phenylpropanoiden, die aber im Vergleich zu den Flavonoiden in geringerer Abundanz vorkommen. Die Synthese von Sinapoylmalat wurde durch erhöhte UVB-Exposition nicht induziert. Die verminderte Konzentration von Sinapoylmalat in *UGT84A9i*-Keimblättern hatte offensichtlich keinen negativen Effekt auf die Keimlingsentwicklung bei erhöhter UVB-Exposition.

Der Einfluss von schädigender UVB-Strahlung konnte beispielsweise für die Arabidopsis-Mutanten *tt4* und *tt5* (*transparent testa*) gezeigt werden (Sheahan 1996);(Landry et al., 1995). Durch eine Mutation der Chalkon-Synthase (*tt4*) bzw. der Chalkon-Isomerase (*tt5*) sind diese Pflanzen nicht mehr in der Lage Flavonoide zu synthetisieren. Zusätzlich zeigen *tt5*-Pflanzen einen verringerten Gehalt an Sinapinsäureestern, was im Vergleich zu *tt4*-Pflanzen dazu führt, dass *tt5*-Pflanzen

noch sensitiver auf UVB-Strahlung reagieren (Li et al., 1993; Böttcher et al., 2008). Für die Arabidopsis-Mutante *fah1* konnte ebenso der schädigende Einfluss von UVB-Strahlung gezeigt werden (Landry et al., 1995). Diese Pflanzen weisen eine Mutation der F5H auf und zeigen in reifen Samen eine Sinapinreduktion auf 5 % des Wildtypgehaltes. In Blättern von *fah1*-Pflanzen konnte nahezu kein Sinapoylmalat nachgewiesen werden (Chapple et al., 1992). Zusätzlich ist der Gehalt an Flavonoiden reduziert. Unter Einwirkung von UV-Strahlung zeigten diese Pflanzen erhebliche morphologische und physiologische Schäden (Landry et al., 1995). Die Sensitivität der Mutanten *fah1*, *tt4* und *tt5* gegenüber UVB-Strahlung zeigt, dass sowohl das Fehlen von Flavonoiden als auch von Sinapinsäureestern die Anfälligkeit gegenüber UVB-Strahlung beeinflussen und je mehr Verbindungen aus beiden Substanzklassen fehlen, desto sensitiver reagieren die Pflanzen. Meißner et al. (2008) konnten für *A. thaliana* zeigen, dass Sinapinsäureester für die Kurzzeit-Adaption (10 h) an erhöhte UVB-Strahlung eine wichtige Rolle spielen und bei längerer Exposition (6 d) vermehrt Flavonoide, insbesondere Quercetin-Derivate, gebildet werden. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse unterstützen die bereits geschilderten Resultate und zeigen die Bedeutung der Flavonoide und Sinapinsäureester als Antwort auf UVB-Exposition. Hierbei kann den Flavonoiden, aufgrund einer höheren Abundanz, im Vergleich zu den Sinapinsäureestern eine gesteigerte Relevanz zugeordnet werden.

5 Weiterführende Arbeiten

Die Ergebnisse der Metabolitenanalysen für Samen und Keimlinge der Rapslinien *UGT84A9i*, *UGT84A9i/BnSCTi*, *BnSCE3OE* und *UGT84A9i/BnSCE3OE* zeigten, dass die Auswirkungen verschiedener Strategien zur Verminderung des antinutritiven Sinapins und anderer Sinapinsäureester weit reichende Konsequenzen für den gesamten Samenmetabolismus haben. Hierbei konnte für alle Rapslinien eine Vielzahl signifikant reduzierter, aber auch induzierter Metabolite beobachtet werden. Die Netto-Absenkung von Sinapinsäure-Derivaten weist auf eine negative Feedback-Regulation der Hydroxyzimtsäure-Biosynthese hin, die durch die transgenen Strategien ausgelöst wird.

Um die postulierte Regulation über einen Feedback-Mechanismus zu verifizieren sind gewebespezifische Analysen sowohl während der Samen- als auch der Keimlingsentwicklung nötig. Der Same könnte hinsichtlich Embryo und Samenschale differenziert werden und während der Keimung die Keim- und Primärblätter analysiert werden. Hierbei sollten sowohl Analysen des Metaboloms als auch des Transkriptoms in Betracht gezogen werden. So könnte z. B. die vergleichende Analyse des Transkriptoms während der Samenentwicklung von Wildtyp und transgenen Rapslinien sowie die vergleichende Analyse der Aktivitäten wichtiger Enzyme der Sinapin-Biosynthese Aufschluss zum Mechanismus der Feedback-Regulation geben.

Hinsichtlich der Analyse des Metaboloms können auch Fütterungsexperimente mit ^{13}C oder mit radioaktiv markiertem Phenylalanin erfolgen. Hierdurch könnte die Biosynthese der Hydroxyzimtsäuren verfolgt werden. Dies würde auch Untersuchungen zum Einbau von HCAs in pflanzliche Zellwände ermöglichen.

Die Anfälligkeit von Niedrig-Sinapin-Rapslinien gegenüber biotischem und abiotischem Stress wurde bisher nur hinsichtlich einer erhöhten UVB-Exposition durchgeführt. Hier sind weitere Analysen sowohl unter Gewächshaus- als auch unter Freiland-Bedingungen durchzuführen, um die Fitness der Pflanzen zu beurteilen. Dies könnte Experimente zur Anfälligkeit gegenüber Trocken-, Wasser- und Salztress umfassen und auch die Reaktion auf Pathogen- und Schadinsektenbefall.

In der Arbeit wurden verschiedene Strategien zur Senkung des Sinapinsäureester-Gehaltes analysiert. Die Kreuzung von *UGT84A9i*- und *BnSCE3OE*-Pflanzen resultierte in der effizientesten Absenkung von Sinapin und weiteren Sinapinsäureestern und eignet sich somit ideal für Untersuchungen zur Regulation des Samenstoffwechsels. Hierzu wäre zunächst die Erzeugung einer entsprechenden Insertionskassette (*UGT84A9i*, *BnSCE3OE*), die Transformation von *B. napus* und die Selektion genetisch stabiler homozygoter Rapslinien durchzuführen.

6 Zusammenfassung

Das primäre Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung quantitativer und qualitativer metabolischer Veränderungen der Niedrig-Sinapin-Rapslinien *UGT84A9i*, *UGT84A9i/BnSCTi* und *UGT84A9i/BnSCE3*. Die Rapslinie *UGT84A9i* supprimiert samenspezifisch das Enzym UDP-Glucose:Sinapat-Glucosyltransferase, welches den Glucoserest von UDP-Glucose auf die Carboxylgruppe der Sinapinsäure überträgt und somit 1-O-Sinapoylglucose synthetisiert. Durch kombinierte Suppression der Gene *UGT84A9* und *BnSCT* kann zusätzlich das Enzym Sinapoyl- β -D-glucose:Cholin-Sinapoyltransferase supprimiert werden, welches die Biosynthese von Sinapin aus den Substraten Cholin und 1-O-Sinapoylglucose katalysiert. Die Rapslinie *UGT84A9i/BnSCE3OE* resultiert aus der Kreuzung von *UGT84A9i*- und *BnSCE3OE*-Pflanzen. Letztere zeigen eine Überexpression einer Sinapinesterase, die Sinapin zu Sinapinsäure und Cholin hydrolysiert. Die Analyse von *UGT84A9i/BnSCE3OE* Pflanzen diente vorwiegend dazu, das Potenzial dieses Ansatzes hinsichtlich der Konzentrationserniedrigung der Sinapinsäureester zu überprüfen.

Für die Rapslinien *UGT84A9i* und *UGT84A9i/BnSCTi* konnte eine stabile Absenkung des Sinapin- und Gesamt-Sinapinsäureester-Gehaltes bis in die Generationen T7 und T8 bzw. T4 und T5 nachgewiesen werden. Der verbleibende Sinapinsäureester-Gehalt betrug für die Linie *UGT84A9i* ca. 44 % und für die Linie *UGT84A9i/BnSCTi* ca. 63 %. Der erfolgreichste Ansatz war die Kreuzung aus *UGT84A9i* und *BnSCE3OE*, der eine Absenkung der Gesamt-Sinapinsäureester auf 7 % erreichte.

Die Analyse reifer Samen der Rapslinien *UGT84A9i*, *UGT84A9i/BnSCTi* und *UGT84A9i/BnSCE3OE* hinsichtlich löslicher Primär- und Sekundärstoffe zeigte mit zunehmender Reduktion des Gesamt-Sinapinsäureester-Gehaltes einen zahlenmäßigen Anstieg signifikant veränderter Metabolite.

Die Netto-Absenkung von Hydroxyzimtsäure-Derivaten der transgenen Rapslinien führte zu der Hypothese, dass es einen verminderten Kohlenstoff-Fluss von 4-Cumarsäure zu Sinapinsäure gibt. Hierbei wird vermutet, dass ein negativer Feedback-Mechanismus durch Akkumulation von freier Sinapinsäure aktiviert wird. Zusätzlich wurde beobachtet, dass freie aromatische Säuren durch Glycosylierung oder Konjugation mit anderen kleinen Molekülen wie Methylresten oder Cystein detoxifiziert werden. Auch das Auftreten von glycosylierten C₆-C₁ Verbindungen konnte beobachtet werden. Zusätzlich zur Fraktion löslicher Phenylpropane wurden Zellwand-gebundene Phenole analysiert. Es konnten hier jedoch nur marginale

Veränderungen festgestellt werden, die eine bedeutende Umverteilung der Sekundärmetabolite vom löslichen zum Zellwand-gebundenen Anteil ausschließt.

Veränderungen von Primärmetaboliten wurden überwiegend für Intermediate des Zitronensäurezyklus und für verschiedene Aminosäuren beobachtet. Auch hier wurde mit zunehmender Reduktion des Sinapinsäureester-Gehaltes eine zunehmende Anzahl signifikant veränderter Metabolite detektiert. Der Grad der Veränderung war jedoch nicht so stark ausgeprägt wie für Sekundärstoffe und konnte ursächlich nicht erklärt werden.

Untersuchungen zum Gehalt von freiem Cholin in reifen Samen wurden nur für die Rapslinien *UGT84A9i* und *UGT84A9i/BnSCTi* durchgeführt. Hier konnte mit abnehmendem Sinapin-Gehalt ein zunehmender Cholingehalt beobachtet werden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass in transgenen Samen nur ein Teil des Cholins akkumuliert, das normalerweise in Form von Sinapin gespeichert wird. Das vermehrte freie Cholin scheint im Gegensatz zu freien HCAs und HBAs offenbar keinen nachteiligen Effekt auf den Samenstoffwechsel zu bewirken.

Auch die Analyse wertbestimmender Größen wie Öl-, Protein- und Glucosinolat-Gehalt sowie Rohfaserkomponenten für die Rapslinien *UGT84A9i* und *UGT84A9i/BnSCTi* lieferte keinen Hinweis auf unvorteilhafte Veränderungen.

Für die Rapslinien *UGT84A9i* und *UGT84A9i/BnSCTi* wurden zusätzlich Analysen zur samenspezifischen Suppression der Sinapinsäureester durchgeführt. Es wurden definierte Stadien der Samen- und Keimlingsentwicklung hinsichtlich Veränderungen löslicher Primär- und Sekundärmetabolite analysiert. Für beide Rapslinien wurde beobachtet, dass erste Veränderungen im Metabolitenprofil von 5 Wochen alten Samen mit voll entwickeltem, grünen Embryo auftreten. Diese Veränderungen manifestieren sich während der weiteren Samenentwicklung und die zahlreichsten Veränderungen traten in reifen Samen auf. Während der Keimlingsentwicklung erfolgte der kontinuierliche Rückgang signifikant veränderter Metabolite. Allerdings konnte 14 Tage nach Keimung der Sinapoylmalatgehalt in transgenen Keimblättern noch nicht das Wildtyp-Niveau erreichen.

Auch in nahezu Sinapin-freien Rapssamen der Linie *UGT84A9i/BnSCE3OE* begann 8 Tage nach Keimung die Sinapoylmalat-Akkumulation in den Keimblättern und erreichte nach 20 Tagen etwa die Hälfte des Wildtyp-Niveaus.

Die Auswirkungen des veränderten Metabolitenprofils auf die UVB-Stressantwort von Keimpflanzen wurde für die Rapslinie *UGT84A9i* untersucht. Zunächst wurde das Akkumulationsverhalten von Sinapoylmalat bestimmt. Es konnte innerhalb einer Linie (Wildtyp Kontrolle vs. Wildtyp +UVB; *UGT84A9i* Kontrolle vs. *UGT84A9i* +UVB) keine

Induktion der Sinapoylmalat-Synthese durch UVB-Einstrahlung festgestellt werden. Allerdings zeigten die *UGT84A9i*-Keimlinge im Vergleich zum Wildtyp wieder eine verminderte Sinapoylmalat-Konzentration. Weiterhin wurde die Konzentration von Flavonoiden, ausgedrückt in Quercetin- und Kämpferol-Derivaten, sowohl zwischen den Linien als auch zwischen den Behandlungen verglichen. Beide Linien synthetisierten unter UVB-Einstrahlung vermehrt Quercetin-Derivate, wohingegen die Konzentration von Kämpferol-Derivaten unverändert blieb. Hinsichtlich der Quercetin-Derivate wurde zwischen Wildtyp und *UGT84A9i* kein signifikanter Unterschied detektiert. Insgesamt wurde festgestellt, dass bei erhöhter UVB-Exposition vermehrt Flavonoide in Form von Quercetin-Derivaten sowohl in Wildtyp- als auch in *UGT84A9i*-Keimblättern gebildet werden. Die Synthese von Sinapoylmalat wurde durch erhöhte UVB-Exposition nicht induziert. Die verminderte Konzentration von Sinapoylmalat in *UGT84A9i*-Keimblättern hat offensichtlich keinen negativen Effekt auf die Keimlingsentwicklung bei erhöhter UVB-Exposition.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zu Veränderungen von Primär- und Sekundärmetaboliten der Rapslinien *UGT84A9i*, *UGT84A9i/BnSCTi* und *UGT84A9i/BnSCE3OE* zeigen die Komplexität der Regulation des Samenmetabolismus und liefern gleichzeitig wertvolle Informationen für weiterführende Analysen der Regulationsmechanismen. Auch in Hinblick auf das Konzept des „Substantial equivalence“ zeigt diese Arbeit die Bedeutung umfassender Metabolitenanalysen für die Bewertung von gentechnisch veränderten Nutzpflanzen.

Literaturverzeichnis

- Allwood J. W., Ellis D. I., Heald J. K., Goodacre R. und Mur L. A. (2006). Metabolomic approaches reveal that phosphatidic and phosphatidyl glycerol phospholipids are major discriminatory non-polar metabolites in responses by *Brachypodium distachyon* to challenge by *Magnaporthe grisea*. *Plant J.* **46**: 351-368.
- Allwood J. W., Erban A., de Koning S., Dunn W. B., Luedemann A., Lommen A., Kay L., Loscher R., Kopka J. und Goodacre R. (2009). Inter-laboratory reproducibility of fast gas chromatography-electron impact-time of flight mass spectrometry (GC-EI-TOF/MS) based plant metabolomics. *Metabolomics* **5**: 479-496.
- Allwood J. W. und Goodacre R. (2010). An introduction to liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation applied in plant metabolomic analyses. *Phytochem. Analysis* **21**: 33-47.
- Barz W., Köster J., Weltring K. M. und Strack D. (1985). Recent advances in the metabolism and degradation of phenolic compounds in plants and animals. In: CF Van Sumere, PJ Lea (Ed). Annual Proceedings of the Phytochemical Society of Europe, Clarendon Press, Oxford, UK: 307-347.
- Baumert A., Milkowski C., Schmidt J., Nimtz M., Wray V. und Strack D. (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.
- Beimen A., Bempohl A., Meletzus D., Eichenlaub R. und Barz W. (1992). Accumulation of phenolic compounds in leaves of tomato plants after infection with *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* strains differing in virulence. *Z. Naturforsch.* **47c**: 898-909.
- Bell J. M. (1993). Factors affecting the nutritional value of canola meal: a review. *Can. J. Anim. Sci.* **73**: 689-697.
- Bharti A. K. und Khurana J. P. (1997). Mutants of *Arabidopsis* as tools to understand the regulation of phenylpropanoid pathway and UVB protection mechanisms. *Photochem. Photobiol. Sci.* **65**: 765-776.
- Bhinu V. S., Schäfer U. A., Li R., Huang J. und Hannoufa A. (2009). Targeted modulation of sinapine biosynthesis pathway for seed quality improvement in *Brassica napus*. *Transgenic Res.* **18**: 31-44.
- Bidlack J., Malone M. und Benson R. (1992). Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. *Proc. Okla. Acad. Sci.* **72**: 51-56.
- Blau K. und King G. S. (1993). Handbook of derivatives for chromatography. Heyden, London, UK.
- Boerjan W., Ralph J. und Baucher M. (2003). Lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**: 519-546.
- Booij-James I. S., Dube S. K., Jansen M. A., Edelman M. und 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.
- Böttcher C., von Roepenack-Lahaye E., Schmidt J., Clemens S. und Scheel D. (2009). Analysis of phenolic choline esters from seeds of *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* by capillary liquid chromatography/electrospray-tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **44**: 466-476.
- Böttcher C., von Roepenack-Lahaye E., Schmidt J., Schmotz C., Neumann S., Scheel D. und Clemens S. (2008). Metabolome analysis of biosynthetic mutants reveals a diversity of metabolic changes and allows identification of a large number of new compounds in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **147**: 2107-2120.
- Bouché N. und Fromm H. (2004). GABA in plants: just a metabolite? *Trends Plant Sci.* **9**: 110-115.
- Boudet A. M. (1998). A new view of lignification. *Trends Plant Sci.* **3**: 67-71.
- Brügger B., Erben G., Sandhoff R., Wieland F. T. und Lehmann W. D. (1997). Quantitative analysis of biological membrane lipids at the low picomole level by nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 2339-2344.
- Byrdwell W. C. (2001). Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for analysis of lipids. *Lipids* **36**: 327-346.
- Byzova M., Verduyn C., De Brouwer D. und De Block M. (2004). Transforming petals into sepaloid organs in *Arabidopsis* and oilseed rape: implementation of the hairpin RNA-mediated gene silencing technology in an organ-specific manner. *Planta* **218**: 379-387.
- Cai S. S. und Syage J. A. (2006). Comparison of atmospheric pressure photoionization, atmospheric pressure chemical ionization, and electrospray ionization mass spectrometry for analysis of lipids. *Anal. Chem.* **78**: 1191-1199.
- Carpita N. C. (1996). Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. *Annu. Rev. Plant Phys.* **47**: 445-476.
- Catchpole G. S., Beckmann M., Enot D. P., Mondhe M., Zywicki B., Taylor J., Hardy N., Smith A., King R. D., Kell D. B., Fiehn O. und Draper J. (2005). Hierarchical metabolomics demonstrates substantial compositional similarity between genetically modified and conventional potato crops. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 14458-14462.
- Chapple C. C., Vogt T., Ellis B. E. und Somerville C. R. (1992). An *Arabidopsis* mutant defective in the general phenylpropanoid pathway. *Plant Cell* **4**: 1413-1424.
- Chen S., Hofius D., Sonnewald U. und Börnke F. (2003). Temporal and spatial control of gene silencing in transgenic plants by inducible expression of double-stranded RNA. *Plant J.* **36**: 731-740.
- Cintron J. M. und Colon L. A. (2002). Organo-silica nano-particles used in ultrahigh-pressure liquid chromatography. *Analyst* **127**: 701-704.

- Clauß K., Baumert A., Nimtz M., Milkowski C. und 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., Erban A., Kopka J., Scheel D., Milkowski C. und Strack D. (2011). Overexpression of sinapine esterase BnSCE3 in oilseed rape seeds triggers global changes in seed metabolism. *Plant Physiol.* **155**: 1127-1145.
- Crouch M. L. und Sussex I. M. (1981). Development and storage-protein synthesis in *Brassica napus* L. embryos in vivo and in vitro. *Planta* **153**: 64-74.
- Dachtler M., Glaser T., Kohler K. und Albert K. (2001). Combined HPLC-MS and HPLC-NMR on-line coupling for the separation and determination of lutein and zeaxanthin stereoisomers in spinach and in retina. *Anal. Chem.* **73**: 667-674.
- De Ascensao A. R. F. D. C. und Dubery I. A. (2003). Soluble and wall-bound phenolics and phenolic polymers in *Musa acuminata* roots exposed to elicitors from *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. *Phytochemistry* **63**: 679–686.
- De Vos R. C., Moco S., Lommen A., Keurentjes J. J., Bino R. J. und Hall R. D. (2007). Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat. Protoc.* **2**: 778-791.
- Delisle A. J. und Crouch M. L. (1989). Seed storage protein transcription and mRNA levels in *Brassica napus* during development and in response to exogenous abscisic acid. *Plant Physiol.* **91**: 617-623.
- Döring T., Köfferlein M., Thiel S. und Seidlitz H. K. (1996). Spectral shaping of artificial UV-B irradiation for vegetation stress research. *J. Plant Physiol.* **148**: 115-119.
- Downey R. K. und Bell J. M. (1990). New development in canola research. In: F. Shahidi (Ed.). *Canola and Rapeseed. Production, Chemistry, Nutrition and Processing Technology*. Van Nostrand Reinhold, New York, USA: 37-46.
- Ehltling J., Hamberger B., Million-Rousseau R. und Werck-Reichhart D. (2006). Cytochromes P450 in phenolic metabolism. *Phytochem. Rev.* **5**: 239-270.
- Ellerstrom M., Stalberg K., Ezcurra I. und Rask L. (1996). Functional dissection of a napin gene promoter: identification of promoter elements required for embryo and endosperm-specific transcription. *Plant Mol. Biol.* **32**: 1019-1027.
- Engqvist M. K., Kuhn A., Wienstroer J., Weber K., Jansen E. E., Jakobs C., Weber A. P. und Maurino V. G. (2011). Plant D-2-hydroxyglutarate dehydrogenase participates in the catabolism of lysine especially during senescence. *J. Biol. Chem.* **286**: 11382-11390.
- Fenwick G. R. (1982). The assessment of a new protein source—Rapeseed. *P. Nutr. Soc.* **41**: 277-288.
- Fiehn O. (2001). Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comp. Funct. Genomics* **2**: 155-168.
- Fiehn O. (2002). Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol. Biol.* **48**: 155-171.

- Font R., Wittkop B., Badani A. G., Río-Celestino M. D., Friedt W., Lühs W. und Haro-Bailón A. D. (2005). The measurements of acid detergent fibre in rapeseed by visible and near-infrared spectroscopy. *Plant Breeding* **124**: 410-412.
- Franke R., Hemm M. R., Denault J. W., Ruegger M. O., Humphreys J. M. und Chapple C. (2002). Changes in secondary metabolism and deposition of an unusual lignin in the *ref8* mutant of *Arabidopsis*. *Plant J.* **30**: 47-59.
- Franke R., Humphreys J. M., Hemm M. R., Denault J. W., Ruegger M. O., Cusumano J. C. und Chapple C. (2002). The *Arabidopsis* REF8 gene encodes the 3-hydroxylase of phenylpropanoid metabolism. *Plant J.* **30**: 33-45.
- Fraser P. D., Pinto M. E., Holloway D. E. und Bramley P. M. (2000). Technical advance: application of high-performance liquid chromatography with photodiode array detection to the metabolic profiling of plant isoprenoids. *Plant J.* **24**: 551-558.
- Fry S. C. (1982). Phenolic components of the primary cell wall. Feruloylated disaccharides of D-galactose and L-arabinose from spinach polysaccharide. *Biochem. J.* **203**: 493-504.
- Fry S. C. (1986). Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annu. Rev. Plant Phys.* **37**: 165-186.
- Giavalisco P., Hummel J., Lisec J., Inostroza A. C., Catchpole G. und Willmitzer L. (2008). High-resolution direct infusion-based mass spectrometry in combination with whole ¹³C metabolome isotope labeling allows unambiguous assignment of chemical sum formulas. *Anal. Chem.* **80**: 9417-9425.
- Goodacre R., York E. V., Heald J. K. und Scott I. M. (2003). Chemometric discrimination of unfractionated plant extracts analyzed by electrospray mass spectrometry. *Phytochemistry* **62**: 859-863.
- Hajdich M., Casteel J. E., Hurrelmeyer K. E., Song Z., Agrawal G. K. und Thelen J. J. (2006). Proteomic analysis of seed filling in *Brassica napus*. Developmental characterization of metabolic isozymes using high-resolution two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiol.* **141**: 32-46.
- Hall R., Beale M., Fiehn O., Hardy N., Sumner L. und Bino R. (2002). Plant metabolomics: the missing link in functional genomics strategies. *Plant Cell* **14**: 1437-1440.
- Hall R. D. (2006). Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. *New Phytol.* **169**: 453-468.
- Hanhineva K., Rogachev I., Kokko H., Mintz-Oron S., Venger I., Karenlampi S. und Aharoni A. (2008). Non-targeted analysis of spatial metabolite composition in strawberry (*Fragaria x ananassa*) flowers. *Phytochemistry* **69**: 2463-2481.
- Hanson A. D. und Rhodes D. (1983). ¹⁴C tracer evidence for synthesis of choline and betaine via phosphoryl base intermediates in salinized sugarbeet leaves. *Plant Physiol.* **71**: 692-700.
- Hartley R. D. und Ford C. W. (1989). Phenolic constituents of plant cell walls and wall biodegradability. In: NG Lewis, MG Paice (Ed). *Plant Cell Wall Polymers*, American Chemical Society Symposium Series 399, Washington, DC: 137-145.

- Hendrawati O., Yao Q., Kim H. K., Linthorst H. J. M., Erkelens C., Lefeber A. W. M., Choi Y. H. und Verpoorte R. (2006). Metabolic differentiation of Arabidopsis treated with methyl jasmonate using nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Plant Sci.* **170**: 1118-1124.
- Hoffmann L., Maury S., Martz F., Geoffroy P. und Legrand M. (2003). Purification, cloning, and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinate ester intermediates in phenylpropanoid metabolism. *J. Biol. Chem.* **278**: 95-103.
- Höglund A. S., Rodin J., Larsson E. und Rask L. (1992). Distribution of napin and cruciferin in developing rape seed embryos. *Plant Physiol.* **98**: 509-515.
- Hopfgartner G., Varesio E., Tschappat V., Grivet C., Bourgoigne E. und Leuthold L. A. (2004). Triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer for the analysis of small molecules and macromolecules. *J. Mass Spectrom.* **39**: 845-855.
- Huang J., Bhinu V. S., Li X., Dallal Bashi Z., Zhou R. und Hannoufa A. (2009). Pleiotropic changes in Arabidopsis *f5h* and *sct* mutants revealed by large-scale gene expression and metabolite analysis. *Planta* **230**: 1057-1069.
- Huang J., Hirji R., Adam L., Rozwadowski K. L., Hammerlindl J. K., Keller W. A. und Selvaraj G. (2000). Genetic engineering of glycinebetaine production toward enhancing stress tolerance in plants: metabolic limitations. *Plant Physiol.* **122**: 747-756.
- Huang J., Rozwadowski K., Bhinu V. S., Schäfer U. und 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. Bioch.* **46**: 647-654.
- Humphreys J. M. und Chapple C. (2002). Rewriting the lignin roadmap. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 224-229.
- Humphreys J. M., Hemm M. R. und Chapple C. (1999). New routes for lignin biosynthesis defined by biochemical characterization of recombinant ferulate 5-hydroxylase, a multifunctional cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 10045-10050.
- Hüsken A., Baumert A., Strack D., Becker H. C., Möllers C. und Milkowski C. (2005). Reduction of sinapate ester content in transgenic oilseed rape (*Brassica napus*) by dsRNAi-based suppression of BnSGT1 gene expression. *Mol. Breeding* **16**: 127-138.
- Jolivet Y., Hamelin J. und Larher F. (1983). Osmoregulation in halophytic higher plants: the protective effects of glycinebetaine and other related solutes against the oxalate destabilization of membranes in beet root cells. *Z. Pflanzenphysiol.* **109S**: 171-180.
- Jolivet Y., Larher F. und Hamelin J. (1982). Osmoregulation in halophytic higher plants: the protective effect of glycinebetaine against the heat destabilization of membranes. *Plant Sci. Lett.* **25**: 193-201.

- Keller H., Hohlfeld H., Wray V., Hahlbrock K., Scheel D. und Strack D. (1996). Changes in the accumulation of soluble and cell wall-bound phenolics in elicitor-treated cell suspension cultures and fungus-infected leaves of *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry* **42**: 389-396.
- Kent C. (1995). Eukaryotic phospholipid biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **64**: 315-343.
- Kim J. K., Bamba T., Harada K., Fukusaki E. und Kobayashi A. (2007). Time-course metabolic profiling in *Arabidopsis thaliana* cell cultures after salt stress treatment. *J. Exp. Bot.* **58**: 415-424.
- Knapp D. R. (1979). Handbook of analytical derivatization reactions. John Wiley & Sons, New York, USA
- Kopka J., Fernie A., Weckwerth W., Gibon Y. und Stitt M. (2004). Metabolite profiling in plant biology: platforms and destinations. *Genome Biol.* **5**: 109.
- Kopka J., Schauer N., Krueger S., Birkemeyer C., Usadel B., Bergmüller E., Dormann P., Weckwerth W., Gibon Y., Stitt M., Willmitzer L., Fernie A. R. und Steinhauser D. (2005). GMD@CSB.DB: the Golm Metabolome Database. *Bioinformatics* **21**: 1635-1638.
- Kozłowska H., Naczek M., Shahidi F. und Zadernowski R. (1990). Phenolic acids and tannins in rapeseed and canola. In: F Shahidi (Ed.). Canola and Rapeseed: Production, Chemistry, Nutrition and Processing Technology. Van Nostrand Reinhold, New York, USA: 103-210.
- Krall J. P., Edwards G. E. und Andreo C. S. (1989). Protection of pyruvate, pi dikinase from maize against cold lability by compatible solutes. *Plant Physiol.* **89**: 280-285.
- Kramer J. K., Sauer F. D., Wolynetz M. S., Farnworth E. R. und Johnston K. M. (1992). Effects of dietary saturated fat on erucic acid induced myocardial lipidosis in rats. *Lipids* **27**: 619-623.
- Lacombe E., Hawkins S., Van Doorselaere J., Piquemal J., Goffner D., Poeydomenge O., Boudet A. M. und Grima-Pettenati J. (1997). Cinnamoyl CoA reductase, the first committed enzyme of the lignin branch biosynthetic pathway: cloning, expression and phylogenetic relationships. *Plant J.* **11**: 429-441.
- Landry L. G., Chapple C. C. und Last R. L. (1995). *Arabidopsis* mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. *Plant Physiol.* **109**: 1159-1166.
- Lehfeldt C., Shirley A. M., Meyer K., Ruegger M. O., Cusumano J. C., Viitanen P. V., Strack D. und Chapple C. (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 H.-J. und Deinzer M. L. (2007). Tandem mass spectrometry for sequencing proanthocyanidins. *Anal. Chem.* **79**: 1739-1748.
- Li J., Ou-Lee T. M., Raba R., Amundson R. G. und Last R. L. (1993). *Arabidopsis* flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *Plant Cell* **5**: 171-179.

- Liang Y. S., Choi Y. H., Kim H. K., Linthorst H. J. und Verpoorte R. (2006). Metabolomic analysis of methyl jasmonate treated *Brassica rapa* leaves by 2-dimensional NMR spectroscopy. *Phytochemistry* **67**: 2503-2511.
- Lisec J., Schauer N., Kopka J., Willmitzer L. und Fernie A. R. (2006). Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nat. Protoc.* **1**: 387-396.
- Little J. L. (1999). Artifacts in trimethylsilyl derivatization reactions and ways to avoid them. *J. Chromatogr. A* **844**: 1-22.
- Lorenzen M., Racicot V., Strack D. und Chapple C. (1996). Sinapic acid ester metabolism in wild type and a sinapoylglucose-accumulating mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **112**: 1625-1630.
- Loscher R. und Heide L. (1994). Biosynthesis of p-hydroxybenzoate from p-coumarate and p-coumaroyl-coenzyme A in cell-free extracts of *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures. *Plant Physiol.* **106**: 271-279.
- Lu W., Bennett B. D. und Rabinowitz J. D. (2008). Analytical strategies for LC-MS-based targeted metabolomics. *J. Chromatogr. B* **871**: 236-242.
- Lüdemann A., Strassburg K., Erban A. und Kopka J. (2008). TagFinder for the quantitative analysis of gas chromatography--mass spectrometry (GC-MS)-based metabolite profiling experiments. *Bioinformatics* **24**: 732-737.
- Lytovchenko A., Beleggia R., Schauer N., Isaacson T., Leuendorf J. E., Hellmann H., Rose J. K. und Fernie A. R. (2009). Application of GC-MS for the detection of lipophilic compounds in diverse plant tissues. *Plant Methods* **5**: 4.
- MacNair J. E., Lewis K. C. und Jorgenson J. W. (1997). Ultrahigh-pressure reversed-phase liquid chromatography in packed capillary columns. *Anal. Chem.* **69**: 983-989.
- Markham K. R. (1989). Flavones, flavonols and their glycosides. In: JB Harborne (Ed.). *Methods in Plant Biochemistry*. Academic Press New York, USA, **1**: 197-235.
- Markham K. R. und Mabry T. J. (1975). *Mass spectrometry of flavonoids. The Flavonoids*. London, Chapman and Hall: 78-126.
- Mathew S. und Abraham T. E. (2004). Ferulic acid: an antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* **24**: 59-83.
- Meißner D., Albert A., Böttcher C., Strack D. und 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.
- Meyer K., Cusumano J. C., Somerville C. und Chapple C. C. (1996). Ferulate-5-hydroxylase from *Arabidopsis thaliana* defines a new family of cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 6869-6874.

- Meyermans H., Morreel K., Lapierre C., Pollet B., De Bruyn A., Busson R., Herdewijn P., Devreese B., Van Beeumen J., Marita J. M., Ralph J., Chen C., Burggraeve B., Van Montagu M., Messens E. und Boerjan W. (2000). Modifications in lignin and accumulation of phenolic glucosides in poplar xylem upon down-regulation of caffeoyl-coenzyme A O-methyltransferase, an enzyme involved in lignin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **275**: 36899-36909.
- Milkowski C., Baumert A., Schmidt D., Nehlin L. und 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. und Strack D. (2000). Cloning and heterologous expression of a rape cDNA encoding UDP-glucose:sinapate glucosyltransferase. *Planta* **211**: 883-886.
- Milkowski C. und Strack D. (2010). Sinapate esters in brassicaceous plants: biochemistry, molecular biology, evolution and metabolic engineering. *Planta* **232**:19-35.
- Miller H. I. (1999). Substantial equivalence: its uses and abuses. *Nat. Biotechnol.* **17**: 1042-1043.
- Mittasch J. (2008). Hydroxycinnamate glucosyltransferase genes in *Brassica napus*, encoding key enzymes in sinapate ester metabolism. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Mock H. P., Vogt T. und Strack D. (1992). Sinapoylglucose:malate sinapoyltransferase activity in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus*. *Z. Naturforsch.* **47c**: 680-682.
- Naczek M., Amarowicz R., Sullivan A. und 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. und 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., Datla R. S., Keller W. A. und Selvaraj G. (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.
- Nesi N., Delourme R., Bregeon M., Falentin C. und Renard M. (2008). Genetic and molecular approaches to improve nutritional value of *Brassica napus* L. seed. *C. R. Biol.* **331**: 763-771.
- Nuccio M. L., Russell B. L., Nolte K. D., Rathinasabapathi B., Gage D. A. und Hanson A. D. (1998). The endogenous choline supply limits glycine betaine synthesis in transgenic tobacco expressing choline monooxygenase. *Plant J.* **16**: 487-496.
- Nurmann G. und Strack D. (1979). Sinapine Esterase I. Characterization of sinapine esterase from cotyledons of *Raphanus sativus*. *Z. Naturforsch.* **34c**: 715-720.

- Nurmann G. und Strack D. (1980). Formation of 1-Sinapoylglucose by UDP-Glucose:Sinapic Acid Glucosyltransferase from cotyledons of *Raphanus sativus*. *Z. Pflanzenphysiol.* **102**: 11-17.
- Ohlson R. (1978). Functional properties of rapeseed oil and protein product. In: *Proceedings of 5th International Rapeseed Congress*. Malmö, Schweden: 152-167.
- Oliver S. G., Winson M. K., Kell D. B. und Baganz F. (1998). Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol.* **16**: 373-378.
- Penry J. T. und Manore M. M. (2008). Choline: an important micronutrient for maximal endurance-exercise performance? *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* **18**: 191-203.
- Raffaelli A. und Saba A. (2003). Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **22**: 318-331.
- Rahman M. H. (2001). Production of yellow-seeded *Brassica napus* through interspecific crosses. *Plant Breeding* **120**: 463-472.
- Rhodes D. und Hanson A. D. (1993). Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu. Rev. Plant Phys.* **44**: 357-384.
- Rischer H., Oresic M., Seppanen-Laakso T., Katajamaa M., Lammertyn F., Ardiles-Diaz W., Van Montagu M. C., Inze D., Oksman-Caldentey K. M. und Goossens A. (2006). Gene-to-metabolite networks for terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 5614-5619.
- Rochfort S. J., Trenerry V. C., Imsic M., Panozzo J. und Jones R. (2008). Class targeted metabolomics: ESI ion trap screening methods for glucosinolates based on MSn fragmentation. *Phytochemistry* **69**: 1671-1679.
- Rozwadowski K. L., Khachatourians G. G. und Selvaraj G. (1991). Choline oxidase, a catabolic enzyme in *Arthrobacter pascens*, facilitates adaptation to osmotic stress in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**: 472-478.
- Saito K. und Matsuda F. (2010). Metabolomics for functional genomics, systems biology, and biotechnology. *Annu. Rev. Plant Biol.* **61**: 463-489.
- Sato S., Soga T., Nishioka T. und Tomita M. (2004). Simultaneous determination of the main metabolites in rice leaves using capillary electrophoresis mass spectrometry and capillary electrophoresis diode array detection. *Plant J.* **40**: 151-163.
- Schauer N., Steinhauser D., Strelkov S., Schomburg D., Allison G., Moritz T., Lundgren K., Roessner-Tunali U., Forbes M. G., Willmitzer L., Fernie A. R. und Kopka J. (2005). GC-MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. *FEBS Lett.* **579**: 1332-1337.
- Schauer N., Zamir D. und Fernie A. R. (2005). Metabolic profiling of leaves and fruit of wild species tomato: a survey of the *Solanum lycopersicum* complex. *J. Exp. Bot.* **56**: 297-307.
- Schillmiller A. L., Stout J., Weng J. K., Humphreys J., Ruegger M. O. und Chapple C. (2009). Mutations in the cinnamate 4-hydroxylase gene impact metabolism, growth and development in Arabidopsis. *Plant J.* **60**: 771-782.

- Schliemann W., Ammer C. und Strack D. (2008). Metabolite profiling of mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Phytochemistry* **69**: 112-146.
- Schmid J. und Amrhein N. (1995). Molecular organization of the shikimate pathway in higher plants. *Phytochemistry* **39**: 737-749.
- Schoch G., Goepfert S., Morant M., Hehn A., Meyer D., Ullmann P. und Werck-Reichhart D. (2001). CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* is a 3'-hydroxylase of phenolic esters, a missing link in the phenylpropanoid pathway. *J. Biol. Chem.* **276**: 36566-36574.
- Schripsema J. (2010). Application of NMR in plant metabolomics: techniques, problems and prospects. *Phytochem. Analysis* **21**: 14-21.
- Schumann W. und Schulz R. R. (2000). Entwicklung des Glucosinolatgehaltes in Raps-Handelspartien. *Raps* **18**: 202-205.
- Schweiggert U., Kammerer D. R., Carle R. und Schieber A. (2005). Characterization of carotenoids and carotenoid esters in red pepper pods (*Capsicum annuum* L.) by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Sp.* **19**: 2617-2628.
- Schwender J., Ohlrogge J. B. und Shachar-Hill Y. (2003). A flux model of glycolysis and the oxidative pentosephosphate pathway in developing *Brassica napus* embryos. *J. Biol. Chem.* **278**: 29442-29453.
- Schwender J., Shachar-Hill Y. und Ohlrogge J. B. (2006). Mitochondrial metabolism in developing embryos of *Brassica napus*. *J. Biol. Chem.* **281**: 34040-34047.
- Shahidi F. und Naczki M. (1992). An overview of the phenolics of canola and rapeseed: chemical, sensory and nutritional significance. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **69**: 917-924.
- Sheahan J. J. (1996). Sinapate esters provide greater UV-B attenuation than flavonoids in *Arabidopsis thaliana* (*Brassicaceae*). *Am. J. Bot.* **83**: 679-686.
- Shirley A. M., McMichael C. M. und 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. und Chapple C. (2007). The hyper-fluorescent trichome phenotype of the *brt1* mutant of *Arabidopsis* is the result of a defect in a sinapic acid: UDPG glucosyltransferase. *Plant J.* **49**: 655-668.
- Sircar D. und Mitra A. (2008). Evidence for p-hydroxybenzoate formation involving enzymatic phenylpropanoid side-chain cleavage in hairy roots of *Daucus carota*. *J. Plant Physiol.* **165**: 407-414.
- Sjödahl S., Gustavsson H. O., Rödin J. und Rask L. (1995). Deletion analysis of the *Brassica napus* cruciferin gene *cru 1* promoter in transformed tobacco: promoter activity during early and late stages of embryogenesis is influenced by *cis*-acting elements in partially separate regions. *Planta* **197**: 264-271.
- Stapleton A. E. (1992). Ultraviolet radiation and plants: burning questions. *Plant Cell* **4**: 1353-1358.

- Stein S. E. (1999). An integrated method for spectrum extraction and compound identification from gas chromatography/mass spectrometry data. *J. Am. Soc. Mass Spectr.* **10**: 770-781.
- Stoutjesdijk P. A., Singh S. P., Liu Q., Hurlstone C. J., Waterhouse P. A. und Green A. G. (2002). hpRNA-mediated targeting of the Arabidopsis FAD2 gene gives highly efficient and stable silencing. *Plant Physiol.* **129**: 1723-1731.
- 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- β -D-glucose: L-malate sinapoyltransferase activity in cotyledons of red radish (*Raphanus sativus* L. var. *sativus*). *Planta* **155**: 31-36.
- Strack D., Knogge W. und Dahlbender B. (1983). Enzymatic synthesis of sinapine from 1-O-sinapoyl- β -D-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., Nurmman G. und Sachs G. (1980). Sinapine Esterase II. Specificity and change of sinapine esterase activity during germination in *Raphanus sativus*. *Z. Naturforsch.* **35c**: 963-966.
- Strack D., Pieroth M., Scharf H. und Sharma V. (1985). Tissue distribution of phenylpropanoid metabolism in cotyledons of *Raphanus sativus* L. *Planta* **164**: 507-511.
- Sumner L. W., Mendes P. und Dixon R. A. (2003). Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry* **62**: 817-836.
- Sunilkumar G., Campbell L. M., Puckhaber L., Stipanovic R. D. und Rathore K. S. (2006). Engineering cottonseed for use in human nutrition by tissue-specific reduction of toxic gossypol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 18054-18059.
- Suzuki S., Sakakibara N., Li L., Umezawa T. und Chiang V. (2010). Profiling of phenylpropanoid monomers in developing xylem tissue of transgenic aspen (*Populus tremuloides*). *J. Wood Sci.* **56**: 71-76.
- Tan J., Bednarek P., Liu J., Schneider B., Svatos A. und Hahlbrock K. (2004). Universally occurring phenylpropanoid and species-specific indolic metabolites in infected and uninfected *Arabidopsis thaliana* roots and leaves. *Phytochemistry* **65**: 691-699.
- Tautenhahn R., Böttcher C. und Neumann S. (2008). Highly sensitive feature detection for high resolution LC/MS. *BMC Bioinformatics* **9**: 504.
- Thiel S., Döhring T., Köfferlein M., Kosak A., Martin P. und Seidlitz H. K. (1996). Phytotron for plant stress research: how far can artificial lighting compare to natural sunlight? *J. Plant Physiol.* **148**: 456-463.
- Tikunov Y., Lommen A., de Vos C. H., Verhoeven H. A., Bino R. J., Hall R. D. und Bovy A. G. (2005). A novel approach for nontargeted data analysis for metabolomics. Large-scale profiling of tomato fruit volatiles. *Plant Physiol.* **139**: 1125-1137.

- Timischl B., Dettmer K., Kaspar H., Thieme M. und Oefner P. J. (2008). Development of a quantitative, validated capillary electrophoresis-time of flight-mass spectrometry method with integrated high-confidence analyte identification for metabolomics. *Electrophoresis* **29**: 2203-2214.
- 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.
- Townsend B. J. und Llewellyn D. J. (2007). Reduced terpene levels in cottonseed add food to fiber. *Trends Biotechnol.* **25**: 239-241.
- Tweeddale H., Notley-McRobb L. und Ferenci T. (1998). Effect of slow growth on metabolism of *Escherichia coli*, as revealed by global metabolite pool ("metabolome") analysis. *J. Bacteriol.* **180**: 5109-5116.
- Vickery M. L. (1981). Sugar metabolism. In: ML Vickery, B Vichery (Ed.). Secondary Plant Metabolism. University Park Press, Baltimore, USA: 32-41.
- Vogt T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Mol. Plant* **3**: 2-20.
- Vogt T. und Jones P. (2000). Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterization of a supergene family. *Trends Plant Sci.* **5**: 380-386.
- von Roepenack-Lahaye E., Degenkolb T., Zerjeski M., Franz M., Roth U., Wessjohann L., Schmidt J., Scheel D. und Clemens S. (2004). Profiling of *Arabidopsis* secondary metabolites by capillary liquid chromatography coupled to electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Plant Physiol.* **134**: 548-559.
- Wallace G. und Fry S. C. (1994). Phenolic components of the plant cell wall. *Int. Rev. Cytol.* **151**: 229-267.
- Want E. J., Cravatt B. F. und Siuzdak G. (2005). The expanding role of mass spectrometry in metabolite profiling and characterization. *ChemBioChem* **6**: 1941-1951.
- Ward J. L., Baker J. M. und Beale M. H. (2007). Recent applications of NMR spectroscopy in plant metabolomics. *FEBS J.* **274**: 1126-1131.
- Weier D., Mittasch J., Strack D. und 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.
- Willis D. (1972). Internal standard method calculations. *Chromatographia* **5**: 42-43.
- Wolfram K., Schmidt J., Wray V., Milkowski C., Schliemann W. und Strack D. (2010). Profiling of phenylpropanoids in transgenic low-sinapine oilseed rape (*Brassica napus*). *Phytochemistry* **71**: 1076-1084.
- Wyn Jones R. G. (1984). Phytochemical aspects of osmotic adaptation. *Recent Adv. Phytochem.* **18**: 55-78.
- Yazaki K., Heide L. und Tabata M. (1991). Formation of p-hydroxybenzoic acid from p-coumaric acid by cell free extract of *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures *Phytochemistry* **30**: 2233-2236.

- Zeisel S. H. und da Costa K. A. (2009). Choline: an essential nutrient for public health. *Nutr. Rev.* **67**: 615-623.
- Zhao Y., Aspinall D. und Paleg L. G. (1992). Protection of membrane integrity in *Medicago sativa* L. by glycinebetaine against the effects of freezing. *J. Plant Physiol.* **140**: 541–543.

Anhang

A. Quantifizierung von Sinapin und Gesamt-Sinapinsäureestern

Zusammenfassung der Quantifizierungsergebnisse von Sinapin und Gesamt-Sinapinsäureestern. Die zwei rechten Spalten der Tabellen beinhalten den verbleibenden Gehalt von Sinapin- und Gesamt-Sinapinsäureestern im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp.

Tabelle 6-1: Ergebnisse der Quantifizierung von Sinapin und Gesamt-Sinapinsäureestern (Gesamt-SE) für reife Wildtyp- und *UGT84A9i*-Samen (Mittelwert \pm Standardabweichung).

Kulti- vierung	Linie	Sinapin [nmol/mg FW]	Gesamt-SE [nmol/mg FW]	Sinapin- Gehalt [%]	Gesamt-SE- Gehalt [%]
1	Wildtyp	29,56 \pm 0,77	34,56 \pm 1,46		
1 (T7)	<i>UGT84A9i</i> (1)	13,03 \pm 0,80	13,88 \pm 0,47	44,07	40,16
1 (T7)	<i>UGT84A9i</i> (2)	15,22 \pm 0,48	15,78 \pm 0,46	51,48	45,65
2	Wildtyp	27,15 \pm 0,99	33,72 \pm 0,72		
2 (T8)	<i>UGT84A9i</i> (1)	13,38 \pm 0,89	14,56 \pm 0,60	49,28	43,18
2 (T8)	<i>UGT84A9i</i> (2)	14,69 \pm 1,65	15,68 \pm 0,62	54,10	46,51
Gesamt				49,73	43,87

Tabelle 6-2: Ergebnisse der Quantifizierung von Sinapin und Gesamt-Sinapinsäureestern für reife Wildtyp- und *UGT84A9i/BnSCTi*-Samen (Mittelwert \pm Standardabweichung).

Kulti- vierung	Linie	Sinapin [nmol/mg FW]	Gesamt-SE [nmol/mg FW]	Sinapin- Gehalt [%]	Gesamt-SE- Gehalt [%]
1	Wildtyp	23,15 \pm 0,87	33,35 \pm 1,82		
1 (T4)	<i>UGT84A9i/ BnSCTi</i>	16,29 \pm 0,69	19,49 \pm 0,88	70,38	58,45
2	Wildtyp	22,16 \pm 0,74	31,27 \pm 0,65		
2 (T5)	<i>UGT84A9i/ BnSCTi</i>	16,74 \pm 0,97	20,84 \pm 0,87	75,53	66,65
Gesamt				72,96	62,55

Tabelle 6-3: Ergebnisse der Quantifizierung von Sinapin und Gesamt-Sinapinsäureestern für reife Samen der Linien *UGT84A9i*, *BnSCE3OE*, *UGT84A9i/BnSCE3OE* sowie den Wildtyp (Drakkar, Lisora) (Mittelwert \pm Standardabweichung).

Linie	Sinapin [nmol/mg FW]	Gesamt-SE [nmol/mg FW]	Sinapin- Gehalt [%]	Gesamt-SE- Gehalt [%]
Wildtyp Lisora	20,82 \pm 0,66	40,85 \pm 0,39		
<i>UGT84A9i</i> / <i>BnSCE3OE</i>	0,21 \pm 0,04	3,25 \pm 0,43	1,02	7,96
Wildtyp Drakkar	37,63 \pm 0,83	54,66 \pm 0,71		
<i>UGT84A9i</i> / <i>BnSCE3OE</i>	0,21 \pm 0,04	3,25 \pm 0,43	0,56	5,95
Wildtyp Drakkar	37,63 \pm 0,83	54,66 \pm 0,71		
<i>UGT84A9i</i>	21,56 \pm 2,26	24,03 \pm 1,99	57,29	43,95
Wildtyp Lisora	20,82 \pm 0,66	40,85 \pm 0,39		
<i>BnSCE3OE</i>	0,18 \pm 0,05	13,12 \pm 1,32	0,87	32,13

B. Analyse von Zellwand-gebundenen Phenolen

Tabelle 6-4: Ergebnisse der Analyse von Zellwand-gebundenen Phenolen in reifen *UGT84A9i*- und Wildtyp-Samen. Signifikante Unterschiede sind unterstrichen und fett hervorgehoben.

Metabolit	Verhältnis <i>UGT84A9i</i> zu Wildtyp	Metabolit	Verhältnis <i>UGT84A9i</i> zu Wildtyp
<i>p</i> -Cumarsäure	0,91	Koniferylaldehyd	1,07
Kaffeensäure	1,09	Sinapylaldehyd	1,17
Ferulasäure	<u>0,87</u>	4-Hydroxybenzaldehyd	0,97
5-Hydroxyferulasäure	0,83	Vanillaldehyd	0,98
Sinapinsäure	<u>0,54</u>	Syringaldehyd	<u>1,41</u>
Benzoessäure	0,76		
Vanillinsäure	0,96	Koniferylalkohol	n.d.
Syringasäure	<u>1,69</u>	Sinapylalkohol	n.d.

Tabelle 6-5: Ergebnisse der Analyse von Zellwand-gebundenen Phenolen in reifen *UGT84A9i/BnSCTi*- und Wildtyp-Samen. Signifikante Unterschiede sind unterstrichen und fett hervorgehoben.

Metabolit	Verhältnis <i>UGT84A9i/BnSCTi</i> zu Wildtyp	Metabolit	Verhältnis <i>UGT84A9i/BnSCTi</i> zu Wildtyp
<i>p</i> -Cumarsäure	0,87	Koniferylaldehyd	1,34
Kaffeensäure	1,29	Sinapylaldehyd	1,03
Ferulasäure	<u>1,45</u>	4-Hydroxybenzaldehyd	1,06
5-Hydroxyferulasäure	1,19	Vanillaldehyd	1,18
Sinapinsäure	1,31	Syringaldehyd	<u>1,82</u>
Benzoessäure	0,95		
Vanillinsäure	<u>1,25</u>	Koniferylalkohol	n.d.
Syringasäure	<u>2,01</u>	Sinapylalkohol	n.d.

C. Analyse von HCA- und HBA-Äquivalenten

Tabelle 6-6: Ergebnisse der Analyse von Hydroxyzimtsäure- und Hydroxybenzoesäure-Äquivalenten in Wildtyp- und *UGT84A9i*-Samen. Signifikante Unterschiede sind unterstrichen und fett hervorgehoben.

Metabolit	Verhältnis <i>UGT84A9i</i> zu Wildtyp	Metabolit	Verhältnis <i>UGT84A9i</i> zu Wildtyp
<i>p</i> -Cumarsäure	0,78	Koniferylaldehyd	0,88
Kaffeesäure	0,58	Sinapylaldehyd	<u>2,27</u>
Ferulasäure	<u>0,16</u>	4-Hydroxybenzaldehyd	0,90
5-Hydroxyferulasäure	<u>0,36</u>	Vanillaldehyd	0,51
Sinapinsäure	<u>0,43</u>	Syringaldehyd	<u>0,38</u>
Benzoessäure	0,87		
Vanillinsäure	0,76	Koniferylalkohol	n.d.
Syringasäure	<u>2,38</u>	Sinapylalkohol	n.d.

Tabelle 6-7: Ergebnisse der Analyse von Hydroxyzimtsäure- und Hydroxybenzoesäure-Äquivalenten in Wildtyp- und *UGT84A9i/BnSCTi*-Samen. Signifikante Unterschiede sind unterstrichen und fett hervorgehoben.

Metabolit	Verhältnis <i>UGT84A9i/BnSCTi</i> zu Wildtyp	Metabolit	Verhältnis <i>UGT84A9i/BnSCTi</i> zu Wildtyp
<i>p</i> -Cumarsäure	<u>0,26</u>	Koniferylaldehyd	1,13
Kaffeesäure	<u>0,58</u>	Sinapylaldehyd	<u>1,79</u>
Ferulasäure	<u>0,18</u>	4-Hydroxybenzaldehyd	0,90
5-Hydroxyferulasäure	0,75	Vanillaldehyd	0,94
Sinapinsäure	<u>0,63</u>	Syringaldehyd	<u>0,68</u>
Benzoessäure	1,05		
Vanillinsäure	0,89	Koniferylalkohol	n.d.
Syringasäure	1,38	Sinapylalkohol	n.d.

D. Cholinquantifizierung

Tabelle 6-8: Cholinquantifizierung für reife Wildtyp- und *UGT84A9i*-Samen.

Metabolit	Wildtyp	<i>UGT84A9i</i>
Cholin (pmol / mg Frischgewicht)	371,77 ± 25,50	4364,59 ± 148,45

Tabelle 6-9: Cholinquantifizierung für reife Wildtyp- und *UGT84A9i/BnSCTi*-Samen.

Metabolit	Wildtyp	<i>UGT84A9i/BnSCTi</i>
Cholin (pmol / mg Frischgewicht)	457,64 ± 44,51	3580,05 ± 156,64

E. Quantifizierung von Glucose, Fructose und Saccharose

a. Ergebnisse für *UGT84A9i*

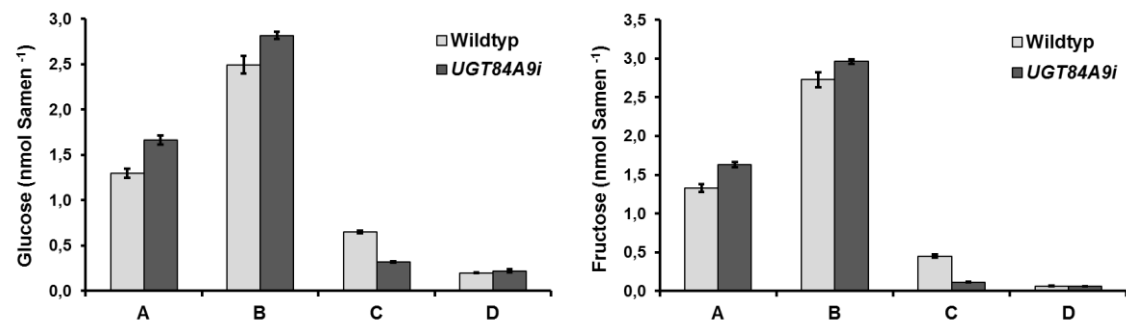


Abbildung 6-1: Konzentration von Glucose und Fructose in *UGT84A9i*- und Wildtyp-Samen der Entwicklungsstadien A, B, C und D.

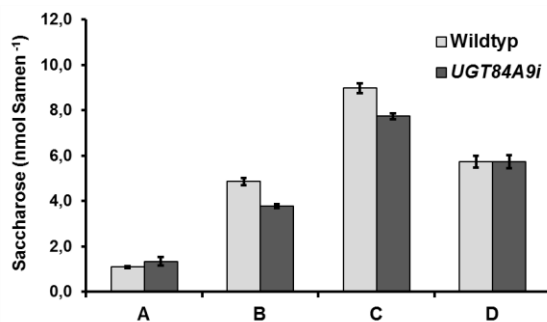


Abbildung 6-2: Konzentration von Saccharose in *UGT84A9i*- und Wildtyp-Samen der Entwicklungsstadien A, B, C und D.

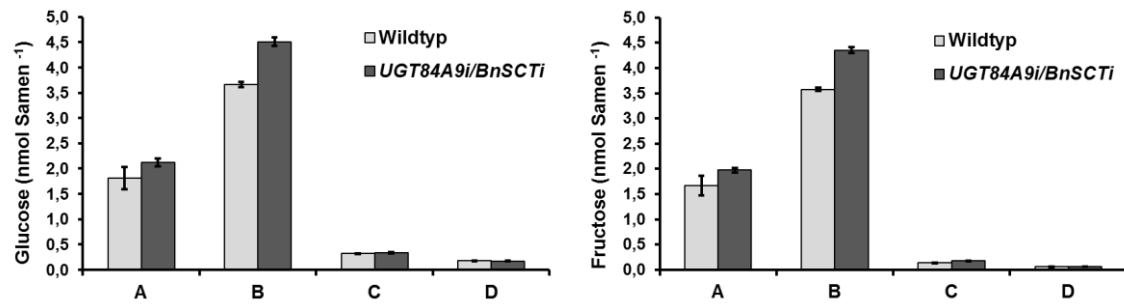
b. Ergebnisse für *UGT84A9i/BnSCTi*

Abbildung 6-3: Konzentration von Glucose und Fructose in *UGT84A9i/BnSCTi*- und Wildtyp-Samen der Entwicklungsstadien A, B, C und D.

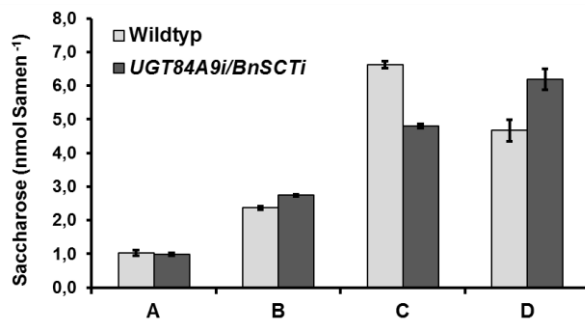


Abbildung 6-4: Konzentration von Saccharose in *UGT84A9i/BnSCTi*- und Wildtyp-Samen der Entwicklungsstadien A, B, C und D.

F. Analyse von Sekundärmetaboliten für *UGT84A9i*-Pflanzen

Tabelle 6-10: Ergebnisse der Analyse von Sekundärmetaboliten für *UGT84A9i*-Samen im Vergleich zum Wildtyp für die Samenentwicklungsstadien A, B, C und D. Signifikante Unterschiede sind unterstrichen und fett hervorgehoben; * unter dem Detektionslimit in *UGT84A9i*; n.d. nicht detektierbar.

Cluster	Nr.	Metabolit	Verhältnis <i>UGT84A9i</i> zu Wt			
			A	B	C	D
1	3	4-O-Hexosylvanilloylcholin	n.d.	n.d.	0,76	0,64
1	21	SC(4-O-8')S	n.d.	0,45	1,11	0,75
1	7	Vanilloylcholin	n.d.	n.d.	1,05	0,76
1	73	FC(5-8')S-4-O-hexosid	n.d.	n.d.	0,95	0,83
1	11	FC(4-O-8')S-4-O'-hexosid	n.d.	1,00	1,08	0,83
1	26	FC(5-8')G	0,30	0,56	0,63	0,57
1	22	SC(4-O-8')G	0,87	0,50	0,88	0,61
1	18	FC(4-O-8')S	n.d.	0,47	0,57	0,50
1	85	UK#13 (phenolischer Cholinester)	n.d.	n.d.	0,64	0,56
1	60	Methylsinapinsäure	1,06	0,72	0,42	0,76
1	10	FC(4-O-8')G-4-O'-hexosid	0,19	1,03	1,60	1,10
1	36	Zykl. Spermidin-Alkaloid	n.d.	0,52	1,26	1,10
1	20	FC(5-8')G-4-O-hexosid	n.d.	0,78	1,19	0,93
1	67	4-O-Hexosyl-5-hydroxyferuloylcholin	n.d.	0,16	1,43	0,74
1	19	FC(4-O-8')G	0,34	0,62	0,77	0,71
1	32	Kämpferol-3-O-soph-7-O-glc	n.d.	0,38	0,96	0,50
1	14	Benzoylcholin	0,20	0,38	0,60	0,85
1	79	UK#10 (Cholinester)	0,68	0,61	1,34	3,97
1	107	Diferuloylspermidin	1,00	1,02	1,22	0,64
1	24	Cinnamoylcholin	n.d.	0,20	0,03	0,08
2	83	VC(4-O-8')G-sin	n.d.	n.d.	0,18	0,05
2	38	2-O-Sinapoyl-S-malat	n.d.	n.d.	0,60	0,04
2	84	VC(4-O-8')-O-methyl-G-sin	n.d.	n.d.	n.d.	0,03
2	27	FC(4-O-8')S-di-sin	n.d.	n.d.	0,33	0,04
2	71	4-O-Hexosylmethylsyngasäure	n.d.	n.d.	n.d.	* -
2	86	UK#3 - Sinapoylglucose-Konjugat	n.d.	n.d.	n.d.	* -
2	39	1,2-Di-O-sinapoylgentiobiose	1,26	1,18	0,91	0,02
2	42	1,6-Di-O-sinapoylglucose	n.d.	n.d.	0,21	* -
2	58	2-O-Feruloyl-S-malat	n.d.	n.d.	n.d.	* -
2	50	O-Hexosyloxybenzoesäure	1,12	0,99	n.d.	* -
2	29	SC(4-O-8')G-di-sin	n.d.	n.d.	0,49	0,14
2	65	4-O-Hexosylcumaroylcholin	n.d.	n.d.	0,70	0,24
2	28	FC(4-O-8')G-di-sin	n.d.	1,03	0,74	0,13

Tabelle 6-10 (Fortsetzung).

Cluster	Nr.	Metabolit	Verhältnis <i>UGT84A9i</i> zu Wt			
			A	B	C	D
2	29	SC(4-O-8')G-di-sin	n.d.	n.d.	0,49	<u>0,14</u>
2	65	4-O-Hexosylcumaroylcholin	n.d.	n.d.	0,70	<u>0,24</u>
2	28	FC(4-O-8')G-di-sin	n.d.	1,03	0,74	<u>0,13</u>
2	9	5-Hydroxyferuloylcholin	0,71	0,51	<u>0,40</u>	<u>0,14</u>
2	40	1,2-Di-O-sinapoylglucose	n.d.	0,90	0,46	<u>0,01</u>
2	13	Feruloylcholin	0,31	<u>0,35</u>	<u>0,07</u>	<u>0,11</u>
2	41	1,2,2'-Tri-O-sinapoylgentiobiose	n.d.	n.d.	n.d.	<u>0,08</u>
2	8	Kaffeoylcholin	n.d.	n.d.	<u>0,19</u>	<u>0,33</u>
2	49	4-O-Hexosylkaffeoylcholin	n.d.	n.d.	0,99	<u>0,38</u>
2	30	Kaffeoylgentiobiose	n.d.	n.d.	n.d.	<u>0,36</u>
2	2	4-O-Hexosyloxybenzoylcholin	n.d.	n.d.	0,96	<u>0,37</u>
2	70	Di-O-hexosylsinapinsäure	n.d.	n.d.	0,53	<u>0,30</u>
2	37	Kämpferol-3-O-soph-7-O-(sin-glc)	n.d.	n.d.	0,62	<u>0,35</u>
2	16	Sinapoylcholin	n.d.	n.d.	0,97	<u>0,50</u>
2	33	Kämpferol-3-O-(sin-soph)-7-O-glc	n.d.	0,80	0,74	<u>0,38</u>
2	35	Kämpferol-4'-O-(sin-glc)-3,7-di-glc	n.d.	0,80	0,65	<u>0,34</u>
2	82	UK#12 (Cholinester)	n.d.	n.d.	0,44	<u>0,44</u>
2	25	FC(5-8')S	n.d.	0,34	<u>0,39</u>	<u>0,28</u>
2	34	1-O-Sinapoylglucose	0,94	1,07	<u>0,49</u>	*
2	95	UK#20 (unbekanntes Dihexosid)	0,88	1,13	0,69	<u>0,28</u>
2	23	3,4-Dimethoxycinnamoylcholin	0,22	0,60	<u>0,24</u>	<u>0,11</u>
3	1	Nicotinoylcholin	n.d.	0,96	1,01	1,09
3	81	VC(4-O-8')-O-methyl-G	n.d.	n.d.	0,56	0,88
3	48	Kämpferol-3-O-glc-4'-O-(sin-glc)	n.d.	n.d.	0,73	0,80
3	5	4-Hydroxybenzoylcholin	n.d.	n.d.	1,34	0,99
3	12	VC(4-O-8')G	n.d.	1,21	0,92	1,17
3	44	Zykl. Spermidin-Alkaloid-hexosid	n.d.	n.d.	1,15	1,21
3	74	Uk#6 (phenolischer Cholinester)	n.d.	0,31	0,87	1,70
3	69	Cumaroylcholin	n.d.	n.d.	0,46	1,40
3	31	O-Hexosyl-5-hydroxyferulasäure	n.d.	n.d.	n.d.	1,33
3	68	O-Hexosylkaffeensäure	n.d.	n.d.	n.d.	1,69
3	55	Syringoylcholin	n.d.	n.d.	n.d.	1,66
3	66	O-Hexosylvanillinsäure	n.d.	n.d.	0,96	1,51
3	72	UK#5 (Cholinester)	n.d.	n.d.	1,49	<u>2,98</u>
3	61	UK#1 (phenolischer Cholinester)	n.d.	n.d.	n.d.	<u>2,61</u>
3	4	4-O-Hexosylsyringoylcholin	n.d.	n.d.	n.d.	1,73
3	52	4-O-Hexosylferuloylcholin	n.d.	0,77	1,87	1,27

Tabelle 6-10 (Fortsetzung).

Cluster	Nr.	Metabolit	Verhältnis <i>UGT84A9i</i> zu Wt			
			A	B	C	D
4	78	Sinapin-4- <i>O</i> -deoxyhexosid	n.d.	n.d.	<u>100</u>	<u>46,14</u>
4	56	<i>N</i> -Sinapoyl- <i>S</i> -methylcysteinsulfoxid	n.d.	n.d.	n.d.	<u>10,00</u>
4	51	4- <i>O</i> -Dihexosylsinapoylcholin	n.d.	n.d.	n.d.	<u>11,27</u>
4	45	4- <i>O</i> - β -Glucosyl- <i>E</i> -sinapinsäure	1,18	1,05	<u>2,14</u>	<u>11,43</u>
4	76	UK#8 (Cholinester)	n.d.	n.d.	n.d.	<u>38,07</u>
4	47	Kämpferol-3- <i>O</i> -(sin-soph)	n.d.	n.d.	<u>100</u>	<u>9,40</u>
4	6	4- <i>O</i> -Glucosylsinapoylcholin	n.d.	1,25	<u>7,64</u>	<u>11,63</u>
4	75	UK#7	n.d.	n.d.	<u>100</u>	<u>100</u>
4	63	UK#3 (phenolischer Cholinester)	n.d.	n.d.	n.d.	<u>6,03</u>
4	43	4- <i>O</i> - β -Glucosylsyringasäure	n.d.	n.d.	n.d.	<u>5,67</u>
4	54	<i>O</i> -Pentosylsinapinsäure	n.d.	n.d.	n.d.	<u>4,48</u>
4	77	UK#9 (phenolischer Cholinester)	n.d.	n.d.	n.d.	<u>4,49</u>
4	53	SC-4- <i>O</i> -(hexosid-pentosid)	1,65	0,87	0,85	<u>3,56</u>
4	62	UK#2 (phenolischer Cholinester)	n.d.	n.d.	1,04	<u>2,90</u>
4	80	UK#11 (phenolischer Cholinester)	n.d.	n.d.	0,96	<u>3,13</u>
4	17	SC(4- <i>O</i> -8') <i>S</i> -4- <i>O</i> '-hexosid	n.d.	0,80	<u>2,74</u>	<u>3,24</u>
4	46	Kämpferol-3- <i>O</i> - β -soph	n.d.	n.d.	<u>2,52</u>	<u>5,12</u>
4	15	SC(4- <i>O</i> -8') <i>G</i> -4- <i>O</i> '-hexosid	n.d.	1,50	<u>5,27</u>	<u>3,79</u>
4	64	UK#4 (phenolischer Cholinester)	1,26	0,81	1,80	<u>5,05</u>
5	91	Quercetin-malonyl-di- <i>O</i> -hexosid	1,08	1,04	0,32	n.d.
5	90	UK#16	1,25	1,23	0,62	n.d.
5	94	UK#19 (unbekanntes Hexosid)	0,74	0,90	0,63	n.d.
5	87	UK#14	1,01	1,00	0,75	n.d.
5	96	Quercetin-di- <i>O</i> -hexosid	0,95	0,89	0,94	n.d.
5	88	UK#15	0,81	0,81	0,88	1,83
5	106	Procyanidin-Dimer	0,90	1,07	0,79	n.d.
5	108	Epicatechin	0,96	1,08	0,79	n.d.
5	105	UK#25 (Flavonoid)	1,18	1,23	0,79	n.d.
5	109	Procyanidin-Trimer	0,87	1,09	0,78	n.d.
5	110	UK#26 (unbekanntes Hexosid)	0,37	0,76	0,77	n.d.
5	104	UK#24 (unbekanntes Hexosid)	0,94	1,23	1,03	0,53
6	99	UK#23	0,90	0,86	n.d.	n.d.
6	98	UK#22	0,73	0,80	n.d.	n.d.
6	103	Glucobrassicin	0,76	1,34	n.d.	n.d.
6	92	UK#17	1,24	0,99	n.d.	n.d.
6	93	UK#18	0,75	0,83	n.d.	n.d.
6	89	Indol-3-carbonsäurehexosylester	0,69	0,67	n.d.	n.d.

Tabelle 6-10 (Fortsetzung).

Cluster	Nr.	Metabolit	Verhältnis <i>UGT84A9i</i> zu Wt			
			A	B	C	D
6	57	O-Hexosylferulasäure	0,73	0,62	0,86	<u>2,09</u>
6	59	4-O-Hexosylmethylsinapinsäure	0,77	0,48	1,40	<u>100</u>
6	97	UK#21	1,67	1,58	0,76	n.d.
6	102	4-Hydroxyglucobrassicin	0,94	3,07	0,96	n.d.
6	101	Glucobrassicinapin	1,04	1,13	n.d.	n.d.
6	100	Gluconapin	1,69	1,60	n.d.	n.d.

Tabelle 6-11: Ergebnisse der Analyse von Sekundärmetabolite für *UGT84A9i*-Samen bzw. 2, 4, 7, 10 und 14 Tage alte Keimblätter im Vergleich zum Wildtyp. Signifikante Unterschiede sind unterstrichen und fett hervorgehoben. * unter dem Detektionslimit in *UGT84A9i*; n.d. nicht detektierbar.

Clus-ter	Nr.	Metabolit	Verhältnis <i>UGT84A9i</i> zu Wt					
			0d	2d	4d	7d	10d	14d
1	1	Nicotinoylcholin	1,05	1,23	3,53	1,79	n.d.	n.d.
1	2	4-O-Hexosyloxybenzoylcholin	<u>0,33</u>	<u>0,33</u>	<u>0,47</u>	<u>0,30</u>	<u>0,22</u>	<u>0,19</u>
1	3	4-O-Hexosylvanilloylcholin	0,68	0,50	1,06	1,33	1,53	1,38
1	5	4-Hydroxybenzoylcholin	1,03	0,96	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	7	Vanilloylcholin	0,66	0,70	0,95	0,76	<u>0,45</u>	0,56
1	10	FC(4-O-8')G-4-O'-hexosid	0,84	0,63	0,59	0,81	0,75	0,48
1	12	VC(4-O-8')G	1,21	1,03	0,63	<u>0,50</u>	<u>0,24</u>	<u>0,24</u>
1	14	Benzoylcholin	1,07	0,65	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	16	Sinapoylcholin	0,63	0,61	0,64	0,52	0,76	0,63
1	18	FC(4-O-8')S	0,57	<u>0,45</u>	<u>0,31</u>	<u>0,26</u>	<u>0,09</u>	<u>0,15</u>
1	19	FC(4-O-8')G	0,85	0,67	0,55	<u>0,33</u>	<u>0,15</u>	<u>0,17</u>
1	20	FC(5-8')G-4-O-hexosid	1,36	1,18	<u>0,41</u>	0,82	n.d.	n.d.
1	21	SC(4-O-8')S	0,84	0,73	*	0,76	<u>0,42</u>	0,64
1	22	SC(4-O-8')G	0,71	0,60	0,66	<u>0,50</u>	<u>0,23</u>	<u>0,25</u>
1	25	FC(5-8')S	<u>0,48</u>	<u>0,34</u>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	26	FC(5-8')G	0,63	<u>0,48</u>	0,61	0,44	0,24	<u>0,37</u>
1	36	Zykl. Spermidin-Alkaloid	1,29	1,32	0,84	1,02	0,78	0,97
1	37	Kämpferol-3-O-soph-7-O-(sin-glc)	<u>0,38</u>	<u>0,34</u>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	48	Kämpferol-3-O-glc-4'-O-(sin-glc)	0,95	1,17	<u>0,25</u>	<u>0,34</u>	<u>0,23</u>	n.d.
1	52	4-O-Hexosylferuloylcholin	0,85	<u>0,28</u>	0,59	0,81	0,67	0,48
1	55	Syringoylcholin	1,75	0,84	<u>0,42</u>	0,51	n.d.	n.d.
1	65	4-O-Hexosylcumaroylcholin	0,28	<u>0,29</u>	0,58	0,73	<u>0,31</u>	n.d.
1	69	Cumaroylcholin	1,24	<u>0,45</u>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	74	UK#6 (phenolischer Cholinester)	2,00	1,87	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	81	VC(4-O-8')-O-methyl-G	1,00	0,95	0,52	<u>0,42</u>	<u>0,14</u>	<u>0,16</u>
1	82	UK#12 (Cholinester)	<u>0,34</u>	<u>0,49</u>	<u>0,32</u>	<u>0,39</u>	<u>0,41</u>	<u>0,37</u>
2	6	4-O-Glucosylsinapoylcholin	<u>9,66</u>	<u>11,5</u>	<u>36,7</u>	<u>26,8</u>	<u>22,5</u>	<u>15,8</u>
2	46	Kämpferol-3-O-β-soph	<u>6,93</u>	<u>22,1</u>	<u>39,5</u>	<u>10,0</u>	1,89	1,23
2	54	O-Pentosylsinapinsäure	1,02	8,50	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	59	4-O-Hexosylmethylsinapinsäure	<u>5,06</u>	<u>2,85</u>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	63	UK#1 (phenolischer Cholinester)	<u>2,86</u>	<u>2,84</u>	<u>2,84</u>	<u>2,33</u>	1,48	1,03
2	64	UK#1 (phenolischer Cholinester)	<u>100</u>	<u>70,4</u>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	73	FC(5-8')S-4-O-hexosid	<u>100</u>	<u>100</u>	<u>22,8</u>	n.d.	n.d.	n.d.
2	77	UK#9 (phenolischer Cholinester)	<u>3,73</u>	<u>4,21</u>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	78	Sinapin-4-O-deoxyhexosid	<u>19,5</u>	<u>27,8</u>	<u>38,7</u>	<u>27,5</u>	n.d.	n.d.

Tabelle 6-11 (Fortsetzung).

Cluster	Nr.	Metabolit	Verhältnis <i>UGT84A9i</i> zu Wt					
			0d	2d	4d	7d	10d	14d
2	79	UK#10 (Cholinester)	<u>2,24</u>	<u>3,64</u>	<u>11,6</u>	4,03	1,26	4,52
2	80	UK#11 (phenolischer Cholinester)	<u>2,80</u>	<u>3,99</u>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3	8	Kaffeoylcholin	<u>0,25</u>	<u>0,10</u>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3	9	5-Hydroxyferuloylcholin	<u>0,15</u>	<u>0,08</u>	0,45	0,52	0,44	<u>0,32</u>
3	13	Feruloylcholin	<u>0,11</u>	<u>0,06</u>	<u>0,16</u>	0,37	0,62	0,31
3	23	3,4-Dimethoxycinnamoylcholin	<u>0,14</u>	<u>0,08</u>	<u>0,28</u>	n.d.	n.d.	n.d.
3	24	Cinnamoylcholin	<u>0,09</u>	<u>0,12</u>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3	27	FC(4-O-8')S-di-sin	<u>0,03</u>	<u>0,03</u>	*	<u>0,02</u>	n.d.	n.d.
3	28	FC(4-O-8')G-di-sin	<u>0,15</u>	<u>0,10</u>	<u>0,01</u>	0,04	<u>0,09</u>	n.d.
3	29	SC(4-O-8')G-di-sin	<u>0,11</u>	<u>0,10</u>	<u>0,01</u>	*	<u>0,01</u>	n.d.
3	35	Kämpferol-4'-O-(sin-glc)-3,7-di-glc	<u>0,45</u>	<u>0,29</u>	*	<u>0,02</u>	0,03	n.d.
3	40	1,2-Di-O-sinapoylglucose	<u>0,01</u>	<u>0,01</u>	*	<u>0,01</u>	<u>0,04</u>	<u>0,28</u>
3	70	Di-O-hexosylsinapinsäure	<u>0,25</u>	<u>0,18</u>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3	83	VC(4-O-8')G-sin	<u>0,05</u>	<u>0,05</u>	<u>0,04</u>	<u>0,03</u>	n.d.	n.d.
3	84	VC(4-O-8')-O-methyl-G-sin	<u>0,03</u>	<u>0,02</u>	*	<u>0,01</u>	<u>0,02</u>	n.d.
3	86	UK#3 - Sinapoylglucose-Konjugat	*	<u>0,02</u>	0,68	<u>2,58</u>	<u>5,62</u>	<u>6,55</u>
4	11	FC(4-O-8')S-4-O'-hexosid	<u>0,45</u>	<u>0,45</u>	0,68	0,94	0,88	0,66
4	32	Kämpferol-3-O-soph-7-O-glc	<u>0,34</u>	<u>0,50</u>	4,51	5,14	1,08	2,33
4	33	Kämpferol-3-O-(sin-soph)-7-O-glc	<u>0,31</u>	0,58	1,13	<u>3,78</u>	<u>3,22</u>	<u>2,59</u>
4	42	1,6-Di-O-sinapoylglucose	<u>0,01</u>	<u>0,02</u>	*	<u>0,01</u>	<u>0,04</u>	0,30
4	85	UK#1 (phenolischer Cholinester)	<u>0,49</u>	<u>0,43</u>	<u>0,38</u>	0,51	<u>0,49</u>	0,38
5	4	4-O-Hexosylsyngoylcholin	1,59	<u>2,58</u>	<u>6,40</u>	<u>6,64</u>	<u>4,89</u>	<u>2,46</u>
5	15	SC(4-O-8')G-4-O'-hexosid	<u>3,69</u>	<u>3,32</u>	<u>3,15</u>	<u>4,41</u>	<u>4,08</u>	<u>2,75</u>
5	17	SC(4-O-8')S-4-O'-hexosid	<u>2,65</u>	<u>7,05</u>	<u>2,75</u>	<u>3,80</u>	1,95	<u>2,08</u>
5	43	4-O-β-Glucosylsyngasäure	<u>7,61</u>	<u>5,85</u>	<u>6,62</u>	<u>5,78</u>	<u>5,64</u>	<u>3,68</u>
5	45	4-O-β-Glucosyl-E-sinapinsäure	<u>100</u>	<u>36,4</u>	<u>41,7</u>	<u>24,8</u>	<u>10,0</u>	<u>6,35</u>
5	47	Kämpferol-3-O-(sin-soph)	<u>10,7</u>	<u>20,3</u>	<u>11,0</u>	<u>15,1</u>	<u>4,60</u>	2,27
5	51	4-O-Dihexosylsinapoylcholin	<u>6,21</u>	<u>3,63</u>	<u>10,5</u>	<u>16,4</u>	<u>21,6</u>	<u>12,1</u>
5	53	SC-4-O-(hexosid-pentosid)	<u>27,1</u>	<u>18,7</u>	<u>20,3</u>	<u>38,9</u>	<u>24,8</u>	<u>18,3</u>
5	56	N-Sinapoyl-S-methylcysteinsulfoxid	<u>92,8</u>	<u>62,4</u>	<u>23,2</u>	<u>26,2</u>	<u>23,3</u>	<u>19,1</u>
5	61	UK#1 (phenolischer Cholinester)	1,79	2,14	<u>2,84</u>	<u>3,46</u>	3,06	2,37
5	62	UK#1 (phenolischer Cholinester)	<u>3,11</u>	<u>2,89</u>	<u>2,91</u>	<u>2,55</u>	<u>2,43</u>	<u>2,49</u>
5	72	UK#5 (Cholinester)	<u>3,17</u>	<u>3,97</u>	<u>100</u>	<u>5,77</u>	<u>4,17</u>	<u>5,85</u>
5	75	UK#7	<u>23,6</u>	<u>41,6</u>	<u>100</u>	<u>95,8</u>	<u>67,1</u>	<u>55,6</u>
5	76	UK#8 (Cholinester)	<u>39,2</u>	<u>85,7</u>	<u>60,6</u>	<u>96,9</u>	<u>100</u>	<u>100</u>
6	30	Kaffeoylgentiobiose	<u>0,05</u>	<u>0,11</u>	<u>0,09</u>	<u>0,16</u>	<u>0,31</u>	0,69
6	31	O-Hexosyl-5-hydroxyferulasäure	<u>0,15</u>	<u>0,01</u>	*	<u>0,09</u>	<u>0,41</u>	<u>0,46</u>

Tabelle 6-11 (Fortsetzung).

Clus- ter	Nr.	Metabolit	Verhältnis <i>UGT84A9i</i> zu Wt					
			0d	2d	4d	7d	10d	14d
6	34	1-O-Sinapoylglucose	*	<u>0,22</u>	<u>0,15</u>	<u>0,43</u>	1,02	1,31
6	38	2-O-Sinapoyl-S-malat	<u>0,07</u>	<u>0,14</u>	<u>0,12</u>	<u>0,10</u>	<u>0,30</u>	<u>0,48</u>
6	39	1,2-Di-O-sinapoylgentiobiose	<u>0,01</u>	<u>0,01</u>	<u>0,01</u>	<u>0,02</u>	<u>0,02</u>	<u>0,06</u>
6	41	1,2,2'-Tri-O-sinapoylgentiobiose	<u>0,02</u>	<u>0,08</u>	<u>0,02</u>	<u>0,02</u>	<u>0,03</u>	<u>0,04</u>
6	49	4-O-Hexosylkaffeoylcholin	<u>0,30</u>	<u>0,03</u>	<u>0,42</u>	0,43	<u>0,39</u>	<u>0,49</u>
6	50	O-Hexosyloxybenzoesäure	*	<u>0,35</u>	<u>0,28</u>	<u>0,28</u>	0,58	0,85
6	57	O-Hexosylferulasäure	<u>0,12</u>	<u>0,03</u>	<u>0,12</u>	<u>0,10</u>	<u>0,28</u>	<u>0,31</u>
6	58	2-O-Feruloyl-S-malat	<u>0,16</u>	<u>0,07</u>	*	<u>0,10</u>	<u>0,34</u>	<u>0,44</u>
6	66	O-Hexosylvanillinsäure	1,66	0,85	0,60	0,61	0,78	0,87
6	67	4-O-Hexosyl-5-hydroxyferuloylcholin	0,78	0,67	1,55	1,39	1,70	<u>2,16</u>
6	68	O-Hexosylkaffeesäure	<u>0,22</u>	<u>0,11</u>	*	<u>0,16</u>	0,57	0,80

b. Grafische Übersicht für *UGT84A9i/BnSCTi*

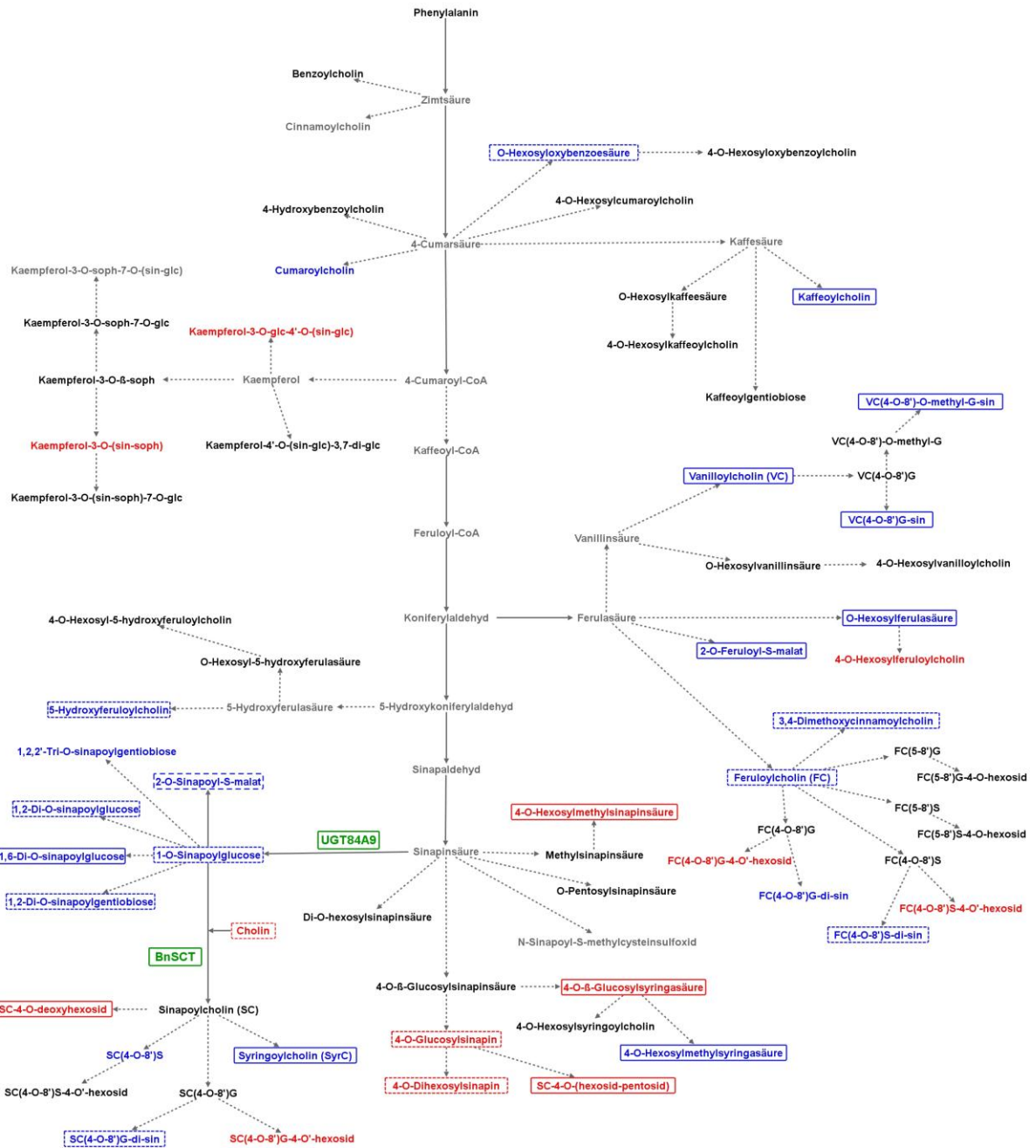


Abbildung 6-6: Metabolische Veränderungen in reifen *UGT84A9i/BnSCTi*-Samen. Schematische Darstellung des Samenstoffwechsels unter besonderer Berücksichtigung des Phenylpropanstoffwechsels. Blau = reduzierte, Rot = induzierte, Schwarz = unveränderte, Grau = nicht detektierte Metabolite in reifen *UGT84A9i/BnSCTi*-Samen. Metabolite ohne Rahmen sind um den Faktor 2-5 verändert, Metabolite mit gestrichelten Rahmen sind um den Faktor 5-10 verändert und Metabolite mit durchgehendem Rahmen sind mehr als um den Faktor 10 verändert.

H. Annotierte Metabolite

a. Sekundärmetabolite

Tabelle 6-12. Zusammenstellung der mittels LC-ESI-QqTOF-MS detektierten und annotierten Sekundärmetaboliten in der ungerichteten Metabolitenanalyse von Rapssamen (*B. napus*) während der Entwicklung.

Nr.	Metabolit	AS*	Lit.	Elementar- zusammen- setzung	Rt (s)	Quasi-Molekularion		Fragmentionen (CID) (Präkursorion fett markiert)
						Typ	theor. m/z	
1	Nicotinoylcholin	1	[1]	C ₁₁ H ₁₇ N ₂ O ₂ ⁺	50	[M] ⁺	209.1285	209 , 150, 106, 78
2	4-O-Hexosyloxybenzoylcholin	2	[1]	C ₁₈ H ₂₈ NO ₈ ⁺	52	[M] ⁺	386.1809	386 , 327, 224, 165, 121, 93
3	4-O-Hexosylvanilloylcholin	2	[1]	C ₁₉ H ₃₀ NO ₉ ⁺	70	[M] ⁺	416.1915	416 , 357, 254, 195, 151, 180, 123
4	4-O-Hexosylsyringoylcholin	2	[1]	C ₂₀ H ₃₂ NO ₁₀ ⁺	78	[M] ⁺	446.2021	446 , 284, 225, 181, 153, 138
5	4-Hydroxybenzoylcholin	1	[1]	C ₁₂ H ₁₈ NO ₃ ⁺	92	[M] ⁺	224.1281	224 , 165, 121, 93
6	4-O-Glucosylsinapoylcholin	1	[1],[3]	C ₂₂ H ₃₄ NO ₁₀ ⁺	100	[M] ⁺	472.2177	472 , 413, 310, 251, 207, 175, 147, 119
7	Vanilloylcholin	1	[1]	C ₁₃ H ₂₀ NO ₄ ⁺	103/108	[M] ⁺	254.1387	254 , 195, 180, 151, 136, 123, 108
8	Kaffeoylcholin	1	[1]	C ₁₄ H ₂₀ NO ₄ ⁺	108	[M] ⁺	266.1387	266 , 207, 163, 145, 135, 117
9	5-Hydroxyferuloylcholin	2	[1]	C ₁₅ H ₂₂ NO ₅ ⁺	113	[M] ⁺	296.1493	296 , 237, 222, 193, 161, 133
10	FC(4-O-8')G-4-O'-hexosid	2	[1]	C ₃₁ H ₄₄ NO ₁₃ ⁺	115/127	[M] ⁺	638.2807	638 , 579, 221, 206, 177, 149, 145
11	FC(4-O-8')S-4-O'-hexosid	2	[1]	C ₃₂ H ₄₆ NO ₁₄ ⁺	117	[M] ⁺	668.2913	668 , 609, 221, 177, 145
12	VC(4-O-8')G	2	[1]	C ₂₃ H ₃₂ NO ₈ ⁺	119/127	[M] ⁺	450.2123	450 , 391, 195, 180, 151, 123
13	Feruloylcholin	1	[1]	C ₁₅ H ₂₂ NO ₄ ⁺	129	[M] ⁺	280.1543	280 , 221, 206, 177, 149, 145, 117
14	Benzoylcholin	1	[1]	C ₁₂ H ₁₈ NO ₂ ⁺	130	[M] ⁺	208.1332	208 , 149, 105, 77
15	SC(4-O-8')G-4-O'-hexosid	2	[1]	C ₃₂ H ₄₆ NO ₁₄ ⁺	133/142	[M] ⁺	668.2913	668 , 609, 251, 207, 175, 147
16	Sinapoylcholin	1	[1]	C ₁₆ H ₂₄ NO ₅ ⁺	136	[M] ⁺	310.1646	310 , 251, 207, 175, 147, 119
17	SC(4-O-8')S-4-O'-hexosid	2	[1]	C ₃₃ H ₄₈ NO ₁₅ ⁺	138/148	[M] ⁺	698.3019	698 , 639, 251, 207, 175, 147
18	FC(4-O-8')S	2	[1]	C ₂₆ H ₃₆ NO ₉ ⁺	145/150	[M] ⁺	506.2385	506 , 447, 221, 206, 177, 149, 145
19	FC(4-O-8')G	1	[1]	C ₂₅ H ₃₄ NO ₈ ⁺	149	[M] ⁺	476.2279	476 , 417, 221, 206, 177, 149, 145

Tabelle 6-12 (Fortsetzung).

Nr.	Metabolit	AL*	Lit.	Elementar- zusammen- setzung	Rt (s)	Quasi-Molekularion		Fragmentionen (CID) (Präkursorion fett markiert)
						Typ	theor. m/z	
20	FC(5-8')G-4-O-hexosid	2	[1]	C ₃₁ H ₄₂ NO ₁₂ ⁺	158	[M] ⁺	620.2702	620 , 561, 543, 531, 399, 381, 369
21	SC(4-O-8')S	2	[1]	C ₂₇ H ₃₈ NO ₁₀ ⁺	172/189	[M] ⁺	536.2490	536 , 477, 251, 207, 175, 147
22	SC(4-O-8')G	2	[1]	C ₂₆ H ₃₆ NO ₉ ⁺	175/191	[M] ⁺	506.2385	506 , 447, 251, 207, 175, 147
23	3,4-Dimethoxycinnamoylcholin	1	[1]	C ₁₆ H ₂₄ NO ₄ ⁺	186	[M] ⁺	294.1699	294 , 235, 191, 176, 163, 148
24	Cinnamoylcholin	1	[1]	C ₁₄ H ₂₀ NO ₂ ⁺	200	[M] ⁺	234.1489	234 , 175, 131, 103
25	FC(5-8')S	2	[1]	C ₂₆ H ₃₄ NO ₈ ⁺	216	[M] ⁺	488.2279	488 , 429, 411, 399, 396, 379, 339
26	FC(5-8')G	1	[1]	C ₂₅ H ₃₂ NO ₇ ⁺	220	[M] ⁺	458.2173	458 , 399, 381, 369, 366, 349, 309
27	FC(4-O-8')S-di-sin	2	[1]	C ₃₇ H ₄₆ NO ₁₃ ⁺	293	[M] ⁺	712.2964	712 , 653, 433, 221, 209, 207, 206, 177, 175, 147, 145, 119
28	FC(4-O-8')G-di-sin	2	[1]	C ₃₆ H ₄₄ NO ₁₂ ⁺	298	[M] ⁺	682.2858	682 , 623, 403, 221, 207, 206, 179, 177, 175, 147, 145, 119
29	SC(4-O-8')G-di-sin	2	[1]	C ₃₇ H ₄₆ NO ₁₃ ⁺	304/308	[M] ⁺	712.2964	712 , 653, 403, 251, 207, 179, 175, 147, 119
30	Kaffeoylgentiobiose	2	[2]	C ₂₁ H ₂₈ O ₁₄	99	[M+Na] ⁺	527.1371	527 , 365, 203, 185
31	O-Hexosyl-5-hydroxyferulasäure	2	[2]	C ₁₆ H ₂₀ O ₁₀	110/119	[M+Na] ⁺	395.0949	373 , 211, 193
32	Kämpferol-3-O-soph-7-O-glc	1	[2]	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₁	112	[M+Na] ⁺	795.1954	773 , 611, 449, 287
33	Kämpferol-3-O-(sin-soph)-7-O-glc	1	[2]	C ₄₄ H ₅₀ O ₂₅	133	[M+H] ⁺	979.2714	979 , 611, 531, 449, 369, 287, 207
34	1-O-Sinapoylglucose	1	[2]	C ₁₇ H ₂₂ O ₁₀	140	[M+Na] ⁺	409.1099	387 , 225, 207
35	Kämpferol-4'-O-(sin-glc)-3,7-di-glc	1	[2]	C ₄₄ H ₅₀ O ₂₅	170	[M+H] ⁺	979.2714	979 , 817, 655, 449, 369, 287, 207
36	Zykl. Spermidin-Alkaloid	2	[2]	C ₂₇ H ₃₄ N ₃ O ₆ ⁺	184/191	[M] ⁺	496.2442	496 , 478, 408, 351, 325
37	Kämpferol-3-O-soph-7-O-(sin-glc)	1	[2]	C ₄₄ H ₅₀ O ₂₅	195	[M+H] ⁺	979.2714	979 , 817, 655, 531, 449, 369, 287, 207
38	2-O-Sinapoyl-S-malat	1	[2]	C ₁₅ H ₁₆ O ₉	199	[M+Na] ⁺	363.0687	341 , 207, 175, 147, 119
39	1,2-Di-O-sinapoylgentiobiose	1	[2]	C ₃₄ H ₄₂ O ₁₉	235	[M+Na] ⁺	777.2213	777 , 531, 369, 207
40	1,2-Di-O-sinapoylglucose	1	[2]	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₄	265	[M+Na] ⁺	615.1689	615 , 391, 369, 207

Tabelle 6-12 (Fortsetzung).

Nr.	Metabolit	AL*	Lit.	Elementar- zusammen- setzung	Rt (s)	Quasi-Molekularion		Fragmentionen (CID) (Präkursorion fett markiert)
						Typ	theor. m/z	
41	1,2,2'-Tri- <i>O</i> -sinapoylgentiobiose	1	[2]	C ₄₅ H ₅₂ O ₂₃	273	[M+Na] ⁺	983.2792	983 , 615, 369, 207
42	1,6-Di- <i>O</i> -sinapoylglucose	1	[2]	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₄	303	[M+Na] ⁺	615.1689	615 , 391, 207
43	4- <i>O</i> -β-Glucosylsyringasäure	1	[3]	C ₁₅ H ₂₀ O ₁₀	97	[M+Na] ⁺	383.0949	361 , 199, 180, 155
44	Zykl. Spermidin-Alkaloid-hexosid	1	[3]	C ₃₃ H ₄₄ N ₃ O ₁₁ ⁺	112	[M] ⁺	658.2970	658 , 496, 408, 351, 325
45	4- <i>O</i> -β-Glucosyl- <i>E</i> -sinapinsäure	1	[3]	C ₁₇ H ₂₂ O ₁₀	124	[M+Na] ⁺	409.1099	387 , 225, 207
46	Kämpferol-3- <i>O</i> -β-soph	1	[3]	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	174	[M+Na] ⁺	633.1426	611 , 449, 287
47	Kämpferol-3- <i>O</i> -(sin-soph)	1	[3]	C ₃₈ H ₄₀ O ₂₀	190	[M+Na] ⁺	839.2005	815 , 623, 609, 591, 429, 284
48	Kämpferol-3- <i>O</i> -glc-4'- <i>O</i> -(sin-glc)	1	[3]	C ₃₈ H ₄₀ O ₂₀	245	[M+Na] ⁺	839.2005	815 , 653, 447, 353, 297, 285, 191
49	4- <i>O</i> -Hexosylkaffeoylcholin	2	[4]	C ₂₀ H ₃₀ NO ₉ ⁺	86/98	[M] ⁺	428.1915	428 , 369, 266, 207, 163
50	<i>O</i> -Hexosyloxybenzoesäure	2	[4]	C ₁₃ H ₁₆ O ₈	94	[M+Na] ⁺	323.0737	301 , 283, 163, 145, 139, 121
51	4- <i>O</i> -Dihexosylsinapoylcholin	2	[4]	C ₂₈ H ₄₄ NO ₁₅ ⁺	94/105	[M] ⁺	634.2705	634 , 310, 251
52	4- <i>O</i> -Hexosylferuloylcholin	2	[4]	C ₂₁ H ₃₂ NO ₉ ⁺	94/110	[M] ⁺	442.2072	442 , 383, 280, 221
53	SC-4- <i>O</i> -(hexosid-pentosid)	2	[4]	C ₂₇ H ₂₂ NO ₁₄ ⁺	106	[M] ⁺	604.2600	604 , 310, 251, 207
54	<i>O</i> -Pentosylsinapinsäure	2	[4]	C ₁₆ H ₂₀ O ₉	114	[M+Na] ⁺	379.1000	379 , 247, 155
55	Syringoylcholin	2	[4]	C ₁₄ H ₂₂ NO ₅ ⁺	126	[M] ⁺	284.1492	284 , 225, 181, 153, 138
56	<i>N</i> -Sinapoyl- <i>S</i> -methylcysteinsulfoxid	2	[4]	C ₁₅ H ₁₉ NO ₇ S	134	[M+H] ⁺	358.0955	358 , 296, 207, 175, 152, 147, 88
57	<i>O</i> -Hexosylferulasäure	2	[4]	C ₁₆ H ₂₀ O ₉	137	[M+Na] ⁺	379.1000	379 , 217, 185
58	2- <i>O</i> -Feruloyl- <i>S</i> -malat	2	[4]	C ₁₄ H ₁₄ O ₈	198	[M+Na] ⁺	333.0581	311 , 177, 149, 145
59	4- <i>O</i> -Hexosylmethylsinapinsäure	2	[4]	C ₁₈ H ₂₄ O ₁₀	207	[M+Na] ⁺	423.1262	423 , 261, 185
60	Methylsinapinsäure	2	[4]	C ₁₂ H ₁₄ O ₅	322	[M+Na] ⁺	261.0733	239 , 207, 192, 175, 147, 119
61	UK#1 (phenolischer Cholinester)	3	[4]	C ₃₀ H ₄₄ NO ₁₃ ⁺	132	[M] ⁺	626.2897	626 , 567, 195, 151
62	UK#2 (phenolischer Cholinester)	3	[4]	C ₁₅ H ₂₆ NO ₄ ⁺	180	[M] ⁺	284.1856	284 , 225, 207, 181, 179, 163, 152, 151, 137, 135

Tabelle 6-12 (Fortsetzung).

Nr.	Metabolit	AL*	Lit.	Elementar- zusammen- setzung	Rt (s)	Quasi-Molekularion		Fragmentionen (CID) (Präkursorion fett markiert)
						Typ	theor. m/z	
63	UK#3 (phenolischer Cholinester)	3	[4]	C ₁₇ H ₂₈ NO ₄ ⁺	235	[M] ⁺	310.2013	310 , 251, 233, 223, 207, 205, 195, 189, 177, 161, 133, 105, 73
64	UK#4 (phenolischer Cholinester)	3	[4]	C ₂₂ H ₃₄ NO ₁₁ ⁺	101	[M] ⁺	488.2126	488 , 326, 310, 267, 251, 203, 181
65	4-O-Hexosylcumaroylcholin	2	*	C ₂₀ H ₃₀ NO ₈	86	[M] ⁺	412.1966	412 , 353, 191, 147, 119
66	O-Hexosylvanillinsäure	2	*	C ₁₄ H ₁₈ O ₉	88	[M+Na] ⁺	353.0843	331 , 169, 151
67	4-O-Hexosyl-5-hydroxyferuloylcholin	2	*	C ₂₁ H ₃₂ NO ₁₀	99	[M] ⁺	458.2021	458 , 399, 237, 193, 161, 133
68	O-Hexosylkaffeesäure	2	*	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	119	[M+Na] ⁺	365.0843	343 , 181, 163
69	Cumaroylcholin	2	*	C ₁₄ H ₂₀ NO ₃	127	[M] ⁺	250.1438	250 , 191, 147, 119
70	Di-O-hexosylsinapinsäure	2	*	C ₂₃ H ₃₂ O ₁₅	146	[M+Na] ⁺	571.1639	571 , 247, 207
71	4-O-Hexosylmethylsyngasäure	2	*	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	235	[M+Na] ⁺	397.1105	397 , 235, 185
72	UK#5 (Cholinester)	3	*	C ₁₅ H ₂₁ N ₂ O ₄ ⁺	71	[M] ⁺	293.1496	293 , 234, 216, 206, 148, 146
73	FC(5-8')S-4-O-hexosid	2	*	C ₃₂ H ₄₄ NO ₁₃ ⁺	163	[M] ⁺	650.2807	650 , 591, 573, 429, 411, 221
74	UK#6 (phenolischer Cholinester)	3	*	C ₁₇ H ₂₆ NO ₅ ⁺	207	[M] ⁺	324.1805	324 , 265, 250, 232, 221, 206, 204, 193, 191, 178, 175
75	UK#7	4	*	C ₁₃ H ₂₃ N ₂ O ₇ ⁺	119	[M] ⁺	319.1499	319 , 302, 284, 277, 259, 231
76	UK#8 (Cholinester)	3	*	C ₃₂ H ₄₁ N ₂ O ₁₂ ⁺	170	[M] ⁺	645.2654	645 , 310, 251
77	UK#9 (phenolischer Cholinester)	3	*	C ₁₆ H ₃₀ NO ₄ ⁺	224	[M] ⁺	300.2169	300 , 241, 133
78	Sinapin-4-O-deoxyhexosid	2	*	C ₂₂ H ₃₄ NO ₉ ⁺	120	[M] ⁺	456.2228	456 , 310, 251, 207
79	UK#10 (Cholinester)	3	*	C ₁₅ H ₂₁ N ₂ O ₃ ⁺	116	[M] ⁺	277.1547	277 , 218, 190, 146, 132
80	UK#11 (phenolischer Cholinester)	3	*	C ₁₅ H ₂₈ NO ₄ ⁺	188	[M] ⁺	286.2013	286 , 227, 165, 137
81	VC(4-O-8')-O-methyl-G	2	*	C ₂₄ H ₃₄ NO ₈ ⁺	150/155	[M] ⁺	464.2279	464 , 405, 195, 151
82	UK#12 (Cholinester)	3	*	C ₃₅ H ₄₁ N ₂ O ₁₀ ⁺	269	[M] ⁺	649.2756	649 , 590, 391, 340, 221
83	VC(4-O-8')G-sin	2	*	C ₃₄ H ₄₂ NO ₁₂ ⁺	287	[M] ⁺	656.2702	656 , 597, 403, 207, 195, 179, 147

Tabelle 6-12 (Fortsetzung).

Nr.	Metabolit	AL*	Lit.	Elementar- zusammen- setzung	Rt (s)	Quasi-Molekularion		Fragmentionen (CID) (Präkursorion fett markiert)
						Typ	theor. m/z	
84	VC(4-O-8')-O-methyl-G-sin	2	*	C ₃₅ H ₄₄ NO ₁₂ ⁺	314	[M] ⁺	670.2858	670 , 611, 417, 207, 195
85	UK#13 (phenolischer Cholinester)	3	*	C ₃₆ H ₄₆ NO ₁₂ ⁺	243/256	[M] ⁺	684.3015	684 , 625, 607, 427, 365
86	UK#3 - Sinapoylglucose-Konjugat	3	*	C ₃₄ H ₄₈ NO ₁₃ ⁺	281	[M] ⁺	678.3120	678 , 619, 454, 395, 310, 251, 207
87	UK#14	4	*	C ₂₀ H ₃₇ NO ₁₆	54	[M+H] ⁺	548.2185	548 , 206, 188, 170, 160, 142, 124, 114
88	UK#15	4	*	C ₈ H ₁₄ O ₆	107	[M+Na] ⁺	229.0683	229 , 211, 143, 125
89	Indol-3-carbonsäurehexosylester	2	*	C ₁₅ H ₁₇ NO ₇	153	[M+Na] ⁺	346.0897	346 , 184
90	UK#16	4	*	C ₁₆ H ₂₈ O ₁₀	193	[M+Na] ⁺	403.1575	403 , 359, 317, 225
91	Quercetin-malonyl-di-O-hexosid	2	*	C ₃₀ H ₃₂ O ₂₀	167	[M+H] ⁺	713.1559	713 , 551, 465, 303
92	UK#17	4	*	C ₁₁ H ₂₀ N ₂ O ₄	68	[M+H] ⁺	245.1496	245 , 228, 210, 200, 182, 154, 130, 116
93	UK#18	4	*	C ₁₁ H ₂₀ O ₇	128	[M+Na] ⁺	287.1101	287 , 185
94	UK#19 (unbekanntes Hexosid)	3	*	C ₁₆ H ₂₄ O ₉	181	[M+Na] ⁺	383.1313	383 , 221, 185
95	UK#20 (unbekanntes Dihexosid)	3	*	C ₂₂ H ₃₄ O ₁₄	143	[M+Na] ⁺	545.1841	545 , 383, 221, 185
96	Quercetin-di-O-hexosid	2	*	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	155	[M+H] ⁺	627.1556	627 , 465, 303
97	UK#21	4	*	C ₂₄ H ₃₁ NO ₁₂	90	[M+H] ⁺	526.1919	526 , 220, 202, 184, 174, 156, 138, 128, 110
98	UK#22	4	*	C ₁₃ H ₂₄ O ₉	98	[M+Na] ⁺	347.1313	347 , 303, 185
99	UK#23	4	*	C ₁₃ H ₂₄ O ₉	122	[M+Na] ⁺	347.1313	347 , 301, 285, 203, 185
100	Gluconapin	2	[5]	C ₁₁ H ₁₉ NO ₉ S ₂	60	[M+H-SO ₃] ⁺	294.1006	372 , 275, 259, 195, 97, 96
101	Glucobrassicinapin	2	[5]	C ₁₂ H ₂₁ NO ₉ S ₂	92	[M+H-SO ₃] ⁺	308.1162	386 , 275, 259, 195, 97, 96
102	4-Hydroxyglucobrassicin	2	[5]	C ₁₆ H ₂₀ N ₂ O ₁₀ S ₂	77	[M+H-SO ₃] ⁺	385.1064	463 , 275, 259, 195, 97, 96
103	Glucobrassicin	2	[5]	C ₁₆ H ₂₀ N ₂ O ₉ S ₂	110	[M+H-SO ₃] ⁺	369.1115	447 , 275, 259, 195, 97, 96
104	UK#24 (unbekanntes Hexosid)	4	*	C ₁₆ H ₁₉ NO ₈	128	[M+Na] ⁺	376.1003	376 , 214

Tabelle 6-12 (Fortsetzung).

Nr.	Metabolit	AL*	Lit.	Elementar- zusammen- setzung	Rt (s)	Quasi-Molekularion		Fragmentionen (CID) (Präkursorion fett markiert)
						Typ	theor. m/z	
105	UK#25 (Flavonoid)	3	[7]	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	92	[M+H] ⁺	289.0707	289 , 271, 261, 259, 243, 231, 179, 163, 151, 139, 135, 123, 111
106	Procyanidin-Dimer	2	[7]	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	133/189	[M+H] ⁺	579.1497	579 , 561, 453, 427, 409, 291, 289, 247
107	Diferuloylspermidin	2	*	C ₂₇ H ₃₅ N ₃ O ₆	220	[M+H] ⁺	498.2571	498 , 481, 480, 322, 305, 304, 248, 234, 177
108	Epicatechin	1	[6]	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	145	[M+H] ⁺	291.0863	291 , 273, 249, 207, 165, 147, 139, 123
109	Procyanidin-Trimer	2	[7]	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	150/186	[M+H] ⁺	867.2131	867 , 715, 579, 289, 247
110	UK#26 (unbekanntes Hexosid)	2	*	C ₃₆ H ₃₆ O ₁₇	228	[M+H] ⁺	741.2025	741 , 579

AL[†] Annotations-Stufe; * neuartige Metabolite

[1] (Böttcher et al., 2009), [2] (Baumert et al., 2005), [3] (Wolfram et al., 2010), [4] (Clauß et al., 2011), [5] (Rochfort et al., 2008), [6] (Böttcher et al., 2008), [7] (Li et al., 2007)

UK#5 (**72**). UPLC/ESI(+)-CID-MS (micrOTOF-Q) of m/z 293 [M]⁺, ISCID = 0 V, CE = 17 eV; m/z (rel. int. (%)) = 293.143 (100, C₁₅H₂₁N₂O₄⁺), m/z (rel. int. (%)) = 234.072 (55, C₁₂H₁₂NO₄⁺), m/z (rel. int. (%)) = 216.062 (14, C₁₂H₁₀NO₃⁺), m/z (rel. int. (%)) = 206.062 (4, C₁₁H₁₂NO₃⁺), m/z (rel. int. (%)) = 148.037 (16, C₈H₆NO₂⁺), m/z (rel. int. (%)) = 146.057 (10, C₉H₈NO⁺)

FC(5-8')S-4-O-hexosid (**73**). UPLC/ESI(+)-CID-MS (micrOTOF-Q) of m/z 650 [M]⁺, ISCID = 0 V, CE = 25 eV; m/z (rel. int. (%)) = 650.269 (100, C₃₂H₄₄NO₁₃⁺), m/z (rel. int. (%)) = 591.197 (91, C₂₉H₃₅O₁₃⁺), m/z (rel. int. (%)) = 573.189 (7, C₂₉H₃₃O₁₂⁺), m/z (rel. int. (%)) = 429.149 (23, C₂₃H₂₅O₈⁺, 591-162(hex)), m/z (rel. int. (%)) = 411.135 (19, C₂₃H₂₃O₇⁺), m/z (rel. int. (%)) = 221.074 (10, C₁₂H₁₃O₄⁺)

UK#6 (phenolischer Cholinester) (**74**). UPLC/ESI(+)-CID-MS (micrOTOF-Q) of m/z 324 $[M]^+$, ISCID = 0 V, CE = 25 eV; m/z (rel. int. (%)) = 324.179 (1, $C_{17}H_{26}NO_5^+$), m/z (rel. int. (%)) = 265.101 (100, $C_{14}H_{17}O_5^+$), m/z (rel. int. (%)) = 250.078 (5, $C_{13}H_{14}O_5^+$), m/z (rel. int. (%)) = 232.068 (3, $C_{13}H_{12}O_4^+$), m/z (rel. int. (%)) = 221.077 (40, $C_{12}H_{13}O_4^+$), m/z (rel. int. (%)) = 206.056 (5, $C_{11}H_{10}O_4^+$), m/z (rel. int. (%)) = 204.075 (11, $C_{12}H_{12}O_3^+$), m/z (rel. int. (%)) = 193.083 (5, $C_{11}H_{13}O_3^+$), m/z (rel. int. (%)) = 191.059 (7, $C_{10}H_7O_4^+$), m/z (rel. int. (%)) = 178.061 (2, $C_{10}H_{10}O_3^+$), m/z (rel. int. (%)) = 175.073 (2, $C_{10}H_7O_3^+$)

UK#7 (**75**). UPLC/ESI(+)-CID-MS (micrOTOF-Q) of m/z 319 $[M]^+$, ISCID = 0 V, CE = 17 eV; m/z (rel. int. (%)) = 319.145 (33, $C_{13}H_{23}N_2O_7^+$), m/z (rel. int. (%)) = 302.121 (30, $C_{13}H_{20}NO_7^+$), m/z (rel. int. (%)) = 284.109 (16, $C_{13}H_{18}NO_6^+$), m/z (rel. int. (%)) = 277.125 (100, $C_{12}H_{21}O_7^+$), m/z (rel. int. (%)) = 259.114 (12, $C_{12}H_{19}O_6^+$), m/z (rel. int. (%)) = 231.073 (3, $C_{12}H_{11}N_2O_3^+$)

UK#8 (**76**). UPLC/ESI(+)-CID-MS (micrOTOF-Q) of m/z 645 $[M]^+$, ISCID = 0 V, CE = 25 eV; m/z (rel. int. (%)) = 645.255 (38, $C_{32}H_{41}N_2O_{12}^+$), m/z (rel. int. (%)) = 310.160 (2, $C_{16}H_{24}NO_5^+$), m/z (rel. int. (%)) = 251.087 (100, $C_{13}H_{15}O_5^+$)

UK#9 (**77**). UPLC/ESI(+)-CID-MS (micrOTOF-Q) of m/z 300 $[M]^+$, ISCID = 0 V, CE = 17 eV; m/z (rel. int. (%)) = 300.211 (31, $C_{16}H_{30}NO_4^+$), m/z (rel. int. (%)) = 241.139 (100, $C_{13}H_{21}O_4^+$), m/z (rel. int. (%)) = 133.102 (2, $C_{10}H_{13}^+$)

Sinapin-4-*O*-deoxyhexosid (**78**). UPLC/ESI(+)-CID-MS (micrOTOF-Q) of m/z 456 $[M]^+$, ISCID = 0 V, CE = 25 eV; m/z (rel. int. (%)) = 456.216 (3, $C_{22}H_{34}NO_9^+$), m/z (rel. int. (%)) = 310.159 (6, $C_{16}H_{24}NO_5^+$), m/z (rel. int. (%)) = 251.086 (100, $C_{13}H_{15}O_5^+$), m/z (rel. int. (%)) = 207.062 (2, $C_{11}H_{11}O_4^+$)

UK#10 (**79**). UPLC/ESI(+)-CID-MS (microTOF-Q) of m/z 277 $[M]^+$, ISCID = 0 V, CE = 25 eV; m/z (rel. int. (%)) = 277.154 (1, $C_{15}H_{21}N_2O_3^+$), m/z (rel. int. (%)) = 218.078 (56, $C_{12}H_{12}NO_3^+$), m/z (rel. int. (%)) = 190.084 (100, $C_{11}H_{12}NO_2^+$), m/z (rel. int. (%)) = 146.058 (56, $C_9H_8NO^+$), m/z (rel. int. (%)) = 132.043 (87, $C_8H_6NO^+$)

UK#11 (**80**). UPLC/ESI(+)-CID-MS (microTOF-Q) of m/z 286 $[M]^+$, ISCID = 0 V, CE = 17 eV; m/z (rel. int. (%)) = 286.196 (11, $C_{15}H_{28}NO_4^+$), m/z (rel. int. (%)) = 227.124 (100, $C_{12}H_{19}O_4^+$), m/z (rel. int. (%)) = 165.089 (3, $C_{10}H_{13}O_2^+$), m/z (rel. int. (%)) = 137.094 (2, $C_9H_{13}O^+$)

VC(4-O-8'-O-methyl-G (**81**). UPLC/ESI(+)-CID-MS (microTOF-Q) of m/z 464 $[M]^+$, ISCID = 0 V, CE = 17 eV; m/z (rel. int. (%)) = 464.221 (100, $C_{24}H_{34}NO_8^+$), m/z (rel. int. (%)) = 405.147 (84, $C_{21}H_{25}O_8^+$), m/z (rel. int. (%)) = 195.062 (99, $C_{10}H_{11}O_4^+$), m/z (rel. int. (%)) = 151.036 (1, $C_8H_7O_3^+$)

UK#12 (**82**). UPLC/ESI(+)-CID-MS (microTOF-Q) of m/z 649 $[M]^+$, ISCID = 0 V, CE = 25 eV; m/z (rel. int. (%)) = 649.265 (38, $C_{35}H_{41}N_2O_{10}^+$), m/z (rel. int. (%)) = 590.192 (40, $C_{32}H_{32}NO_{10}^+$), m/z (rel. int. (%)) = 391.095 (2, $C_{19}H_{19}O_9^+$), m/z (rel. int. (%)) = 340.112 (5, $C_{19}H_{18}NO_5^+$), m/z (rel. int. (%)) = 221.077 (100, $C_{12}H_{13}O_4^+$)

VC(4-O-8')G-sin (**83**). UPLC/ESI(+)-CID-MS (microTOF-Q) of m/z 656 $[M]^+$, ISCID = 0 V, CE = 25 eV; m/z (rel. int. (%)) = 656.261 (46, $C_{34}H_{42}NO_{12}^+$), m/z (rel. int. (%)) = 597.189 (58, $C_{31}H_{33}O_{12}^+$), m/z (rel. int. (%)) = 403.134 (46, $C_{21}H_{23}O_8^+$), m/z (rel. int. (%)) = 207.062 (67, $C_{11}H_{11}O_4^+$), m/z (rel. int. (%)) = 195.063 (100, $C_{10}H_{11}O_4^+$), m/z (rel. int. (%)) = 179.068 (8, $C_{10}H_{11}O_3^+$), m/z (rel. int. (%)) = 147.042 (3, $C_9H_7O_2^+$)

VC(4-O-8')-O-methyl-G-sin (**84**). UPLC/ESI(+)-CID-MS (microTOF-Q) of m/z 670 $[M]^+$, ISCID = 0 V, CE = 25 eV; m/z (rel. int. (%)) = 670.277 (39, $C_{35}H_{44}NO_{12}^+$), m/z (rel. int. (%)) = 611.204 (39, $C_{32}H_{35}O_{12}^+$), m/z (rel. int. (%)) = 417.150 (20, $C_{22}H_{25}O_8^+$), m/z (rel. int. (%)) = 207.062 (45, $C_{11}H_{11}O_4^+$), m/z (rel. int. (%)) = 195.063 (100, $C_{10}H_{11}O_4^+$)

UK#13 (**85**). UPLC/ESI(+)-CID-MS (microTOF-Q) of m/z 684 $[M]^+$, ISCID = 0 V, CE = 25 eV; m/z (rel. int. (%)) = 684.293 (100, $C_{36}H_{46}NO_{12}^+$), m/z (rel. int. (%)) = 625.216 (99, $C_{33}H_{37}O_{12}^+$), m/z (rel. int. (%)) = 607.208 (30, $C_{33}H_{35}O_{11}^+$), m/z (rel. int. (%)) = 427.134 (10, $C_{23}H_{23}O_8^+$), m/z (rel. int. (%)) = 365.102 (3, $C_{21}H_{17}O_6^+$)

UK#3 - Sinapoylglucose-Konjugat (**86**). UPLC/ESI(+)-CID-MS (microTOF-Q) of m/z 678 $[M]^+$, ISCID = 0 V, CE = 25 eV; m/z (rel. int. (%)) = 678.301 (100, $C_{34}H_{48}NO_{13}^+$), m/z (rel. int. (%)) = 619.233 (2, $C_{31}H_{39}O_{13}^+$), m/z (rel. int. (%)) = 454.237 (72, $C_{23}H_{36}NO_8^+$), m/z (rel. int. (%)) = 395.162 (8, $C_{20}H_{27}O_8^+$), m/z (rel. int. (%)) = 310.195 (8, $C_{17}H_{28}NO_4^+$), m/z (rel. int. (%)) = 251.093 (9, $C_{13}H_{15}O_5^+$), m/z (rel. int. (%)) = 207.062 (21, $C_{11}H_{11}O_4^+$)

UK#14 (**87**). UPLC/ESI(+)-CID-MS (microTOF-Q) of m/z 548 $[M+H]^+$, ISCID = 0 V, CE = 25 eV; m/z (rel. int. (%)) = 548.219 (1, $C_{20}H_{38}NO_{16}^+$), m/z (rel. int. (%)) = 206.099 (100, $C_8H_{16}NO_5^+$), m/z (rel. int. (%)) = 188.089 (5, $C_8H_{14}NO_4^+$), m/z (rel. int. (%)) = 170.078 (6, $C_8H_{12}NO_3^+$), m/z (rel. int. (%)) = 160.095 (11, $C_7H_{14}NO_3^+$), m/z (rel. int. (%)) = 142.084 (3, $C_7H_{12}NO_2^+$), m/z (rel. int. (%)) = 124.075 (1, $C_7H_{10}NO^+$), m/z (rel. int. (%)) = 114.091 (1, $C_6H_{12}NO^+$)

UK#15 (**88**). UPLC/ESI(+)-CID-MS (microTOF-Q) of m/z 229 $[M+Na]^+$, ISCID = 0 V, CE = 10 eV; m/z (rel. int. (%)) = 229.064 (100, $C_8H_{14}O_6Na^+$), m/z (rel. int. (%)) = 211.053 (6, $C_8H_{12}O_5Na^+$), m/z (rel. int. (%)) = 143.066 (9, $C_7H_{11}O_3^+$), m/z (rel. int. (%)) = 125.056 (4, $C_7H_9O_2^+$)

Indol-3-carbonsäurehexosylester (**89**). UPLC/ESI(+)-CID-MS (micrOTOF-Q) of m/z 346 [M+Na]⁺, ISCID = 0 V, CE = 17 eV; m/z (rel. int. (%)) = 346.083 (100, C₁₅H₁₇NO₇Na⁺), m/z (rel. int. (%)) = 184.033 (38, C₉H₇NO₂Na⁺, M-162(hex))

UK#16 (**90**). UPLC/ESI(+)-CID-MS (micrOTOF-Q) of m/z 403 [M+Na]⁺, ISCID = 0 V, CE = 17 eV; m/z (rel. int. (%)) = 403.149 (100, C₁₆H₂₈O₁₀Na⁺), m/z (rel. int. (%)) = 359.160 (50, C₁₅H₂₈O₈Na⁺), m/z (rel. int. (%)) = 317.154 (4, C₁₃H₂₆NO₇Na⁺), m/z (rel. int. (%)) = 225.144 (4, C₁₃H₂₁O₃⁺)

Quercetin-malonyl-di-O-hexosid (**91**). UPLC/ESI(+)-CID-MS (micrOTOF-Q) of m/z 713 [M+H]⁺, ISCID = 0 V, CE = 17 eV; m/z (rel. int. (%)) = 713.146 (5, C₃₀H₃₃O₂₀⁺), m/z (rel. int. (%)) = 551.093 (12, C₂₄H₂₃O₁₅⁺, M-162(hex)), m/z (rel. int. (%)) = 465.095 (100, C₂₁H₂₁O₁₂⁺, M-86(malonyl)), m/z (rel. int. (%)) = 303.043 (52, C₁₅H₁₁O₇⁺, Aglycon)

UK#17 (**92**). UPLC/ESI(+)-CID-MS (micrOTOF-Q) of m/z 245 [M+H]⁺, ISCID = 0 V, CE = 17 eV; m/z (rel. int. (%)) = 245.145 (7, C₁₁H₂₁N₂O₄⁺), m/z (rel. int. (%)) = 228.118 (11, C₁₁H₁₈NO₄⁺), m/z (rel. int. (%)) = 210.108 (8, C₁₁H₁₆NO₃⁺), m/z (rel. int. (%)) = 200.125 (27, C₁₀H₁₈NO₃⁺), m/z (rel. int. (%)) = 182.114 (100, C₁₀H₁₆NO₂⁺), m/z (rel. int. (%)) = 154.119 (8, C₉H₁₆NO⁺), m/z (rel. int. (%)) = 130.047 (96, C₅H₈NO₃⁺), m/z (rel. int. (%)) = 116.104 (13, C₆H₁₄NO⁺)

UK#18 (**93**). UPLC/ESI(+)-CID-MS (micrOTOF-Q) of m/z 287 [M+Na]⁺, ISCID = 0 V, CE = 17 eV; m/z (rel. int. (%)) = 287.102 (100, C₁₁H₂₀O₇Na⁺), m/z (rel. int. (%)) = 185.039 (65, C₆H₁₀O₅Na⁺)

UK#19 (unbekanntes Hexosid) (**94**). UPLC/ESI(+)-CID-MS (micrOTOF-Q) of m/z 383 [M+Na]⁺, ISCID = 0 V, CE = 17 eV; m/z (rel. int. (%)) = 383.125 (38, C₁₆H₂₄O₉Na⁺, M-162(hex)), m/z (rel. int. (%)) = 221.074 (100, C₁₀H₁₄O₄Na⁺, M-2x162(2xhex)), m/z (rel. int. (%)) = 185.039 (10, C₆H₁₀O₅Na⁺)

UK#20 (unbekanntes Dihexosid) (**95**). UPLC/ESI(+)-CID-MS (micrOTOF-Q) of m/z 545 [M+Na]⁺, ISCID = 0 V, CE = 25 eV; m/z (rel. int. (%)) = 545.174 (10, C₂₂H₃₄O₁₄Na⁺), m/z (rel. int. (%)) = 383.125 (100, C₁₆H₂₄O₉Na⁺), m/z (rel. int. (%)) = 221.074 (42, C₁₀H₁₄O₄Na⁺), m/z (rel. int. (%)) = 185.040 (4, C₆H₁₀O₅Na⁺)

Quercetin-di-O-hexosid (**96**). UPLC/ESI(+)-CID-MS (micrOTOF-Q) of m/z 627 [M+H]⁺, ISCID = 0 V, CE = 10 eV; m/z (rel. int. (%)) = 627.145 (15, C₂₇H₃₁O₁₇⁺), m/z (rel. int. (%)) = 465.096 (100, C₂₁H₂₁O₁₂⁺, M-162(hex)), m/z (rel. int. (%)) = 303.045 (14, C₁₅H₁₁O₇⁺, Aglycon)

UK#21 (**97**). UPLC/ESI(+)-CID-MS (micrOTOF-Q) of m/z 526 [M+H]⁺, ISCID = 0 V, CE = 25 eV; m/z (rel. int. (%)) = 526.193 (1, C₂₄H₃₂NO₁₂⁺), m/z (rel. int. (%)) = 220.114 (100, C₉H₁₈NO₅⁺), m/z (rel. int. (%)) = 202.104 (7, C₉H₁₆NO₄⁺), m/z (rel. int. (%)) = 184.094 (23, C₉H₁₄NO₃⁺), m/z (rel. int. (%)) = 174.109 (21, C₈H₁₆NO₃⁺), m/z (rel. int. (%)) = 156.099 (10, C₈H₁₄NO₂⁺), m/z (rel. int. (%)) = 138.089 (3, C₈H₁₂NO⁺), m/z (rel. int. (%)) = 128.105 (3, C₇H₁₄NO⁺), m/z (rel. int. (%)) = 110.092 (1, C₇H₁₂N⁺)

UK#22 (**98**). UPLC/ESI(+)-CID-MS (micrOTOF-Q) of m/z 347 [M+Na]⁺, ISCID = 0 V, CE = 17 eV; m/z (rel. int. (%)) = 347.124 (10, C₁₃H₂₄O₉Na⁺), m/z (rel. int. (%)) = 303.095 (6, C₁₁H₂₀O₈Na⁺), m/z (rel. int. (%)) = 185.075 (100, C₇H₁₄O₄Na⁺)

UK#23 (**99**). UPLC/ESI(+)-CID-MS (micrOTOF-Q) of m/z 347 [M+Na]⁺, ISCID = 0 V, CE = 25 eV; m/z (rel. int. (%)) = 347.125 (35, C₁₃H₂₄O₉Na⁺), m/z (rel. int. (%)) = 301.121 (100, C₁₂H₂₂O₇Na⁺), m/z (rel. int. (%)) = 285.126 (18, C₁₂H₂₂O₆Na⁺), m/z (rel. int. (%)) = 203.050 (42, C₆H₁₂O₆Na⁺), m/z (rel. int. (%)) = 185.076 (29, C₇H₁₄O₄Na⁺)

Gluconapin (**100**). UPLC/ESI(-)-CID-MS (micrOTOF-Q) of m/z 372 [M-H]⁻, ISCID = 0 V, CE = 25 eV; m/z (rel. int. (%)) = 372.033 (13, C₁₁H₁₈NO₉S₂⁻), m/z (rel. int. (%)) = 274.983 (15, C₆H₁₁O₈S₂⁻), m/z (rel. int. (%)) = 259.007 (20, C₆H₁₁O₉S₂⁻), m/z (rel. int. (%)) = 195.026 (4, C₆H₁₁O₅S⁻), m/z (rel. int. (%)) = 96.956 (100, HSO₄⁻), m/z (rel. int. (%)) = 95.948 (75, SO₄⁻)

Glucobrassicinapin (**101**). UPLC/ESI(-)-CID-MS (micrOTOF-Q) of m/z 386 [M-H]⁻, ISCID = 0 V, CE = 25 eV; m/z (rel. int. (%)) = 386.058 (11, C₁₂H₂₀NO₉S₂⁻), m/z (rel. int. (%)) = 274.983 (17, C₆H₁₁O₈S₂⁻), m/z (rel. int. (%)) = 259.007 (14, C₆H₁₁O₉S₂⁻), m/z (rel. int. (%)) = 195.026 (7, C₆H₁₁O₅S⁻), m/z (rel. int. (%)) = 96.956 (100, HSO₄⁻), m/z (rel. int. (%)) = 95.948 (64, SO₄⁻)

4-Hydroxyglucobrassicin (**102**). UPLC/ESI(-)-CID-MS (micrOTOF-Q) of m/z 463 [M-H]⁻, ISCID = 0 V, CE = 17 eV; m/z (rel. int. (%)) = 463.035 (100, C₁₆H₁₉N₂O₁₀S₂⁻), m/z (rel. int. (%)) = 274.983 (4, C₆H₁₁O₈S₂⁻), m/z (rel. int. (%)) = 259.007 (5, C₆H₁₁O₉S₂⁻), m/z (rel. int. (%)) = 195.026 (2, C₆H₁₁O₅S⁻), m/z (rel. int. (%)) = 96.956 (20, HSO₄⁻), m/z (rel. int. (%)) = 95.948 (2, SO₄⁻)

Glucobrassicin (**103**). UPLC/ESI(-)-CID-MS (micrOTOF-Q) of m/z 447 [M-H]⁻, ISCID = 0 V, CE = 25 eV; m/z (rel. int. (%)) = 447.041 (55, C₁₆H₁₉N₂O₉S₂⁻), m/z (rel. int. (%)) = 274.983 (29, C₆H₁₁O₈S₂⁻), m/z (rel. int. (%)) = 259.008 (34, C₆H₁₁O₉S₂⁻), m/z (rel. int. (%)) = 195.031 (8, C₆H₁₁O₅S⁻), m/z (rel. int. (%)) = 96.956 (100, HSO₄⁻), m/z (rel. int. (%)) = 95.948 (55, SO₄⁻)

UK#24 (unbekanntes Hexosid) (**104**). UPLC/ESI(+)-CID-MS (micrOTOF-Q) of m/z 376 [M+Na]⁺, ISCID = 0 V, CE = 17 eV; m/z (rel. int. (%)) = 376.094 (26, C₁₆H₁₉NO₈Na⁺), m/z (rel. int. (%)) = 214.044 (100, C₁₀H₉NO₃Na⁺, M-162(hex))

UK#25 (Flavonoid) (**105**). UPLC/ESI(+)-CID-MS (microTOF-Q) of m/z 289 $[M+H]^+$, ISCID = 0 V, CE = 10 eV; m/z (rel. int. (%)) = 289.065 (76, $C_{15}H_{13}O_6^+$), m/z (rel. int. (%)) = 271.055 (71, $C_{15}H_{11}O_5^+$), m/z (rel. int. (%)) = 261.071 (100, $C_{14}H_{13}O_5^+$), m/z (rel. int. (%)) = 259.055 (65, $C_{14}H_{11}O_5^+$), m/z (rel. int. (%)) = 243.059 (8, $C_{14}H_{11}O_4^+$), m/z (rel. int. (%)) = 231.061 (11, $C_{13}H_{11}O_4^+$), m/z (rel. int. (%)) = 179.031 (10, $C_9H_7O_4^+$), m/z (rel. int. (%)) = 163.036 (43, $C_9H_7O_3^+$), m/z (rel. int. (%)) = 151.037 (37, $C_8H_7O_3^+$), m/z (rel. int. (%)) = 139.037 (95, $C_7H_7O_3^+$), m/z (rel. int. (%)) = 135.042 (78, $C_8H_7O_2^+$), m/z (rel. int. (%)) = 123.042 (24, $C_7H_7O_2^+$), m/z (rel. int. (%)) = 111.042 (5, $C_6H_7O_2^+$)

Procyanidin-Dimer (**106**). UPLC/ESI(+)-CID-MS (microTOF-Q) of m/z 579 $[M+H]^+$, ISCID = 0 V, CE = 10 eV; m/z (rel. int. (%)) = 579.138 (100, $C_{30}H_{27}O_{12}^+$), m/z (rel. int. (%)) = 561.127 (7, $C_{30}H_{25}O_{11}^+$), m/z (rel. int. (%)) = 453.111 (8, $C_{24}H_{21}O_9^+$), m/z (rel. int. (%)) = 427.094 (21, $C_{22}H_{19}O_9^+$), m/z (rel. int. (%)) = 409.084 (11, $C_{22}H_{17}O_8^+$), m/z (rel. int. (%)) = 291.080 (31, $C_{15}H_{15}O_6^+$), m/z (rel. int. (%)) = 289.065 (49, $C_{15}H_{13}O_6^+$), m/z (rel. int. (%)) = 271.055 (5, $C_{15}H_{11}O_5^+$), m/z (rel. int. (%)) = 247.054 (9, $C_{13}H_{11}O_5^+$).

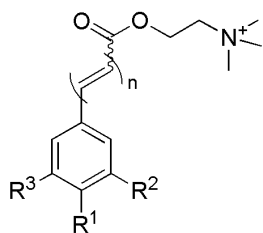
Diferuloylspermidin (**107**). UPLC/ESI(+)-CID-MS (microTOF-Q) of m/z 498 $[M+H]^+$, ISCID = 0 V, CE = 25 eV; m/z (rel. int. (%)) = 498.252 (46, $C_{27}H_{36}N_3O_6^+$), m/z (rel. int. (%)) = 481.228 (6, $C_{27}H_{33}N_2O_6^+$), m/z (rel. int. (%)) = 480.240 (5, $C_{27}H_{34}N_3O_5^+$), m/z (rel. int. (%)) = 322.205 (21, $C_{17}H_{28}N_3O_3^+$), m/z (rel. int. (%)) = 305.184 (8, $C_{17}H_{25}N_2O_3^+$), m/z (rel. int. (%)) = 304.197 (6, $C_{17}H_{26}N_3O_2^+$), m/z (rel. int. (%)) = 248.123 (11, $C_{14}H_{18}NO_3^+$), m/z (rel. int. (%)) = 234.108 (100, $C_{13}H_{16}NO_3^+$), m/z (rel. int. (%)) = 177.052 (35, $C_{10}H_9NO_3^+$)

Epicatechin (**108**). UPLC/ESI(+)-CID-MS (microTOF-Q) of m/z 291 $[M+H]^+$, ISCID = 0 V, CE = 10 eV; m/z (rel. int. (%)) = 291.081 (100, $C_{15}H_{15}O_6^+$), m/z (rel. int. (%)) = 273.071 (11, $C_{15}H_{13}O_5^+$), m/z (rel. int. (%)) = 249.070 (7, $C_{13}H_{13}O_5^+$), m/z (rel. int. (%)) = 207.061 (10, $C_{11}H_{11}O_4^+$), m/z (rel. int. (%)) = 165.052 (20, $C_9H_9O_3^+$), m/z (rel. int. (%)) = 147.042 (5, $C_9H_7O_2^+$), m/z (rel. int. (%)) = 139.037 (64, $C_7H_7O_3^+$), m/z (rel. int. (%)) = 123.042 (27, $C_7H_7O_2^+$). Dieser Metabolit wurde durch Vergleich mit dem Spektrum und der Retentionszeit von Epicatechin identifiziert.

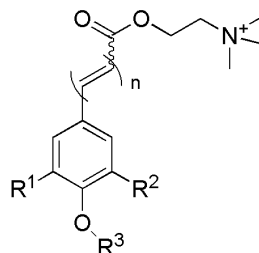
Procyanidin-Trimer (**109**). UPLC/ESI(+)-CID-MS (micrOTOF-Q) of m/z 867 $[M+H]^+$, ISCID = 0 V, CE = 10 eV; m/z (rel. int. (%)) = 867.202 (68, $C_{45}H_{39}O_{18}^+$), m/z (rel. int. (%)) = 715.154 (19, $C_{37}H_{31}O_{15}^+$), m/z (rel. int. (%)) = 579.143 (100, $C_{30}H_{27}O_{12}^+$), m/z (rel. int. (%)) = 289.066 (33, $C_{15}H_{13}O_6^+$), m/z (rel. int. (%)) = 247.057 (5, $C_{13}H_{11}O_5^+$)

UK#26 (unbekanntes Hexosid) (**110**). UPLC/ESI(+)-CID-MS (micrOTOF-Q) of m/z 741 $[M+H]^+$, ISCID = 0 V, CE = 25 eV; m/z (rel. int. (%)) = 741.223 (93, $C_{37}H_{41}O_{16}^+$), m/z (rel. int. (%)) = 579.172 (100, $C_{31}H_{21}O_{11}^+$, M-162(hex))

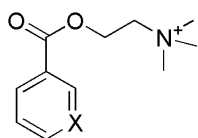
Abbildung 6-8. Strukturen der analysierten Sekundärmetabolite Teil 1.



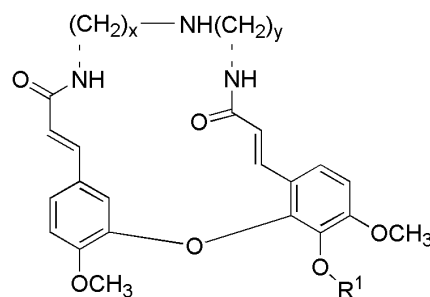
- 5** $n=0$, $R^1=OH$, $R^2=H$, $R^3=H$
7 $n=0$, $R^1=OH$, $R^2=OMe$, $R^3=H$
8 $n=1$, $R^1=OH$, $R^2=OH$, $R^3=H$
9 $n=1$, $R^1=OH$, $R^2=OMe$, $R^3=OH$
13 $n=1$, $R^1=OH$, $R^2=OMe$, $R^3=H$
16 $n=1$, $R^1=OH$, $R^2=OMe$, $R^3=OMe$
23 $n=1$, $R^1=OMe$, $R^2=OMe$, $R^3=H$
24 $n=1$, $R^1=H$, $R^2=H$, $R^3=H$
55 $n=0$, $R^1=OH$, $R^2=OMe$, $R^3=OMe$
69 $n=1$, $R^1=OH$, $R^2=H$, $R^3=H$



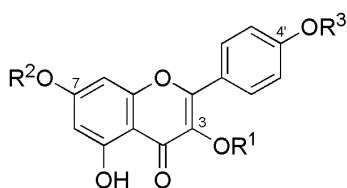
- 51** $n=1$, $R^1=OMe$, $R^2=OMe$, $R^3=C_{12}H_{21}O_{10}$
53 $n=1$, $R^1=OMe$, $R^2=OMe$, $R^3=C_{10}H_{17}O_{10}$
65 $n=1$, $R^1=H$, $R^2=H$, $R^3=C_6H_{11}O_5$
67 $n=1$, $R^1=OMe$, $R^2=OH$, $R^3=C_6H_{11}O_5$
78 $n=1$, $R^1=OMe$, $R^2=OMe$, $R^3=C_6H_{11}O_4$



- 1** $X=N$
14 $X=CH$

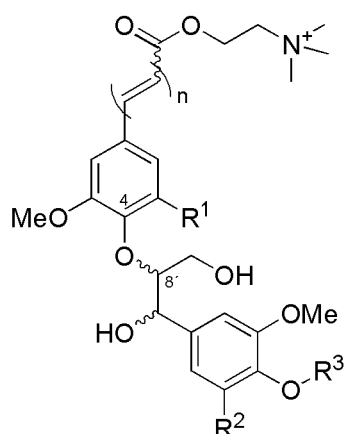


- 36** $R^1=H$
44 $R^1=C_6H_{11}O_5$

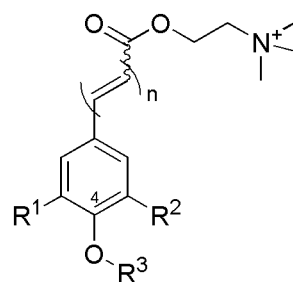


- 32** $R^1=Soph$, $R^2=Glc$, $R^3=H$
33 $R^1=2'''-Sin-Soph$, $R^2=Glc$, $R^3=H$
35 $R^1=Glc$, $R^2=Glc$, $R^3=6''''-Sin-Glc$
37 $R^1=Soph$, $R^2=2'''-Sin-Glc$, $R^3=H$
46 $R^1=Soph$, $R^2=H$, $R^3=H$
47 $R^1=2'''-Sin-Soph$, $R^2=H$, $R^3=H$
48 $R^1=2'''-Sin-Soph$, $R^2=6''''-Sin-Glc$, $R^3=H$

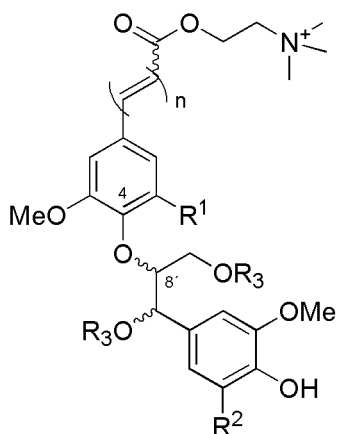
Abbildung 6-9. Strukturen der analysierten Sekundärmetabolite Teil 2.



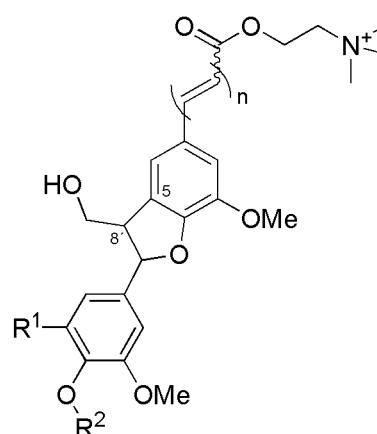
- 10** $n=1$, $R^1=H$, $R^2=H$, $R^3=C_6H_{11}O_5$
11 $n=1$, $R^1=H$, $R^2=OMe$, $R^3=C_6H_{11}O_5$
12 $n=0$, $R^1=H$, $R^2=H$, $R^3=H$
15 $n=1$, $R^1=OMe$, $R^2=H$, $R^3=C_6H_{11}O_5$
17 $n=1$, $R^1=OMe$, $R^2=OMe$, $R^3=C_6H_{11}O_5$
18 $n=1$, $R^1=H$, $R^2=OMe$, $R^3=H$
19 $n=1$, $R^1=H$, $R^2=H$, $R^3=H$
21 $n=1$, $R^1=OMe$, $R^2=OMe$, $R^3=H$
22 $n=1$, $R^1=OMe$, $R^2=H$, $R^3=H$



- 2** $n=0$, $R^1=H$, $R^2=H$, $R^3=C_6H_{11}O_5$
3 $n=0$, $R^1=OMe$, $R^2=H$, $R^3=C_6H_{11}O_5$
4 $n=0$, $R^1=OMe$, $R^2=OMe$, $R^3=C_6H_{11}O_5$
6 $n=1$, $R^1=OMe$, $R^2=OMe$, $R^3=Glc$
49 $n=1$, $R^1=OH$, $R^2=H$, $R^3=C_6H_{11}O_5$
52 $n=1$, $R^1=OMe$, $R^2=H$, $R^3=C_6H_{11}O_5$

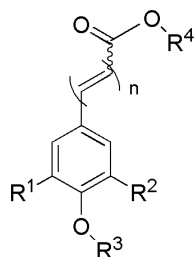


- 27** $n=1$, $R^1=H$, $R^2=OMe$, $R^3=\{H, \text{sinapoyl}\}$
28 $n=1$, $R^1=H$, $R^2=H$, $R^3=\{H, \text{sinapoyl}\}$
29 $n=1$, $R^1=OMe$, $R^2=H$, $R^3=\{H, \text{sinapoyl}\}$
81 wie Nr. 84 ohne $\{H, \text{sinapoyl}\}$
83 $n=1$, $R^1=H$, $R^2=H$, $R^3=\{H, \text{sinapoyl}\}$
84 wie Nr. 83 inkl. Methyl-Rest

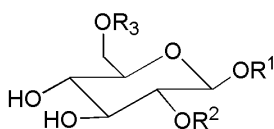


- 20** $n=1$, $R^1=H$, $R^2=C_6H_{11}O_5$
25 $n=1$, $R^1=OMe$, $R^2=H$
26 $n=1$, $R^1=H$, $R^2=H$
73 $n=1$, $R^1=OMe$, $R^2=C_6H_{11}O_5$

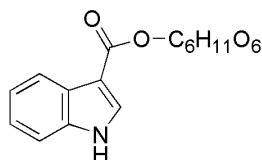
Abbildung 6-10. Strukturen der analysierten Sekundärmetabolite Teil 3.



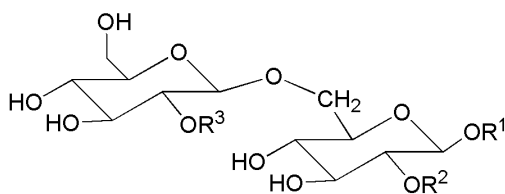
- 31** $n=1$, $R^1=OMe$, $R^2=OH$, $R^3=H$, $R^4=C_6H_{11}O_5$ oder $R^3=C_6H_{11}O_5$, $R^4=H$
34 $n=1$, $R^1=OMe$, $R^2=OMe$, $R^3=H$, $R^4=Glc$
38 $n=1$, $R^1=OMe$, $R^2=OMe$, $R^3=H$, $R^4=C_4H_5O_4$ (Malat)
43 $n=0$, $R^1=OMe$, $R^2=OMe$, $R^3=Glc$, $R^4=H$
45 $n=1$, $R^1=OMe$, $R^2=OMe$, $R^3=Glc$, $R^4=H$
50 $n=0$, $R^1=H$, $R^2=H$, $R^3=H$, $R^4=C_6H_{11}O_5$ oder $R^3=C_6H_{11}O_5$, $R^4=H$
54 $n=1$, $R^1=OMe$, $R^2=OMe$, $R^3=H$, $R^4=C_5H_9O_5$ oder $R^3=C_5H_9O_5$, $R^4=H$
57 $n=1$, $R^1=OMe$, $R^2=H$, $R^3=H$, $R^4=C_6H_{11}O_5$ oder $R^3=C_6H_{11}O_5$, $R^4=H$
58 $n=1$, $R^1=OMe$, $R^2=H$, $R^3=H$, $R^4=C_4H_5O_4$ (Malat)
59 $n=1$, $R^1=OMe$, $R^2=OMe$, $R^3=C_6H_{11}O_5$, $R^4=Me$
60 $n=1$, $R^1=OMe$, $R^2=OMe$, $R^3=H$, $R^4=Me$
66 $n=0$, $R^1=OMe$, $R^2=H$, $R^3=H$, $R^4=C_6H_{11}O_5$ oder $R^3=C_6H_{11}O_5$, $R^4=H$
68 $n=1$, $R^1=OH$, $R^2=H$, $R^3=H$, $R^4=C_6H_{11}O_5$ oder $R^3=C_6H_{11}O_5$, $R^4=H$
70 $n=1$, $R^1=OMe$, $R^2=OMe$, $R^3=H$, $R^4=C_{12}H_{21}O_{10}$ oder $R^3=C_{12}H_{21}O_{10}$, $R^4=H$
 oder $R^3=C_6H_{11}O_5$, $R^4=C_6H_{11}O_5$
71 $n=0$, $R^1=OMe$, $R^2=OMe$, $R^3=C_6H_{11}O_5$, $R^4=Me$



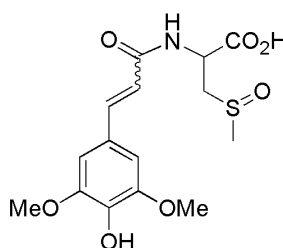
- 40** $R^1=Sinapoyl$, $R^2=Sinapoyl$, $R^3=H$
42 $R^1=Sinapoyl$, $R^2=H$, $R^3=Sinapoyl$



- 89** Indole-3-carbonsäurehexylester



- 30** $R^1=Kaffeoyl$, $R^2=H$, $R^3=H$
39 $R^1=Sinapoyl$, $R^2=Sinapoyl$, $R^3=H$
41 $R^1=R^2=R^3=Sinapoyl$



- 56** *N*-Sinapoyl-*S*-methylcysteinsulfoxid

Abbildung 6-11. Strukturen der analysierten Sekundärmetabolite Teil 4.

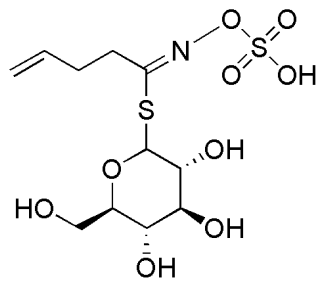
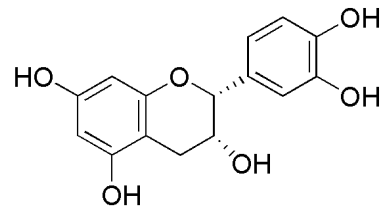
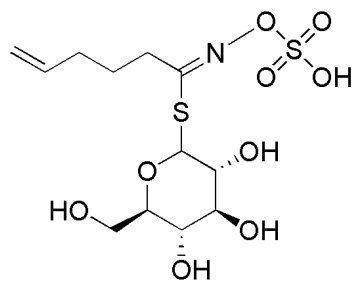
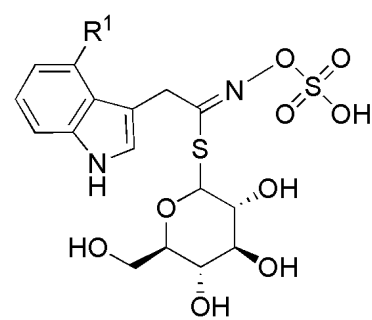
**100****108****101****102** R¹=OH**103** R¹=H

Tabelle 6-13. Zusammenstellung der Sekundärmetabolite, die in die zielgerichtete Analyse integriert wurden. Aufgeführt ist die Retentionszeit, das ausgewählte Quasimolekularion für die Fragmentierung in Quadrupole 1 (Q1) mit der entsprechenden Kollisionsenergie (CE) und dem in Quadrupole 3 (Q3) detektiertem m/z Signal.

Nr.	Metabolit	Rt (min)	Typ	Q1	Q3	CE (eV)
1	Nicotinoylcholin	0.5	[M] ⁺	209.1	150.1	30
2	4-O-Hexosyloxybenzoylcholin	0.5	[M] ⁺	386.2	165.1	45
3	4-O-Hexosylvanilloylcholin	0.6	[M] ⁺	416.2	195.1	30
4	4-O-Hexosylsyringoylcholin	0.7	[M] ⁺	446.2	181.1	70
5	4-Hydroxybenzoylcholin	1.0	[M] ⁺	224.1	165.1	30
6	4-O-Glucosylsinapoylcholin	1.3	[M] ⁺	472.2	251.1	30
7	Vanilloylcholin	1.2	[M] ⁺	254.1	151.0	45
8	Kaffeoylcholin	1.3	[M] ⁺	266.1	207.1	30
9	5-Hydroxyferuloylcholin	1.4	[M] ⁺	296.2	237.2	30
10	FC(4-O-8')G-4-O'-hexosid	1.5	[M] ⁺	638.3	221.2	40
11	FC(4-O-8')S-4-O'-hexosid	1.5	[M] ⁺	668.3	221.1	40
12	VC(4-O-8')G	1.6	[M] ⁺	450.2	195.1	45
13	Feruloylcholin	1.5	[M] ⁺	280.2	221.1	30
14	Benzoylcholin	1.6	[M] ⁺	208.1	149.1	30
15	SC(4-O-8')G-4-O'-hexosid	1.5	[M] ⁺	668.3	251.1	40
16	Sinapoylcholin	1.6	[M] ⁺	310.1	251.1	30
17	SC(4-O-8')S-4-O'-hexosid	1.6	[M] ⁺	698.3	251.1	40
18	FC(4-O-8')S	1.6	[M] ⁺	506.2	221.1	30
19	FC(4-O-8')G	1.7	[M] ⁺	476.2	221.1	30
20	FC(5-8')G-4-O-hexoside	1.7	[M] ⁺	620.3	381.1	60
21	SC(4-O-8')S	1.8	[M] ⁺	536.2	251.1	35
22	SC(4-O-8')G	1.9	[M] ⁺	506.2	251.1	30
23	3,4-Dimethoxycinnamoylcholin	2.0	[M] ⁺	294.2	235.1	30
24	Cinnamoylcholin	2.2	[M] ⁺	234.1	175.1	30
25	FC(5-8')S	2.2	[M] ⁺	488.2	399.1	50
26	FC(5-8')G	2.2	[M] ⁺	458.2	381.1	30
27	FC(4-O-8')S-di-sin	3.1	[M] ⁺	712.3	221.1	40
28	FC(4-O-8')G-di-sin	3.1	[M] ⁺	682.3	221.1	40
29	SC(4-O-8')G-di-sin	3.3	[M] ⁺	712.3	251.1	40
30	Kaffeoylgentiobiose	1.3	[M+Na] ⁺	527.1	365.1	30
31	O-Hexosyl-5-hydroxyferulasäure	1.4	[M+Na] ⁺	395.1	185.0	20
32	Kämpferol-3-O-soph-7-O-glc	1.3	[M+Na] ⁺	795.2	347.2	60
33	Kämpferol-3-O-(sin-soph)-7-O-glc	1.5	[M+H] ⁺	979.3	207.1	80
34	1-O-Sinapoylglucose	1.6	[M+Na] ⁺	409.2	247.2	30
35	Kämpferol-4'-O-(sin-glc)-3,7-di-glc	1.7	[M+H] ⁺	979.4	207.1	80

Tabelle 6-13 (Fortsetzung).

Nr.	Metabolit	Rt (min)	Typ	Q1	Q3	CE (eV)
36	Zykl. Spermidin-Alkaloid	1.9	[M] ⁺	496.3	408.2	45
37	Kämpferol-3-O-soph-7-O-(sin-glc)	2.0	[M+H] ⁺	979.3	207.2	80
38	2-O-Sinapoyl-S-malat	2.0	[M+Na] ⁺	363.1	207.1	30
39	1,2-Di-O-sinapoylgentiobiose	2.3	[M+Na] ⁺	777.2	207.1	50
40	1,2-Di-O-sinapoylglucose	2.6	[M+Na] ⁺	615.2	207.1	40
41	1,2,2'-Tri-O-sinapoylgentiobiose	2.6	[M+Na] ⁺	983.3	207.1	60
42	1,6-Di-O-sinapoylglucose	2.9	[M+Na] ⁺	615.2	207.2	40
43	4-O-β-Glucosylsyringasäure	1.2	[M+Na] ⁺	383.1	185.0	20
45	4-O-β-Glucosyl-E-sinapinsäure	1.4	[M+Na] ⁺	409.1	247.1	30
46	Kämpferol-3-O-β-soph	1.7	[M+H] ⁺	611.2	287.1	30
47	Kämpferol-3-O-(sin-soph)	1.9	[M+H] ⁺	817.2	207.1	40
48	Kämpferol-3-O-glc-4'-O-(sin-glc)	2.3	[M+H] ⁺	817.2	207.2	40
49	Kaffeoylcholin-4-O-hexosid	1.2	[M] ⁺	428.2	207.1	30
50	4-O-Hexosylhydroxybenzoesäure	1.0	[M+Na] ⁺	323.1	185.0	20
51	4-O-Dihexosylsinapoylcholin	1.2	[M] ⁺	634.3	251.1	40
52	4-O-Hexosylferuloylcholin	1.3	[M] ⁺	442.2	221.1	30
53	SC-4-O-(hexosid-pentosid)	1.3	[M] ⁺	604.3	251.1	50
54	O-Pentosylsinapinsäure	1.4	[M+Na] ⁺	379.1	155.0	20
55	Syringoylcholin	1.4	[M] ⁺	284.1	225.1	30
56	N-Sinapoyl-S-methylcysteinsulfoxid	1.5	[M+H] ⁺	358.1	207.1	30
57	O-Hexosylferulasäure	1.6	[M+Na] ⁺	379.1	185.0	20
58	2-O-Feruloyl-S-malat	2.0	[M+Na] ⁺	333.1	177.1	30
59	4-O-Hexosylmethylsinapinsäure	2.1	[M+Na] ⁺	423.1	185.0	20
61	UK#1 (phenolischer Cholinester)	2.0	[M] ⁺	626.3	195.1	40
62	UK#2 (phenolischer Cholinester)	1.9	[M] ⁺	284.2	225.1	30
63	UK#3 (phenolischer Cholinester)	2.4	[M] ⁺	310.2	133.1	50
64	UK#4 (phenolischer Cholinester)	1.3	[M] ⁺	488.2	267.1	50
65	4-O-Hexosylcumaroylcholin	0.9	[M] ⁺	412.2	191.1	35
66	O-Hexosylvanillinsäure	0.6	[M+Na] ⁺	353.1	185.0	20
67	4-O-Hexosyl-5-hydroxyferuloylcholin	1.2	[M] ⁺	458.2	237.1	50
68	O-Hexosylkaffeesäure	1.5	[M+Na] ⁺	365.1	185.0	20
69	Cumaroylcholin	1.5	[M] ⁺	250.1	147.1	45
70	Di-O-hexosylsinapinsäure	1.6	[M+Na] ⁺	571.2	409.1	30
72	UK#5 (Cholinester)	0.7	[M] ⁺	293.2	148.1	40
73	FC(5-8 ['])S-4-O-hexosid	2.5	[M] ⁺	650.3	429.1	50
74	UK#6 (phenolischer Cholinester)	2.1	[M] ⁺	324.2	265.1	30
75	UK#7	1.4	[M] ⁺	319.2	277.1	30

Tabelle 6-13 (Fortsetzung).

Nr.	Metabolit	Rt (min)	Typ	Q1	Q3	CE (eV)
76	UK#8 (Cholinester)	1.7	[M] ⁺	645.3	251.1	30
77	UK#9 (phenolischer Cholinester)	2.3	[M] ⁺	300.2	241.1	40
78	Sinapin-4-O-deoxyhexosid	1.5	[M] ⁺	456.2	251.1	30
79	UK#10 (Cholinester)	1.5	[M] ⁺	277.2	218.1	30
80	UK#11 (phenolischer Cholinester)	2.0	[M] ⁺	286.2	227.1	30
81	VC(4-O-8')-O-methyl-G	1.6	[M] ⁺	464.2	195.1	50
82	UK#12 (Cholinester)	2.8	[M] ⁺	649.3	221.1	60
83	VC(4-O-8')G-sin	3.0	[M] ⁺	656.3	195.1	50
84	VC(4-O-8')-O-methyl-G-sin	3.4	[M] ⁺	670.3	195.1	50
85	UK#13 (phenolischer Cholinester)	2.5	[M] ⁺	684.3	365.1	50
86	UK#3 – Sinapoylglucose-Konjugat	3.0	[M] ⁺	678.3	207.1	60

b. Zellwand-gebundene Phenole sowie HCA- und HBA-Äquivalente

Tabelle 6-14: Zusammenstellung der analysierten Metabolite hinsichtlich Zellwand-gebundener Phenole sowie HCA- und HBA-Äquivalenten. Aufgeführt ist die Retentionszeit, das ausgewählte Quasimolekularion für die Fragmentierung in Quadrupole 1 (Q1) mit der entsprechenden Kollisionsenergie (CE) und dem in Quadrupole 3 (Q3) detektiertem m/z Signal.

Metabolit	Rt (min)	Typ	Q1	Q3	CE (eV)
<i>p</i> -Cumarsäure	5,7	[M-H] ⁻	163,0	119,1	-20
Kaffeesäure	4,5	[M-H] ⁻	179,0	135,0	-22
Ferulasäure	6,4	[M-H] ⁻	193,1	134,0	-20
5-Hydroxyferulasäure	5,2	[M-H] ⁻	209,0	150,0	-26
Sinapinsäure	6,7	[M-H] ⁻	223,1	164,0	-28
Benzoessäure	5,9	[M-H] ⁻	121,0	77,0	-16
Vanillinsäure	4,3	[M-H] ⁻	167,0	108,0	-15
Syringasäure	5,0	[M-H] ⁻	197,1	121,0	-24
Koniferylaldehyd	7,2	[M-H] ⁻	177,1	162,0	-20
Sinapylaldehyd	7,5	[M-H] ⁻	207,1	177,0	-28
4-Hydroxybenzaldehyd	4,6	[M-H] ⁻	121,0	92,0	-26
Vanillaldehyd	5,6	[M-H] ⁻	151,0	136,0	-18
Syringaldehyd	6,3	[M-H] ⁻	181,1	166,0	-20
Koniferylalkohol	6,2	[M-H] ⁻	179,1	146,0	-18
Sinapylalkohol	6,6	[M-H] ⁻	209,1	179,0	-28

c. Primärmetabolite

Tabelle 6-15: Zusammenstellung der detektierten Primärmetabolite in der ungerichteten Metabolitenanalyse mittels GC-EI-MS während der Samenentwicklung von *B. napus* für die Linien *UGT84A9i* und *UGT84A9i/BnSCTi* sowie des entsprechenden Wildtyps.

Nr.	Rt (min)	m/z *	Metabolit *	Summenformel	RI *
Aminosäuren:					
1	7,71	116 ^a	L-Alanin ^(1,2,3)	C ₃ H ₇ NO ₂	1101 / 1090
2	9,25	144 ^a	L-Valin ^(1,2,3)	C ₅ H ₁₁ NO ₂	1224 / 1208
3	9,98	158 ^a	L-Leucin ^(1,2,3)	C ₆ H ₁₃ NO ₂	1282 / 1266
4	10,28	158 ^a	L-Isoleucin ^(1,2,3)	C ₆ H ₁₃ NO ₂	1305 / 1288
5	10,33	142 ^a	L-Prolin ^(1,2,3)	C ₅ H ₉ NO ₂	1310 / 1298
6	10,46	174 ^a	Glycin ^(1,2,3)	C ₂ H ₅ NO ₂	1320 / 1304
7	11,16	204 ^a	L-Serin ^(1,2,3)	C ₃ H ₇ NO ₃	1374 / 1353
8	11,52	218 ^a	L-Threonin ^(1,2,3)	C ₄ H ₉ NO ₃	1402 / 1379
9	13,14	176	L-Methionin ^(1,2,3)	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	1533 / 1514
10	13,18	232 ^a	L-Asparaginsäure ^(1,2,3)	C ₄ H ₇ NO ₄	1535 / 1509
11	13,68	220	L-Cystein ^(1,2,3)	C ₃ H ₇ NO ₂ S	1585 / 1549
12	14,35	246 ^a	L-Glutaminsäure ^(1,2,3)	C ₅ H ₉ NO ₄	1640 / 1615
13	14,44	192 ^a	L-Phenylalanin ^(1,2,3)	C ₉ H ₁₁ NO ₂	1649 / 1629
14	14,94	231 ^a	L-Asparagin ^(1,2,3)	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	1694 / 1665
15	16,05	156	L-Glutamin ^(1,2,3)	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	1795 / 1767
16	16,60	256	L-Arginin, -NH ₃ ^(2,3)	C ₆ H ₁₁ N ₃ O ₂	1844 / 1814
17	17,67	154	L-Histidin ^(1,2,3)	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	1946 / 1911
18	17,67	317 ^a	L-Lysin ^(1,2,3)	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	1948 / 1912
19	17,80	218 ^a	L-Tyrosin ^(1,2,3)	C ₉ H ₁₁ NO ₃	1959 / 1932
20	20,48	202 ^a	L-Tryptophan ^(1,2,3)	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	2250 / 2214
21	11,99	248 ^a	β-Alanin ⁽³⁾	C ₃ H ₇ NO ₂	1439 / 1424
22	12,46	218 ^a	L-Homoserin ⁽³⁾	C ₄ H ₉ NO ₃	1477 / 1442
23	16,58	174	L-Ornithin ⁽³⁾	C ₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	1841 / 1809
Organische Säuren:					
24	10,39	245 ^a	Maleinsäure ⁽³⁾	C ₄ H ₄ O ₄	1314 / 1299
25	10,47	247 ^a	Bernsteinsäure ⁽³⁾	C ₄ H ₆ O ₄	1321 / 1310
26	10,77	189 ^a	Glycerinsäure ⁽³⁾	C ₃ H ₆ O ₄	1344 / 1321
27	10,88	245 ^a	Fumarsäure ⁽³⁾	C ₄ H ₄ O ₄	1353 / 1346
28	11,04	215	Pelargonsäure ⁽³⁾	C ₉ H ₁₈ O ₂	1365 / 1359
29	12,78	233 ^a	Äpfelsäure ⁽³⁾	C ₄ H ₆ O ₅	1501 / 1477
30	13,73	292 ^a	Threonsäure ⁽³⁾	C ₄ H ₈ O ₅	1585 / 1546
31	13,82	304 ^a	2-Hydroxyglutarsäure ⁽³⁾	C ₅ H ₈ O ₅	1592 / 1573
32	16,02	292 ^a	Ribonsäure ⁽³⁾	C ₅ H ₁₀ O ₆	1791 / 1765

Tabelle 6-15 (Fortsetzung).

Nr.	Rt (min)	m/z *	Metabolit *	Summenformel	RI *
Organische Säuren:					
33	16,65	375 ^a	Zitronensäure ^(1,2,3)	C ₆ H ₈ O ₇	1847 / 1804
34	17,98	333	Glucuronsäure ⁽³⁾	C ₆ H ₁₀ O ₇	1981 / 1918
35	18,27	292	Gulonsäure ⁽³⁾	C ₆ H ₁₂ O ₇	2011 / 1951
36	18,57	319	Galactonsäure ⁽³⁾	C ₆ H ₁₂ O ₇	2042 / 1984
37	18,62	333	Gluconsäure ⁽³⁾	C ₆ H ₁₂ O ₇	2047 / 1989
38	18,66	313	Palmitinsäure ⁽³⁾	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	2052 / 2044
39	18,77	333	Glucarsäure ⁽³⁾	C ₆ H ₁₀ O ₈	2062 / 2002
40	20,47	341	Stearinsäure ⁽³⁾	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	2250 / 2240
Polyole:					
41	9,44	174	Ethanolamin ⁽³⁾	C ₂ H ₇ NO	1241 / 1261
42	19,44	305	myo-Inositol ⁽³⁾	C ₆ H ₁₂ O ₆	2133 / 2084
43	22,53	360	Glycerol ⁽³⁾	C ₃ H ₈ O ₃	2511 / 2445
Phosphate:					
44	10,04	299 ^a	Phosphorsäure ⁽³⁾	H ₃ O ₄ P	1287 / 1264
45	21,54	387	Glucose-6-phosphat ⁽³⁾	C ₆ H ₁₃ O ₉ P	2387 / 2307
N-Verbindungen:					
46	10,24	180	Nicotinsäure ⁽³⁾	C ₆ H ₅ NO ₂	1302 / 1299

m/z *: charakteristisches Fragment entsprechend (Schliemann et al., 2008)

Metabolit *: Identifizierung durch: (1) Referenzsubstanz, (2) NIST Mass Spectral Library, (3) Golm Metabolome Database

RI *: beobachteter RI / theoretischer RI entsprechend Golm Metabolome Database

I. Anzahl analysierter Pflanzen und Messwiederholungen

Tabelle 6-16: Übersicht zur Anzahl analysierter Pflanzen und Messwiederholungen für jeden analysierten Metaboliten der beiden Kultivierungen (K1 und K2) für die zwei untersuchten *UGT84A9i* Rapslinien und den Wildtyp.

Analysierte Metabolite	Stadium	Wildtyp		<i>UGT84A9i</i> Linie 1		<i>UGT84A9i</i> Linie 2	
		K1	K2	K1	K2	K1	K2
Sekundärmetabolite (Tab. 3-2, 6-11, 6-10, Abb. 3-4, 3-7)	A, B, C, D	Je Stadium, Kultivierung und Rapslinie wurden 6 Pflanzen beerntet und von diesem Material 4 biologische Replikate (Einwaagen) analysiert.					
	0, 2, 4, 7, 10, 14 DAS	Je Kultivierung und Rapslinie wurde folgende Anzahl an Keimblattpaaren geerntet: 2 DAS – 25 Stk; 4 DAS – 20 Stk; 7, 10, 14 DAS – je 10 Stk. Das gemörserte und lyophilisierte Pflanzenmaterial wurde je Kultivierung, Rapslinie und Stadium 4 mal analysiert (4 Einwaagen).					
Sinapin, restl. SE, Gesamt-SE (Abb. 3-3, Tab. 6-1)	D	Je Stadium, Kultivierung und Rapslinie wurden 6 Pflanzen beerntet und von diesem Material 5 biologische Replikate (Einwaagen) analysiert.					
Sinapoylmalat, Sinapoylglucose und Sinapin (Abb. 3-2, 3-6)	A, B, C, D	Je Stadium, Kultivierung und Rapslinie wurden 6 Pflanzen beerntet und von diesem Material 4 biologische Replikate (Einwaagen) analysiert.					
	0, 2, 4, 7, 10, 14 DAS	Je Kultivierung und Rapslinie wurde folgende Anzahl an Keimblattpaaren geerntet: 2 DAS – 25 Stk; 4 DAS – 20 Stk; 7, 10, 14 DAS – je 10 Stk. Das gemörserte und lyophilisierte Pflanzenmaterial wurde je Kultivierung, Rapslinie und Stadium 4 mal analysiert (4 Einwaagen).					
Primärmetabolite (Tab. 3-3, Abb. 6-1, 6-2)	A, B, C, D	Je Stadium, Kultivierung und Rapslinie wurden 6 Pflanzen beerntet und von diesem Material 5 biologische Replikate (Einwaagen) analysiert.					
Zellwandgebundene Phenole (Tab. 3-4, 6-4)	D	Je Stadium, Kultivierung und Rapslinie wurden 6 Pflanzen beerntet und von diesem Material 5 biologische Replikate (Einwaagen) analysiert.					
HCA- und HBA-Äquivalente (Tab. 3-5, 6-6)	D	Je Stadium, Kultivierung und Rapslinie wurden 6 Pflanzen beerntet und von diesem Material 5 biologische Replikate (Einwaagen) analysiert.					
Cholin (Abb. 3-5, Tab. 6-8)	D	Je Stadium, Kultivierung und Rapslinie wurden 6 Pflanzen beerntet und von diesem Material 3 biologische Replikate (Einwaagen) analysiert.					
UV-Experiment (Abb. 3-10, 3-11, 3-14)	0, 4, 8, 12, 16 DAS	Je Rapslinie (nur K1) wurde folgende Anzahl an Keimblätter geerntet und separat analysiert: 4, 8, 12, 17 DAS – 5 Stk.					

Tabelle 6-17: Übersicht zur Anzahl analysierter Pflanzen und Messwiederholungen für jeden analysierten Metaboliten der beiden Kultivierungen (K1 und K2) für die *UGT84A9i/BnSCTi* Rapslinie und den Wildtyp.

Analysierte Metabolite	Stadium	Wildtyp		<i>UGT84A9i/BnSCTi</i>	
		K1	K2	K1	K2
Sekundärmetabolite (Tab. 3-9)	A, B, C, D	Je Stadium, Kultivierung und Rapslinie wurden 6 Pflanzen beerntet und von diesem Material 4 biologische Replikate (Einwaagen) analysiert.			
Sinapin, restl. SE, Gesamt-SE (Abb. 3-16, Tab. 6-2)	D	Je Stadium, Kultivierung und Rapslinie wurden 6 Pflanzen beerntet und von diesem Material 5 biologische Replikate (Einwaagen) analysiert.			
Sinapoylmalat, Sinapoylglucose und Sinapin (Abb. 3-15, 3-18)	A, B, C, D	Je Stadium, Kultivierung und Rapslinie wurden 6 Pflanzen beerntet und von diesem Material 4 biologische Replikate (Einwaagen) analysiert.			
	0, 2, 4, 7, 10, 14 DAS	Je Kultivierung und Rapslinie wurde folgende Anzahl an Keimblattpaaren geerntet: 2 DAS – 25 Stk; 4 DAS – 20 Stk; 7, 10, 14 DAS – je 10 Stk. Das gemörserte und lyophilisierte Pflanzenmaterial wurde je Kultivierung, Rapslinie und Stadium 4 mal analysiert (4 Einwaagen).			
Primärmetabolite (Tab. 3-10, Abb. 6-3, 6-4)	A, B, C, D	Je Stadium, Kultivierung und Rapslinie wurden 6 Pflanzen beerntet und von diesem Material 5 biologische Replikate (Einwaagen) analysiert.			
Zellwandgebundene Phenole (Tab. 3-11, 6-5)	D	Je Stadium, Kultivierung und Rapslinie wurden 6 Pflanzen beerntet und von diesem Material 5 biologische Replikate (Einwaagen) analysiert.			
HCA- und HBA-Äquivalente (Tab. 3-12, 6-7)	D	Je Stadium, Kultivierung und Rapslinie wurden 6 Pflanzen beerntet und von diesem Material 5 biologische Replikate (Einwaagen) analysiert.			
Cholin (Abb. 3-17, Tab 6-9)	D	Je Stadium, Kultivierung und Rapslinie wurden 6 Pflanzen beerntet und von diesem Material 3 biologische Replikate (Einwaagen) analysiert.			

Tabelle 6-18: Übersicht zur Anzahl analysierter Pflanzen und Messwiederholungen für jeden analysierten Metaboliten und der Rapslinien *UGT84A9i* (1) und (2), *BnSCE3OE*, *UGT84A9i/BnSCE3OE* (1) und (2), Wildtyp Drakkar und Wildtyp Lisora.

Analysierte Metabolite	Stadium	<i>UGT84A9i</i> Linie 1	<i>UGT84A9i</i> Linie 2	<i>BnSCE3OE</i>	<i>UGT84A9i</i> (L1)/ <i>BnSCE3OE</i>	<i>UGT84A9i</i> (L2)/ <i>BnSCE3OE</i>	Wildtyp Drakkar	Wildtyp Lisora
Sekundärmetabolite (Tab. 3-14, 3-15, 3-16, 3-17)	D	Je Rapslinie wurden 2 Pflanzen beerntet und von diesem Material 4 biologische Replikate (Einwaagen) analysiert.						
Sinapin, restl. SE, Gesamt-SE (Abb. 3-19, Tab. 6-3)	D	Je Rapslinie wurden 2 Pflanzen beerntet und von diesem Material 5 biologische Replikate (Einwaagen) analysiert.						
Sinapoylmalat, Sinapoylglucose und Sinapin (Abb. 3-20)	0, 4, 8, 12, 16, 20 DAS	Je Stadium und Rapslinie wurden 2 Pflanzen beerntet wobei von jeder Pflanze 4 Keimblattpaare analysiert wurden.						
Primärmetabolite (Tab. 3-20)	D	Je Rapslinie wurden 2 Pflanzen beerntet und von diesem Material 3 biologische Replikate (Einwaagen) analysiert						
Zellwand- gebundene Phenole (Tab. 3-18)	D	Je Rapslinie wurden 2 Pflanzen beerntet und von diesem Material 4 biologische Replikate (Einwaagen) analysiert						
HCA- und HBA- Äquivalente (Tab. 3-19)	D	Je Rapslinie wurden 2 Pflanzen beerntet und von diesem Material 4 biologische Replikate (Einwaagen) analysiert						

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dieter Strack möchte ich für die Bereitstellung des interessanten und komplexen Themas und des Arbeitsplatzes sowie für die fachliche Betreuung der Arbeit danken.

Ich danke ganz herzlich Herrn PD Dr. habil. Carsten Milkowski (IZN, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) für die Betreuung der Arbeit, die Korrekturvorschläge und die ständige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. Andrej Frolov danke ich für die fachliche Unterstützung, insbesondere bei MS-relevanten Fragestellungen, die ständige Diskussionsbereitschaft, die vielen Ratschläge sowie die Korrekturvorschläge für die Arbeit.

Herrn Dr. Jürgen Schmidt, Herrn Dr. Victor Wray (HZI Braunschweig) und Herrn Dr. habil. Willibald Schliemann danke ich für die Isolierung und umfassende spektroskopische Charakterisierung einiger abundanter Metaboliten aus transgenem Rapssamen. Darüber hinaus bin ich Letzterem für die Hilfe bei biochemischen Fragestellungen sowie für Korrekturhinweise zur Arbeit dankbar.

Für die Hilfe und Unterstützung bei den LC-MS-basierten Analysen danke ich Dr. Christoph Böttcher und Dr. Edda von Roepenack-Lahaye.

Herrn Dr. Alfred Baumert danke ich für die Bereitstellung von Referenzsubstanzen und Hilfe bei HPLC-relevanten Problemen.

Herrn Dr. Andreas Albert vom GSF in München danke ich für die Zusammenarbeit und Hilfe bei den UV-Experimenten.

Frank Bretschneider und Dr. Joachim Kopka danke ich für die Zusammenarbeit und die Durchführung der GC-MS Analysen.

Anja Henning danke ich ganz herzlich für die großartige technische Unterstützung der Arbeit. Insbesondere vielen Dank für die Hilfe bei der aufwändigen Samenernte.

Ich danke allen Mitarbeitern der ehemaligen Abteilung Sekundärstoffwechsel sowie den gesamten Mitarbeitern des Leibniz-Institutes für Pflanzenbiochemie für die freundliche und angenehme Zusammenarbeit.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner gesamten Familie bedanken, insbesondere bei meinem Mann Stefan, ohne deren und seine Unterstützung die Fertigstellung der Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Publikationen und Tagungsbeiträge

Publikationen in Fachzeitschriften

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

Vorträge

Wolfram K., Bretschneider F., Böttcher C., von Röpenack-Lahaye E., Neumann S., Strack D. (2008). Metabolite Profiling of *Brassica napus* seeds by Mass Spectrometry. *6th Kurt-Mothes Workshop*, Jena, Deutschland.

Wolfram K., Böttcher C., Bretschneider F., Frolov A., von Röpenack-Lahaye E., Neumann S., Strack D. (2009). Metabolite profiling of low-sinapine *Brassica napus* seeds. *5th Plant Science Student Conference*, Halle (Saale), Deutschland.

Poster

Wolfram, K., Bretschneider, F., Schliemann, W., Neumann, S., Strack, D. (2007). Metabolite Profiling of *Brassica napus* seeds. *German Conference on Bioinformatics*, Postdam, Deutschland.

Wolfram K., Böttcher C., Bretschneider F., Frolov A., von Röpenack-Lahaye E., Strack D. (2009). Metabolite profiling of low-sinapine *Brassica napus* seeds by LC and GC-MS. *18th International Mass Spectrometry Conference*, Bremen, Deutschland.

Frolov A., Wolfram K., Henning A., Böttcher C., von Röpenack-Lahaye E., Strack D. (2009). Analysis of cell wall-bound phenolic compounds in the seeds of oilseed rape. *18th International Mass Spectrometry Conference*, Bremen, Deutschland.

Wolfram K., Mittasch J., Frolov A., von Röpenack-Lahaye E., Böttcher C., Bretschneider F., Milkowski C., Strack D. (2009). Reducing sinapate esters in the seeds of *Brassica napus*. *Botanists Meeting*, Leipzig, Deutschland.

Wolfram K., Frolov A., Böttcher C., von Röpenack-Lahaye E., Strack D. (2010). Tandem mass spectrometry-based targeted metabolomics of low-sinapine *Brassica napus* seeds. *43. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie*, Halle (Saale), Deutschland.

Frolov A., Wolfram K., Henning A., Böttcher C., von Röpenack-Lahaye E., Strack D. (2010). Quantification and identification of phenolic compounds in cell walls of *Brassica napus* seeds. *43. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie*, Halle (Saale), Deutschland.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Karina Hettwer, geb. Wolfram
Anschrift: Müllerbrunnenstr. 2
01187 Dresden
Geburtsdatum: 24.11.1981
Geburtsort: Bad Salzungen

Schulischer Werdegang

09/1988 – 07/1992 Polytechnische Oberschule Völkershausen
09/1992 – 07/2000 Johann-Gottfried-Seume Gymnasium Vacha
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife - Abitur

Studium und Beruflicher Werdegang

10/2000 – 05/2006 Studium „Bioinformatik“ an der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg, Abschluss: Diplom
07/2006 – 08/2010 Promotionsstelle am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie
in Halle (Saale), Abteilung Sekundärstoffwechsel
seit 09/2010 Wissenschaftliche Mitarbeiterin, QuoData GmbH –
Gesellschaft für Qualitätsmanagement und Statistik mbH,
Dresden

Eidesstattliche Versicherung

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

Dresden, 25.01.2012

Karina Hettwer