

**Charakterisierung der Funktion von
Branched-Chain Aminotransferasen und Isopropylmalat
Isomerasen im Primär- und/oder Sekundärmetabolismus in
*Arabidopsis thaliana***

Dissertation

**zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.
der Fakultät für Naturwissenschaften der Universität Ulm**

**vorgelegt von
Tanja Knill
aus Ulm**

2008

Amtierender Dekan der Fakultät für Naturwissenschaften:

Prof. Dr. K.-D. Spindler

Erstgutachter:

Prof. Dr. S. Binder, Institut Molekulare Botanik

Zweitgutachter:

Datum der Promotion:

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	S. 5
1.1 Die Biosynthese verzweigtkettiger Aminosäuren in <i>Arabidopsis thaliana</i>	S. 5
1.2 Biosynthese Methionin-abgeleiteter Glucosinolate in <i>Arabidopsis thaliana</i>	S. 7
1.3 Die Familie der Branched-Chain Aminotransferasen in <i>Arabidopsis thaliana</i>	S. 9
1.4 Isomerasereaktionen in der Biosynthese verzweigtkettiger Aminosäuren und dem Kettenverlängerungszyklus von Glucosinolaten	S. 11
1.5 Zielsetzung der Dissertation	S. 12
2. Material	S. 14
2.1 Bakterienstämme	S. 14
2.2 Pflanzenlinien	S. 14
2.3 Oligonukleotide	S. 15
2.4 Antikörper	S. 15
2.5 Lösungen und Puffer	S. 16
2.5.1 Puffer zur Herstellung pflanzlicher Proteinextrakte	S. 16
2.5.2 Lösungen zur Herstellung und Aufreinigung rekombinanter pflanzlicher Proteine	S. 16
2.5.3 Lösungen zur Bestimmung freier Aminosäuren in <i>Arabidopsis thaliana</i>	S. 17
3. Methoden	S. 18
3.1 Herstellung pflanzlicher Proteinextrakte	S. 18
3.1.1 Extraktion löslicher Proteine aus <i>Arabidopsis</i> Keimlingen und Blättern	S. 18
3.1.2 Isolierung von Cytosolextrakten mittels Zellfraktionierung	S. 18
3.2 Herstellung und Aufreinigung rekombinanter pflanzlicher Proteine	S. 19
3.2.1 Überexpression eines rekombinanten Proteins in <i>E. coli</i>	S. 20
3.2.2 Affinitäts-Aufreinigung eines rekombinanten <i>Arabidopsis</i> -Proteins	S. 20
3.3 <i>In vitro</i> -Aminotransferase-Aktivitätstests	S. 22

3.3.1 Photometrischer Branched-Chain Aminotransferase-Test zur Untersuchung der Aminierungsaktivität	S. 22
3.3.2 HPLC-unterstützter Enzymtest zur Deaminierungsaktivität	S. 24
3.4 Fütterungsversuche mit verschiedenen Aminosäuren	S. 27
3.5 Bestimmung und Quantifizierung freier Aminosäuren in <i>Arabidopsis thaliana</i>	S. 28
3.5.1 Aufschluss pflanzlicher Gewebe für die Aminosäure-Analyse	S. 28
3.5.2 Qualitative und quantitative Bestimmung freier Aminosäuren mittels High-Performance-Liquid-Chromatographie (HPLC)	S. 29
3.6 Bestimmung und Quantifizierung der aliphatischen Glucosinolate in <i>Arabidopsis thaliana</i>	S. 32
4. Ergebnisse	S. 34
4.1 Untersuchungen zur Branched-Chain Aminotransferase 4 aus <i>A. thaliana</i>	S. 34
4.1.1 Aktivität von AtBCAT4 mit verschiedenen Aminosäuren	S. 35
4.1.2 AtBCAT4 zeigt in den Deaminierungskinetiken große Affinität zu Methionin	S. 37
4.1.3 Subzelluläre Lokalisierung der Branched-Chain Aminotransferase 4 in einem Zellfraktionierungsexperiment	S. 41
4.1.4 Fraßversuch mit <i>Spodoptera</i> -Raupen an AtBCAT4-Knock-Out-Pflanzen	S. 43
4.2. Charakterisierung der Branched-Chain Aminotransferase 3 aus <i>A. thaliana</i>	S. 47
4.2.1 <i>In vitro</i> -Analysen zur Substratspezifität des rekombinanten AtBCAT3-Proteins	S. 48
4.2.2 Etablierung und Molekulargenetische Charakterisierung einer AtBCAT3-T-DNA-Insertionslinie für <i>in vivo</i> -Untersuchungen	S. 52
4.2.3 Die Metabolit-Analyse der AtBCAT3-Knock-Out-Linie zeigt eine Beteiligung im Primär- und Sekundärmetabolismus	S. 54
4.3 Untersuchung einer AtBCAT3/AtBCAT4-Doppel-Knock-Out-Mutante	S. 57
4.3.1 Etablierung und Charakterisierung einer homozygoten AtBCAT3/AtBCAT4-Doppel- Knock-Out-Mutante	S. 58
4.3.2 Metabolit-Analyse der Doppel-Knock-Out-Mutante	S. 58
4.4 Fütterungsversuche an verschiedenen AtBCAT-Knock-Out-Mutanten	S. 63
4.4.1 Aminosäure- und Glucosinolatgehalt in Blättern nach einmaliger Gabe von	

Aminosäuren	S. 63
4.4.2 Metabolit-Analysen an Blättern nach mehrmaliger Gabe von Aminosäuren	S. 66
4.4.3 Samen-Analyse auf Aminosäure- und Glucosinolatgehalt nach 4-wöchiger Applikation von Aminosäuren	S. 73
4.5 Etablierung und Charakterisierung von T-DNA-Insertionslinien für die Mitglieder der Aconitase-Genfamilie in <i>A. thaliana</i>	S. 77
4.5.1 Übersicht über die untersuchten Gene in <i>A. thaliana</i>	S. 78
4.5.2 Molekulargenetische Analyse verschiedener T-DNA-Insertionslinien	S. 80
4.5.3 Aminosäure- und Glucosinolat-Spektren der etablierten T-DNA-Insertionslinien	S. 85
5. Diskussion	S. 90
5.1 AtBCAT4 ist hauptverantwortlich für die initiale Reaktion der Methionin-Kettenverlängerung	S. 90
5.2 Kompartimentierung der Methionin-Kettenverlängerung in <i>A. thaliana</i>	S. 92
5.3 AtBCAT3 katalysiert sehr wahrscheinlich Reaminierungsreaktionen in der Methionin-Kettenverlängerung	S. 94
5.4 Der Ausfall von AtBCAT4 scheint teilweise durch AtBCAT3 kompensiert zu werden	S. 95
5.5 Die Biosynthese von Valin wird sehr wahrscheinlich durch AtBCAT3 unterstützt	S. 96
5.6 Funktionelle Bedeutung der Leucin-abgeleiteten Glucosinolate in <i>Arabidopsis thaliana</i>	S. 97
5.7 Die Biosynthese Leucin-abgeleiteter Glucosinolate	S. 98
5.8 Leucin als metabolisches Signal in <i>A. thaliana</i>	S. 100
5.9 Die Isopropylmalat Isomerasen der Aconitase-Genfamilie beinhaltet Mitglieder, die am Primär- und Sekundärstoffwechsel beteiligt sind	S. 101
5.10 Die Aconitasen in <i>Arabidopsis thaliana</i> sind vermutlich für die Isomerisierungsreaktion im Citrat-Zyklus verantwortlich	S. 104
5.11 Biotechnologische Bedeutung der Branched-Chain Aminotransferasen und Isopropylmalat Isomerasen	S. 106
6. Zusammenfassungen	S. 108

6.1 Zusammenfassung	S. 108
6.2 Summary	S.110
7. Literaturverzeichnis	S. 112
8. Anhang	S. 116
8.1 Metabolitdaten	S. 116
8.1.1 Aminosäureprofil in den Samen der <i>bcat3-1</i> Mutante	S. 117
8.1.2 Aminosäure- und Glucosinolat-Spektren der <i>aco1-1</i> Mutante	S. 117
8.1.3 Aminosäure- und Glucosinolat-Spektren der <i>aco2-1</i> Mutante	S. 119
8.1.4 Aminosäure- und Glucosinolat-Spektren der <i>aco3-1</i> Mutante	S. 121
8.1.5 Aminosäure- und Glucosinolat-Spektren der <i>aco3-2</i> Mutante	S. 123
8.1.6 Aminosäure- und Glucosinolat-Spektren der <i>aco3-3</i> Mutante	S. 125
8.1.7 Aminosäure- und Glucosinolat-Spektren der <i>aco3-4</i> Mutante	S. 127
8.1.8 Aminosäure- und Glucosinolat-Spektren der <i>ipmi ssu2-1</i> Mutante	S. 129
8.1.9 Aminosäure- und Glucosinolat-Spektren der <i>ipmi ssu3-1</i> Mutante	S. 131
8.1.10 Aminosäure- und Glucosinolat-Spektren der <i>ipmi lsu-1</i> Mutante	S. 133
8.1.11 Aminosäure- und Glucosinolat-Spektren der <i>ipmi lsu-2</i> Mutante	S. 135
8.1.12 Aminosäure- und Glucosinolat-Spektren der <i>ipmi lsu-3</i> Mutante	S. 137
8.2 Kinetiken mit rekombinanten AtBCAT3-Protein	S. 139
8.3 Aminosäuremetabolismus in höheren Pflanzen	S. 140
8.4 Abkürzungen	S. 141
8.5 Publikationsliste	S. 143
8.6 Lebenslauf	S. 145
8.7 Erklärung über die in Anspruch genommenen Hilfen	S. 146
8.8 Danksagung	S. 147

1. Einleitung

1.1 Die Biosynthese verzweigtkettiger Aminosäuren in *Arabidopsis thaliana*

Die Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin werden aufgrund ihrer kurzen, verzweigten Kohlenstoff-Reste als verzweigtkettige Aminosäuren bezeichnet. Sie sind von großem Interesse, da es sich um essentielle Aminosäuren handelt, die vom Menschen und von Tieren nicht selbst synthetisiert werden können. Die an der Biosynthese dieser Aminosäuren beteiligten Enzyme stellen zudem das Ziel wirtschaftlich relevanter Herbizide dar. Im Rahmen der Etablierung neuer Herbizid-Klassen wurde die Biosynthese von Valin, Leucin und Isoleucin bereits 1980 charakterisiert [Singh, 1999; Singh und Shaner, 1995; Wittenbach und Abell, 1999].

Ein Merkmal der Biosynthese von Valin und Isoleucin ist, dass die einzelnen Reaktionen von den gleichen Enzymen katalysiert werden, die unterschiedliche Substrate umsetzen (Abb. 1.1). Bei diesen Enzymen handelt es sich um die Acetohydroxyacid Synthase (AHAS), die Ketolacid Reductoisomerase (KARI), die Dihydroxyacid Dehydratase (DHAD) und die Branched-Chain Aminotransferase (BCAT) [Singh, 1999; Singh und Shaner, 1995]. Eine Ausnahme bildet die Threonin Deaminase (TD), die im ersten Schritt der Isoleucinbiosynthese Threonin zu α -Ketobutyrat umsetzt.

α -Ketobutyrat bzw. Pyruvat werden in drei Schritten zu den entsprechenden Ketosäuren Ketomethylvalerat bzw. Ketoisovalerat umgesetzt, die in einer letzten von Branched-Chain Aminotransferasen katalysierten Reaktion mit Glutamat als Co-Substrat zu den Aminosäuren Isoleucin bzw. Valin transaminiert werden.

Die Biosynthese von Leucin zweigt von der Valinbiosynthese ab (Abb. 1.1). Als Ausgangssubstrat dient die Ketosäure von Valin, Ketoisovalerat, die in drei Reaktionen zu Ketoisocaproat umgesetzt wird. In einer Branched-Chain Aminotransferase katalysierten Transaminierungsreaktion wird Ketoisocaproat zu Leucin umgesetzt. In diesem terminalen Schritt dient ebenfalls Glutamat als Co-Substrat.

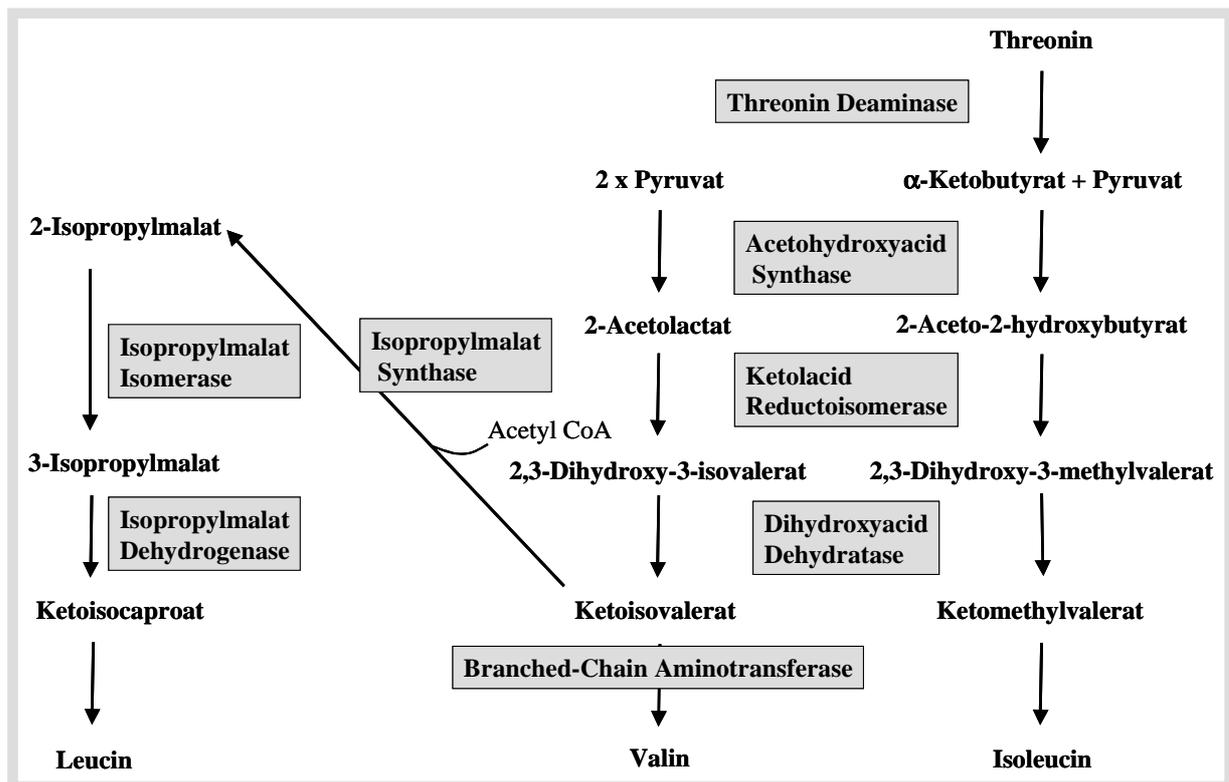


Abbildung 1.1 Darstellung der Biosynthese verzweigtkettiger Aminosäuren in höheren Pflanzen. Die Biosynthese von Valin und Isoleucin wird von den selben Enzymen katalysiert. Die Biosynthese von Leucin zweigt auf Stufe des Ketoisovalerats vom Valinsyntheseweg ab.

Die Regulation der Biosynthese verzweigtkettiger Aminosäuren erfolgt maßgeblich über Feedback-Inhibitionen. Die Akkumulation von Valin, Leucin und Isoleucin wirkt inhibierend auf die Acetohydroxyacid Synthase, so dass die Biosynthese aller verzweigtkettigen Aminosäuren verlangsamt abläuft bzw. gehemmt wird [Lee and Duggleby, 2002; Singh, 1999]. Die Anhäufung von Leucin führt zur Hemmung der Isopropylmalat Synthase und verhindert damit die weitere Produktion von Leucin. Wird Isoleucin über ein gewisses Maß hinaus angehäuft, wird die Threonin Deaminase inhibiert und somit die Isoleucinbiosynthese unterdrückt.

Die an der Biosynthese von Valin, Leucin und Isoleucin beteiligten Enzyme sind in höheren Pflanzen mit Ausnahme der Isopropylmalat Isomerasen (IPMI) und der BCAT umfangreich untersucht [Binder et al., 2007; de Kraker et al., 2007; Hagelstein et al., 1997; Singh et al., 1999]. Diese Untersuchungen weisen sehr deutlich daraufhin, dass die Biosynthese dieser Aminosäuren in den Plastiden höherer Pflanzen stattfindet. Aus Spinat-Chloroplasten wurden zwei BCAT-Enzyme isoliert, wobei eine als Valin-Aminotransferase aufgrund der hohen Affinität zu KIV bezeichnet wird und die andere Leucin/Isoleucin-Aminotransferase genannt wird, da sie die Umsetzung von KIC und KMV katalysiert [Hagelstein et al., 1997]. In

Arabidopsis thaliana gibt es sehr wahrscheinlich drei plastidäre Branched-Chain Aminotransferasen, wobei die Funktion der Einzelnen bislang unbekannt ist [Diebold et al., 2002].

1.2 Biosynthese und Abbau Methionin-abgeleiteter Glucosinolate in *Arabidopsis thaliana*

Die Glucosinolate, auch Senfölglycoside genannt, sind eine Gruppe pflanzlicher Sekundärmetabolite. Es handelt sich hierbei um schwefel- und stickstoffhaltige Verbindungen, die sich von Aminosäuren ableiten. Man findet sie fast ausschließlich in der Ordnung Capparales, die einige wichtige Nutzpflanzen innerhalb der Familie der Brassicaceae umfasst. Zu diesen zählen beispielsweise Kohl (*Brassica oleracea*), Senf (*Sinapis alba*) und Raps (*Brassica napus*), aber auch die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*.

Die mehr als 120 bekannten Glucosinolate weisen eine gemeinsame „Core“-Struktur auf. Diese chemische Struktur zeichnet sich durch eine β -D-Thioglucose-Gruppe, einen sulfonierten Aldoxim-Rest und eine variable Seitenkette aus. Die Glucosinolate werden grundsätzlich in aliphatische, aromatische und indolische Glucosinolate eingeteilt [Wittstock und Halkier, 2002]. Die Einteilung ist abhängig von den Ausgangsaminosäuren von denen sie sich ableiten. Dabei werden die aliphatischen Glucosinolate von Methionin, Alanin, Valin, Leucin und Isoleucin, die aromatischen Glucosinolate von Tyrosin und Phenylalanin und die indolischen Glucosinolate von Tryptophan abgeleitet.

Die Glucosinolatbiosynthese setzt sich grundsätzlich aus drei unabhängigen Phasen zusammen. Im ersten Schritt wird die Ausgangsaminosäure in der sogenannten Kettenverlängerung durch eine oder mehrere Methylengruppen verlängert. Die verlängerten Aminosäuren werden im zweiten Abschnitt in mehreren Reaktionen in Thiohydroximinsäuren überführt und ein Glucose- und Sulfatrest angehängt. Diese Glucosinolate werden in der dritten Phase sekundär modifiziert [Wittenbach and Abell, 1999].

In der Abbildung 1.2 ist die Methionin-Kettenverlängerung ausgehend von Methionin dargestellt, da sich die wichtigsten aliphatischen Glucosinolate von dieser Aminosäure ableiten und sie im Focus dieser Arbeit stehen. Die Methionin-Kettenverlängerung beginnt mit einer initialen Transaminierung, in der Methionin zu α -Ketomethylthiobutyrat (MTOB) deaminiert wird. MTOB wird anschließend in einer Kondensationsreaktion dehydriert und mit Acetyl-CoA verknüpft. Nach einer Isomerisierung und einer oxidativen Decarboxylierung

entsteht α -Ketomethylthiopentanoat (MTOB), das entweder in einer Transaminierung zu Homomethionin reaminiert wird, oder aber in weiteren Zyklen um eine oder mehrere Methylengruppen verlängert wird. Aus Homomethionin bzw. den weiter verlängerten Methionin-Derivaten werden in den nachfolgenden Biosyntheseschritten Glucosinolate gebildet.

Mit Ausnahme der an der Kondensationsreaktion beteiligten Methylthioalkylmalat Synthasen (MAM) sind die Enzyme der Methionin-Kettenverlängerung noch nicht näher untersucht. In *Arabidopsis* wurden die zwei MAM-Enzyme, MAM1 und MAM3 identifiziert, die sich aufgrund ihrer Substratspezifität unterscheiden [Textor et al., 2004; Textor et al., 2007]. Während MAM1 lediglich die Kondensationsreaktion von MTOB und MTOB im ersten und zweiten Durchgang der Methionin-Kettenverlängerung katalysiert, akzeptiert MAM3 auch alle länger-kettigen Ketosäuren und ist somit ebenfalls an den weiteren Durchgängen der Methionin-Verlängerung beteiligt.

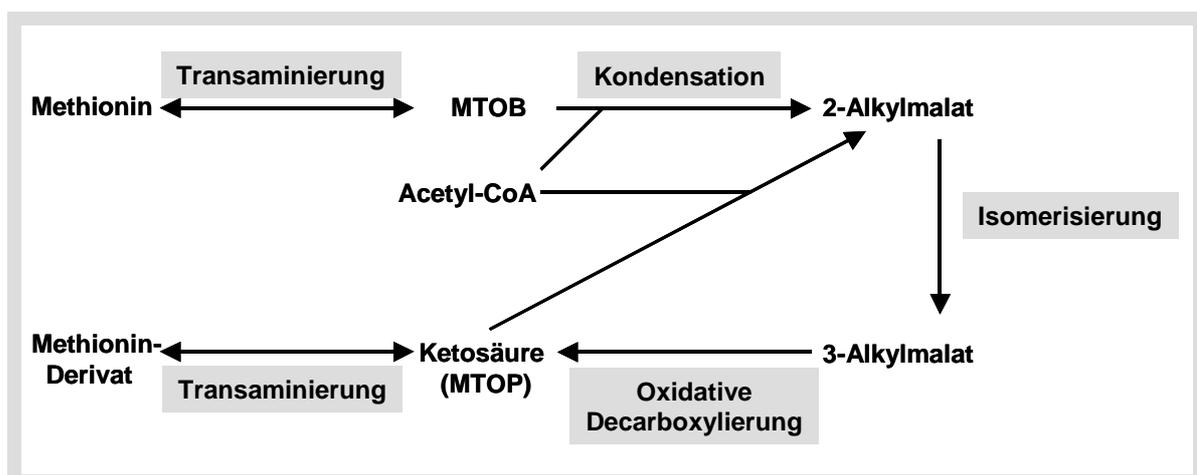


Abbildung 1.2 Methionin-Kettenverlängerung in der Biosynthese Methionin-abgeleiteter Glucosinolate

Der Abbau der Glucosinolate ist von großer Bedeutung, da die Abbauprodukte dieser Sekundärmetabolite die eigentlich biologisch aktiven Substanzen darstellen. Die Degradation der Glucosinolate erfolgt durch Hydrolyse der Schwefel-Glucose-Bindung des Thioglucose-Rests (siehe Abb. 1.3). Diese Reaktion wird von der β -Thioglucosidase Myrosinase katalysiert, die im Pflanzengewebe von Glucosinolaten räumlich getrennt ist. In *Arabidopsis thaliana* scheinen die Glucosinolate unter anderem in sogenannten S-Zellen (schwefelreiche Zellen), die sich zwischen Phloem und Endodermis befinden, gespeichert zu werden [Koroleva et al., 2000]. Die Myrosinase hingegen wird in speziellen Myrosinzellen gespeichert, die im an die Endodermis angrenzenden Kortexgewebe verstreut vorliegen. Wird das Pflanzengewebe beispielsweise durch Insektenfraß verwundet, kommen die Glucosinolate

mit der Myrosinase in Berührung und werden zu einer Vielzahl von Stoffen hydrolysiert. Den größten Anteil an diesen Produkten haben Isothiocyanate, Thiocyanate und Nitrile [Smith et al., 2003; Wittstock and Halkier, 2002]. Diese Spaltprodukte scheinen dem Schutz gegen den Befall von Herbivoren und Pathogenen zu dienen. Zudem haben diese sowohl toxische als auch protektive (z.B. Krebsvorbeugende) Wirkungen bei höheren Tieren und Menschen [Wittstock and Halkier, 2002]. Epidemiologische Studien ergaben, dass eine erhöhte Aufnahme der Isothiocyanate, Sulphoraphan und Indol-3-Carbinol zu einer Reduktion des Krebsrisikos führt [Keck and Finley, 2004]. Ihre Wirkungsweise besteht in der Aktivierung von „Phase II-Detoxifikations-Enzymen“, die zur Metabolisierung der Xenobiotika beitragen. Außerdem scheinen sie den Zellzyklus von Krebszellen zu unterbrechen und die Apoptosis zu induzieren, was zu einem verminderten Tumorwachstum führt [Keck and Finley, 2004].

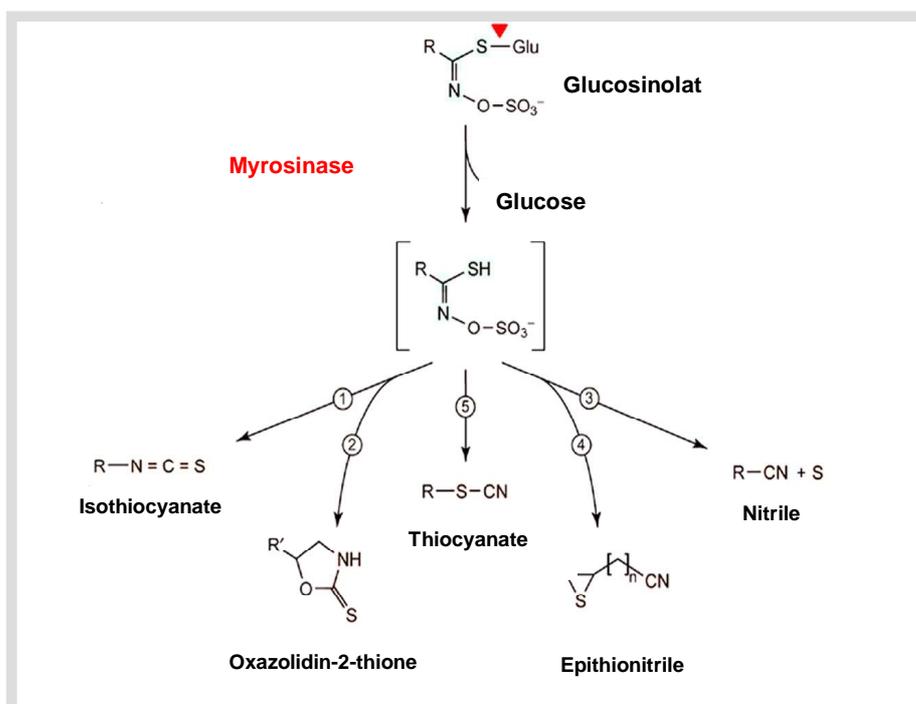


Abbildung 1.3 Abbau der Glucosinolate durch die β -Thioglucosidase Myrosinase [verändert nach Wittstock and Halkier, 2002]. Die Glucosinolate werden durch Spaltung der Schwefel-Glucose-Bindung hydrolysiert.

1.3 Die Familie der Branched-Chain Aminotransferasen in *Arabidopsis thaliana*

Branched-Chain Aminotransferasen (BCAT) (EC 2.6.1.42) sind sowohl an der Biosynthese, wie auch am Abbau verzweigt-kettiger Aminosäuren beteiligt. So katalysiert das Enzym den jeweils letzten Schritt im Aufbau, sowie die initiale Transaminierungsreaktion im Abbau der

verzweigt-kettigen Aminosäuren. Es handelt sich hierbei um eine Pyridoxal-5-Phosphat (PLP)-abhängige Aminotransferase, die zur Entfaltung ihrer vollen Aktivität den Co-Faktor PLP benötigt. Dieser geht hierfür eine kovalente Bindung mit dem Lysin-Rest im aktiven Zentrum des Enzyms ein [Mehta und Christen, 2000].

In *Arabidopsis thaliana* sind die Branched-Chain Aminotransferasen in einer Genfamilie codiert, die sieben Gene (*AtBCAT1-7*) umfasst. Sechs Mitglieder dieser Genfamilie (*AtBCAT1-6*) werden transkribiert. Bei *AtBCAT7* handelt es sich vermutlich um ein Pseudogen. Umfangreiche Untersuchungen zur Expression der *BCAT*-Gene in *A. thaliana* ergaben, dass die einzelnen Vertreter sehr unterschiedlich in den untersuchten Geweben und Entwicklungsstadien exprimiert sind [Schuster et al., 2005; Schuster et al., 2006]. Verschiedene Experimente zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation der *AtBCATs* zeigten, dass die *BCAT*-Proteine in unterschiedlichen Kompartimenten lokalisiert sind [Diebold et al., 2002; Schuster et al., 2006; Knill et al., 2008]. *AtBCAT1* scheint demnach als einziges Mitglied der Genfamilie in den Mitochondrien lokalisiert zu sein. Für die drei weiteren Mitglieder, *AtBCAT2*, -3 und -5 ergab sich eine plastidäre Lokalisation. *AtBCAT4* und *AtBCAT6* scheinen im Cytosol zu verbleiben und nicht in Organellen transportiert zu werden. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Lokalisierung und sehr unterschiedlicher Expressionsmuster scheinen die *BCATs* an verschiedenen Stoffwechselwegen beteiligt zu sein. Der mitochondriale Vertreter *AtBCAT1* ist dabei ein Kandidat für den Leucin-Abbau, da dieser Stoffwechselweg sehr wahrscheinlich in den Mitochondrien stattfindet. Erste Hinweise dafür wurden durch die Charakterisierung einer *bcat1-1* Mutante gefunden [Schuster und Binder, 2005]. Für die plastidär lokalisierten Vertreter liegt es nahe, dass sie an der Biosynthese verzweigt-kettiger Aminosäuren mitwirken, da dieser Stoffwechselweg in den Plastiden abläuft [Hagelstein et al., 1997]. Das cytosolische *AtBCAT4* zeigt ein verändertes Substratspektrum verglichen mit den anderen Aminotransferasen der Genfamilie [Diebold et al., 2002; Schuster et al., 2006]. Untersuchungen von *AtBCAT4*-Knock-Out-Mutanten sprechen dafür, dass *AtBCAT4* an der Biosynthese Methionin-abgeleiteter Glucosinolate beteiligt ist [Schuster et al., 2006]. Die exakte Funktion von *AtBCAT4* in der Methionin-Kettenverlängerung ist hierbei unklar. Die Funktion des zweiten cytosolischen Mitglieds der *BCAT*-Familie, *AtBCAT6* ist bislang unbekannt.

1.4 Isomerisierungsreaktionen in der Biosynthese verzweigtkettiger Aminosäuren und dem Kettenverlängerungszyklus von Glucosinolaten

Eine zweite Genfamilie ist für diese Arbeit von besonderer Bedeutung, die Genfamilie der Aconitasen. Aus Untersuchungen in Bakterien ist bekannt, dass Isomerisierungsreaktionen in verschiedenen Stoffwechselwegen vorkommen. In dem in den Mitochondrien stattfindenden Citrat-Zyklus ist eine Isomerisierungsreaktion enthalten, in der Citrat zu Iso-Citrat umgesetzt wird. Bei der Gewinnung von Oxalacetat im Glyoxylat-Zyklus findet ebenfalls die Umsetzung von Citrat zu Iso-Citrat statt. Die Isomerisierungsreaktion im Glyoxylat-Zyklus findet im Cytoplasma statt, während alle weiteren Schritte in den Glyoxysomen ablaufen. In beiden Stoffwechselwegen ist hierfür die Beteiligung einer Aconitase nötig. Diese Enzyme wurden in höheren Pflanzen bislang wenig untersucht. Zudem ist die zweite Reaktion in der Leucinbiosynthese eine Isomerisierung, in der 2-Isopropylmalat zu 3-Isopropylmalat umgesetzt wird. Die Leucinbiosynthese ist in den Plastiden höherer Pflanzen lokalisiert. In diesem Kompartiment wird auch die Methionin-Kettenverlängerung der Glucosinolatbiosynthese vermutet, die ebenfalls eine Isomerisierungsreaktion beinhaltet. In dieser Reaktion wird 2-Alkylmalat zu 3-Alkylmalat umgewandelt. Auch in diesen beiden Stoffwechselwegen ist die Isomerisierungsreaktion in höheren Pflanzen bisher wenig untersucht. In Bakterien wird die Isomerisierungsreaktion der Leucinbiosynthese von Isopropylmalat Isomerasen katalysiert. Die bakteriellen Isopropylmalat Isomerasen stellen Heterodimere dar und weisen eine große Ähnlichkeit zu den bakteriellen Aconitasen auf. Erste Untersuchungen zur Leucinbiosynthese und Methionin-Kettenverlängerung der Glucosinolatbiosynthese in höheren Pflanzen weisen daraufhin, dass diese Stoffwechselwege einen vermutlich einen gemeinsamen Vorläufer haben [Binder et al., 2007]. So umfasst die Familie der Isopropylmalat Synthasen in *Arabidopsis thaliana* Proteine, die an der Kondensationsreaktion im Methionin-Kettenverlängerungszyklus beteiligt sind (Methylthioalkylmalat-Synthase1 und -3), sowie die zwei Isopropylmalat Synthasen (IPMS1 und IPMS2), die die Kondensationsreaktion in der Leucinbiosynthese katalysieren [de Kraker et al., 2007; Textor et al., 2004; Textor et al., 2007]. Interessant ist nun, ob die Isopropylmalat Isomerasen der Leucinbiosynthese und der Methionin-Kettenverlängerung ebenfalls in einer Proteinfamilie organisiert sind.

1.5 Zielsetzung der Dissertation

In Vorarbeiten zu dieser Doktorarbeit wurde das cytosolische Mitglied der AtBCAT-Familie, AtBCAT4 näher charakterisiert. In ersten *in vitro*-Enzymaktivitätstest wurde das besondere Substratspektrum dieser Aminotransferase beobachtet. Im Gegensatz zu den anderen AtBCAT-Vertretern setzt AtBCAT4 lediglich Leucin und die entsprechende Ketosäure, Ketoisocaproat um. Zudem wurde gezeigt, dass AtBCAT4 Substrate aus dem Kettenverlängerungszyklus Methionin-abgeleiteter Glucosinolate akzeptiert. Die Umsetzung dieser Verbindungen und die 50 %-ige Reduktion im Gehalt Methionin-abgeleiteter Glucosinolate in zwei unabhängigen AtBCAT4-Knock-Out-Mutanten deuteten auf eine Beteiligung von AtBCAT4 an der Biosynthese dieser Sekundärmetabolite hin. Mit Hilfe von *in vitro*-Aktivitätstest sollen nun Deaminierungskinetiken mit Methionin und Leucin durchgeführt werden, um Aussagen über die Affinität der Aminotransferase zu diesen Substraten treffen zu können. Um herauszufinden, in welchem Kompartiment der Pflanzenzelle die Funktion von AtBCAT4 eine wichtige Rolle spielt, soll die subzelluläre Lokalisation in *Arabidopsis thaliana* in einem weiteren Experiment untersucht werden. Hierfür soll ein Zellfraktionierungsexperiment mit anschließender Immunodetektion durchgeführt werden. Die *in vitro*-Enzymtests und die genaue Lokalisierung sollen dabei helfen die Bedeutung und die Funktion von AtBCAT4 genauer zu bestimmen.

Zudem soll die Funktion eines weiteren Mitglieds der AtBCAT-Familie näher charakterisiert werden. Das plastidäre AtBCAT3 zeigte in ersten *in vitro*-Aktivitätstests, dass es sowohl Substrate aus der Biosynthese verzweigtkettiger Aminosäuren, als auch Substrate aus dem Kettenverlängerungszyklus der Glucosinolatbiosynthese umsetzt. In Aminierungskinetiken mit den Ketosäuren der verzweigtkettigen Aminosäuren und mit Ketomethylthiobutyrate soll die Affinität von AtBCAT3 zu den unterschiedlichen Substraten bestimmt werden. Die bevorzugte Umsetzung eines Substrats liefert Hinweise an welchem Stoffwechselweg AtBCAT3 maßgeblich beteiligt sein könnte. Um die Funktion dieser Aminotransferase ebenfalls *in vivo* zu untersuchen, soll eine entsprechende T-DNA-Insertionsmutante etabliert und molekulargenetisch charakterisiert werden. Die Metabolit-Analyse dieser Mutante soll weitere Aufschlüsse über die Bedeutung von AtBCAT3 im Primär- und/oder im Sekundärstoffwechsel liefern. Die Etablierung einer AtBCAT3/AtBCAT4-Doppel-Knock-Out-Mutante und anschließende Metabolit-Analyse sollen zudem weitere Hinweise zur Funktion von AtBCAT3 und AtBCAT4 liefern.

Zudem sollen in Gießversuchen die Auswirkungen eines Überschuss an verzweigtkettigen Aminosäuren auf das Metabolit-Spektrum beobachtet werden. Die biotechnologische Relevanz der Glucosinolate soll in einem Fraßversuch mit *Spodoptera littoralis* Raupen untersucht werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Identifizierung der Aconitasen, die an der Isomerisierungsreaktion im Kettenverlängerungszyklus der Glucosinolatbiosynthese und/oder in der Leucinbiosynthese beteiligt sind. Diese Enzyme sind bislang in *Arabidopsis thaliana* nicht näher untersucht. Metabolit-Analysen von Mutanten potentieller Kandidatengene sollen zur Identifizierung dieser Isopropylmalat Isomerasen dienen.

2. Material

2.1 Bakterienstämme

Escherichia coli DH5 α (Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland)

Escherichia coli AD494(DE3)pLys (Novagen, Madison, USA)

Agrobacterium tumefaciens GV2260 (Deblaere et al., 1985)

2.2 Pflanzenlinien

Die Pflanzen werden generell bei 21 °C, 50 % Luftfeuchte und einer Lichtintensität von 200 μ E in einer Klimakammer (Fa. Vötsch) unter Langtag-Bedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkel) auf Erde angezogen.

Nachfolgend sind die verwendeten Pflanzenlinien aufgeführt:

Nicotiana tabacum Var. Pet. Havana

Arabidopsis thaliana, Ökotyp Columbia (Lehle Seeds, Round Rock, USA)

AtBCAT3 T-DNA-Insertionsmutante: GABI Kat 002A11 (*bcat3-1*)

AtBCAT4 T-DNA-Insertionsmutanten: SALK 013627 (*bcat4-1*) und GABI Kat 163D11
(*bcat4-2*)

AtBCAT3/AtBCAT4-Doppel-Knock-Out-Mutante: Kreuzung aus GABI Kat 002A11 und
GABI Kat 163D11

Isopropylmalat-Isomerase kleine Untereinheit (At2g43090) T-DNA Insertionsmutanten:
SALK 115589 (*ipmi ssu1-1*) und SALK 111666 (*ipmi ssu1-2*)

Isopropylmalat-Isomerase kleine Untereinheit (At2g43100) T-DNA-Insertionsmutante:
SALK 048320 (*ipmi ssu2*)

Isopropylmalat-Isomerase kleine Untereinheit (At3g58990) T-DNA-Insertionsmutante:
Flag_149F10 (*ipmi ssu3-1*)

Isopropylmalat-Isomerase große Untereinheit T-DNA-Insertionsmutanten: SALK 029510
(*ipmi lsu-1*); SAIL 369G04 (*ipmi lsu-2*); GABI Kat 452D03 (*ipmi lsu-3*)

Aconitase 1 T-DNA-Insertionsmutante: SALK 026148 (*aco1-1*)

Aconitase 2 T-DNA-Insertionsmutante: SALK 014661 (*aco2-1*)

Aconitase 3 T-DNA-Insertionsmutante: SALK 009537 (*aco3-1*) ; SALK 054196 (*aco3-2*);
SALK 031352 (*aco3-3*); SALK 037286 (*aco3-4*)

Die SALK Mutanten wurden vom „The Salk Institute for Biological Studies“ (San Diego, Kalifornien, USA), die GABI Kat Mutanten von GABI Kat (Universität Bielefeld, Deutschland), die FLAG Mutanten von INRA (Versailles, Frankreich) und die SAIL Mutanten von Syngenta (Arabidopsis Insertion Library, Deutschland) bezogen.

2.3 Oligonukleotide

bcat3ue.BamHI	5`-taggacctgcaacgctgtttcgtcc-3`	RT-PCR
3314.2	5`-attccgttctccacctg-3`	RT-PCR
UBQ10.H	5`-gatctttgccggaaaacaattg-3`	RT-PCR
UBQ10.R	5`-cgacttgcattagaaagaagag-3`	RT-PCR
bcat3N.1	5`-gagagaagcctccgtctcc-3`	Northern Blot-Analyse
bcat3N.2	5`-ggaagaagaatgctgaagc-3`	Northern Blot-Analyse
At4g13430.GFP.H	5`-gctgatcacgaagaagaagacg-3`	Quantitative RT-PCR
At4g13430.GFP.R	5`-gctgatcaactgcaagaactccttg-3`	Quantitative RT-PCR
β -tub2.H	5`-gactgtctccaaggggtccagg-3`	Quantitative RT-PCR
β -tub2.R	5`-gtactgctgagaaccttgagg-3`	Quantitative RT-PCR
DTXSC	5`-gactcgagtcgacatcgatttttttttttt-3`	Quantitative RT-PCR
Ipi.GFP.H	5`-attctagaacaatggcgtattctc-3`	Subzelluläre Lokalisation von IPMI SSU (At2g43100)
Ipi.GFP.R	5`-taccgggagctaatgatggaatc-3`	Subzelluläre Lokalisation von IPMI SSU (At2g43100)

2.4 Antikörper

AtBCAT4-Peptid-Antikörper (erkennt C-terminales Dodecanpeptid des pflanzlichen Proteins; Pineda, Berlin, Deutschland)

UDP-Glucose-pyrrophosphorylase (UGPase) Antikörper (Agrisera, Schweden)

Ferredoxin-NADP⁺-Reduktase (FNR) Antikörper (A. Sokolenko, Universität München, Deutschland)

Porin-Antikörper (H.P. Braun, Universität Hannover, Deutschland)

2.5 Lösungen und Puffer

2.5.1 Puffer zur Herstellung pflanzlicher Proteinextrakte

Cellulase und Mazerozym (10 ml)

1 g Cellulase/Mazerozym

1,37 g Saccharose

Die Lösungen werden für 5 bis 10 min bei 4800 U/min und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird sterilfiltriert (0,2 µm) und bei -20 °C gelagert.

MMC Medium (400 ml)

CaCl₂·2H₂O 588 mg

MES 780 mg

Mannitol 35 g

Die Mannitol-Zugabe dient der Einstellung der Osmolarität von 550 mOsm. Der pH-Wert wird auf 5,8 mit einer 1 M NaOH Lösung eingestellt. Die Lösung wird anschließend autoklaviert.

Puffer B

0,4 M Mannit

50 mM Tris-HCl pH 7,5

3 mM EDTA

Nach dem Autoklavieren Zugabe von 2 mM DTT und 0,1 % BSA (beide sterilfiltriert).

2.5.2 Lösungen zur Herstellung und Aufreinigung rekombinanter pflanzlicher Proteine

Aufreinigungspuffer

200 mM Tris-Puffer (pH 7,4)

1,5 M NaCl

1 % (v/v) Triton X-100

S-Protein-Aufreinigungs-Kit (Novagen, Madison, USA)

In dem Kit sind folgende Lösungen enthalten:

S-Protein-Agarose-Lösung (lösen durch vorsichtiges Invertieren; mit abgeschnittener Spitze pipettieren)

Ekapture-Agarose (lösen durch vorsichtiges Invertieren; mit abgeschnittener Spitze pipettieren)

Rekombinante Enterokinase

10x Rekombinante Enterokinase-Puffer

200 mM Tris-HCl (pH 7,4)

500 mM NaCl

20 mM CaCl₂

2.5.3 Lösungen zur Bestimmung freier Aminosäuren in *Arabidopsis thaliana*

Kaliumborat Puffer

0,5 M Borsäure

pH 11 mit 5 M KOH einstellen

der Puffer wird filtriert und entgast

Eluent A

0,02 M Natriumcitrat-Puffer pH 5,5

0,02 % (w/v) Natriumazid

die Lösung wird filtriert und entgast

Eluent B

Methanol:Acetonitril 65:35 (HPLC gradient grade; Carl Roth GmbH & Co.,
Karlsruhe, Deutschland)

3. Methoden

3.1 Herstellung pflanzlicher Proteinextrakte

3.1.1 Extraktion löslicher Proteine aus *Arabidopsis* Keimlingen und Blättern

Zur Herstellung von Gesamtlysaten löslicher Proteine aus *Arabidopsis* Pflanzen werden zunächst Keimlinge bzw. Rosettenblätter geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Etwa 1-2 g Pflanzenmaterial werden dann mit Mörser und Pistill zerkleinert, um die Zellen aufzuschließen. Das Pulver wird unverzüglich in 8-12 ml 100 mM Tris-HCl Puffer (pH 8,0) aufgenommen, ohne dass das Pflanzenmaterial auftaut. Dabei ist wichtig, dass ausreichend Puffer verwendet wird, um das gesamte Pflanzenmaterial anzufeuchten. Die anschließende Zentrifugation bei 12.000 x g und 4°C für 10 min dient zur Trennung der löslichen Bestandteile von den unlöslichen. Ohne das Pellet zu zerstören, wird der klare Überstand in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Der Zentrifugationsschritt wird einmal wiederholt, um die restlichen Pflanzenpartikel zu pelletieren. Der Überstand wird mittels Amicon Ultra Röhrchen (10 kD; Millipore) eingeeengt, so dass im Lysat Proteine mit einer Größe von mehr als 10 kD vorliegen. Die Ausbeute beträgt bei einem Einsatz von 1-2 g Pflanzenmaterial 1,6-2,5 mg Protein.

3.1.2 Isolierung von Cytosolextrakten mittels Zellfraktionierung

Die nachfolgend beschriebene Methode geht auf Sakamoto et al. (2000) und Doyzhenko et al. (2003) zurück. Sie beinhaltet die Präparation von *Arabidopsis* Protoplasten aus Blattmaterial und die Isolierung der Cytosolfraktion aus Protoplasten mittels differentieller Zentrifugation. Die für die Protoplastierung benötigten *Arabidopsis* Pflanzen werden auf Erde bei 21°C unter Langtag Bedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkel) in einer Klimakammer angezogen. Die genauen Anzuchtbedingungen sind im Detail unter 2.2 Material aufgeführt. Zur Protoplastierung wurden Rosettenblätter von 13 bis 21 Tage alten *Arabidopsis* Pflanzen verwendet.

Durch einen Verdau der Zellwand werden die Protoplasten gewonnen. Hierfür wird das Blattmaterial mit der Cellulase und Pectinase inkubiert. Um das Material für die Enzyme zugänglicher zu machen, werden die *Arabidopsis* Blätter in ca. 1 mm breite Stücke geschnitten. Sie werden mit der Blattunterseite in 9 ml MMC Medium (siehe Material 2.5.1)

gelegt und jeweils 500 µl der Cellulase- sowie Macerozymlösung (siehe Material 2.5.1) zugegeben. Der Verdau findet nun für 12-16 h bei Raumtemperatur im Dunkeln statt. Zur Abtrennung von größeren Blattbestandteilen filtrierte man den Ansatz durch einen Metallfilter mit einer Porengröße von 100 µm. Durch Zentrifugation bei 100 x g und Raumtemperatur für 10 min werden die Protoplasten pelletiert. Die Protoplasten werden in 2 ml Puffer B (siehe Material 2.5.1) resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert, um diese aufzuschließen. Die Trennung des Cytosols von den Zellorganellen erfolgt mittels differentieller Zentrifugation. Dabei führt der erste Zentrifugationsschritt (bei 100 x g und Raumtemperatur für 5 min) zur Abtrennung der Zelltrümmer und Zellkerne. Der Überstand wird abgenommen und bei 2.000 x g und Raumtemperatur für 10 min zentrifugiert. Das im zweiten Schritt entstehende Pellet enthält die Chloroplasten. Wieder wird der Überstand zentrifugiert. Dieser Schritt erfolgt bei 16.000 x g und Raumtemperatur für 20 min, wodurch die Mitochondrien abgetrennt werden. Der Überstand enthält nun die gewünschte Cytosolfraktion.

3.2 Herstellung und Aufreinigung rekombinanter pflanzlicher Proteine

Für die Überexpression des AtBCAT3- und des AtBCAT4-Proteins wurde das pET-Überexpressionssystem der Firma Novagen (Madison, USA) verwendet. Die Überexpressionskonstrukte wurden mit dem pET32a-Vektor hergestellt und in den *E. coli*-Stamm AD494(DE3)pLys transformiert. Das bei der Proteinbiosynthese entstehende rekombinante Protein zeichnet sich durch einen N-terminalen „S-Tag“ (Peptid aus 15 Aminosäuren) aus, der eine spezifische Aufreinigung über Affinitätschromatographie ermöglicht. Die Aufreinigung beruht auf der spezifischen Wechselwirkung zwischen dem „S-Tag“ und der so genannten S-Protein-Agarose. Beide Komponenten leiten sich von dem Ribonuklease S Enzym ab [Kim et al., 1993]. In einer anschließenden Enterokinase-Reaktion wird der „S-Tag“ von dem rekombinanten Protein entfernt. Die Enterokinase wird durch eine so genannte Ekapture-Agarose abgefangen. Der an die S-Protein-Agarose gebundene „S-Tag“, sowie die mit der Ekapture-Agarose assoziierte Enterokinase werden zuletzt vom gewünschten Protein in einer Ausschlusschromatographie abgetrennt.

3.2.1 Überexpression eines rekombinanten Proteins in *E. coli*

Die folgende Beschreibung der Überexpression von AtBCAT-3 und AtBCAT-4 bezieht sich auf eine Hauptkultur mit einem Volumen von 1 Liter. Die *E. coli*-Kulturen werden grundsätzlich in Erlenmeyerkolben mit Schikane in LB-Medium bei 37 °C und 200 rpm hergestellt. Für die Selektion werden die Antibiotika Kanamycin, Chloramphenicol und Carbenicillin verwendet, da der verwendete *E. coli*-Stamm AD494(DE3)pLys eine chromosomale Kanamycin-Resistenz besitzt, das Helferplasmid eine Chloramphenicol-Resistenz und der pET32a-Vektor eine Carbenicillin-Resistenz vermittelt. Die Antibiotika werden dem LB-Medium in den folgenden Endkonzentrationen zugesetzt: 34 mg/l Chloramphenicol, 100 mg/l Carbenicillin, 15 mg/l Kanamycin.

Für die Überexpression stellt man zunächst eine 50 ml Vorkultur her, die mit mehreren Einzelkolonien angeimpft und etwa 16 h kultiviert wird. Diese Vorkultur wird vollständig für die Animpfung der Hauptkultur eingesetzt, die dann bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,6 inkubiert wird. Anschließend induziert man die Expression des Transgens durch die Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG) zu der Endkonzentration 1 mM. In der folgenden vierstündigen Inkubation findet die Biosynthese des rekombinanten Proteins statt.

Anschließend erfolgt die Ernte der Bakterienzellen durch Zentrifugation bei 4.500 x g und 4 °C für 7 min. Der Überstand wird abgegossen und das Bakterienpellet in 5 ml Aufreinigungspuffer (4 °C) (siehe Material 2.5.2) resuspendiert. Für alle weiteren Schritte werden die Bakterien grundsätzlich auf Eis gehalten. Die Bakterien werden mit Hilfe einer French-Press-Apparatur aufgeschlossen. Hierbei werden die Zellwände durch einen Druck von 10,3 Pa in 4 Durchgängen aufgeschlossen. Zur groben Abtrennung der Zelltrümmer vom Proteinlysat wird bei 37.500 x g und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wird dann durch einen Filter der Ausschlussgröße 0,45 µm filtriert, um größere, störende Schwebeteilchen zu entfernen. Das Filtrat wird anschließend in die Affinitäts-Aufreinigung eingesetzt.

3.2.2 Affinitäts-Aufreinigung eines rekombinanten *Arabidopsis*-Proteins

Die Aufreinigung des rekombinanten Proteins aus dem Gesamtproteinlysat erfolgt mit dem S-Protein-Aufreinigungs-Kit der Firma Novagen (Madison, USA).

Das Proteinlysat aus einer 4 x 1 Liter-Kultur wird zu gleichen Teilen auf drei Ansätze aufgeteilt und mit jeweils 1 ml S-Protein-Agarose versetzt und für 1 h bei Raumtemperatur

auf einem Schüttler (50 rpm) inkubiert. Während dieser Inkubation bindet das rekombinante Protein über seinen „S-Tag“ an die S-Protein-Agarose.

Die folgenden Angaben beziehen sich immer auf einen Ansatz. Nun zentrifugiert man den Ansatz bei 500 x g und 4 °C für 2 min, um die S-Protein-Agarose mit gebundenem rekombinanten Protein von den restlichen Proteinen abzutrennen. Der Überstand wird mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und das Agarosepellet sechs Mal mit jeweils 5 ml Aufreinigungspuffer gewaschen, um unspezifisch gebundenes Protein zu entfernen. Das Agarosepellet wird zuletzt in 700 µl 1 x Enterokinase-Puffer (siehe Material 2.5.2) aufgenommen. Dann vereinigt man die drei Ansätze und gibt 10 U rekombinante Enterokinase hinzu. In der darauffolgenden Inkubation für ca. 15 h bei 20 °C (klimatisierter Raum) auf dem Schüttler (50 rpm) wird durch die Enterokinase der „S-Tag“ von dem gewünschten rekombinanten Protein abgetrennt.

Dann wird die im nächsten Schritt notwendige Ekapture-Agarose äquilibriert. Hierzu zentrifugiert man 500 µl Ekapture-Agarose bei 1.000 x g und 4 °C für 5 min ab. Der Puffer im Überstand wird abgenommen und die Ekapture-Agarose in 5 ml 1 x Enterokinase-Puffer durch vorsichtiges invertieren resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wird das Pellet in 500 µl 1 x Enterokinase-Puffer aufgenommen und kann nun eingesetzt werden. Zur Entfernung der rekombinanten Enterokinase wird die äquilibrierte Ekapture-Agarose zugegeben und das Gemisch für 10 min bei 20 °C langsam geschüttelt (50 rpm). Das Enzym bindet nun an die Ekapture-Agarose, so dass dieser Enterokinase-Ekapture-Agarose-Komplex und der S-Tag-S-Protein-Agarose-Komplex über eine Ausschlusschromatographiesäule von dem rekombinanten Protein abgetrennt werden können. Hierzu verwendet man eine Centrex MF-5,0-Säule (0,2 µm; Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) und zentrifugiert für 5 min bei 4 °C und 500 x g. Um die Ausbeute an rekombinantem Protein zu erhöhen wird der Zentrifugationsschritt nach Zugabe von 1,2 ml Aufreinigungspuffer wiederholt. Der Durchfluss wird aufgenommen und bei einer Ausschlussgröße von 10 kDa auf ein Volumen von 100-150 µl eingengt. Das rekombinante Proteinlysate wird anschließend mit Dithiothreitol (5 mM Endkonzentration) versetzt, das dem Schutz des AtBCAT3- bzw. AtBCAT4-Proteins vor Aktivitätsverlust dient. Das rekombinante Proteinlysate wird bei 4 °C gelagert und ist 48 h aktiv.

3.3 *In vitro*-Aminotransferase-Aktivitätstests

3.3.1 Photometrischer Branched-Chain Aminotransferase-Test zur Untersuchung der Aminierungsaktivität

Bei den Branched-Chain Aminotransferasen handelt es sich um Enzyme die grundsätzlich beide Reaktionsrichtungen der reversiblen Transaminierung katalysieren können.

Zur Untersuchung der Aminierung von Ketosäuren durch die Branched-Chain Aminotransferasen wird ein photometrischer, kontinuierlicher, gekoppelter Enzymassay angewandt, der bereits 1996 von Schadewald und Adelmeyer etabliert wurde. Dieser Test beginnt mit der Aminierungsreaktion einer Ketosäure zur entsprechenden Aminosäure. Diese Reaktion wird von der Branched-Chain Aminotransferase katalysiert. Das Co-Substrat L-Glutamat dient hierbei als Aminogruppendonor und wird selbst zu α -Ketoglutarat deaminiert. α -Ketoglutarat fungiert wiederum als Co-Substrat in der anschließenden Reaktion, der Umsetzung von L-Aspartat zu Oxalacetat durch die Aspartat-Aminotransferase. Das gebildete Oxalacetat wird in einem NADH-abhängigen Schritt von der Malat-Dehydrogenase zu L-Malat umgesetzt. In dieser Reaktion wird NADH zu NAD^+ oxidiert, wobei der Verbrauch an NADH durch eine Absorptionsabnahme bei 340 nm am Photometer verfolgt werden kann. Die einzelnen Reaktionen laufen in einem 1:1 Verhältnis ab, so dass die NADH-Abnahme mit der Reaktionsgeschwindigkeit der initialen Aminierung korreliert.

Die Reaktion findet in einem 200 μl Ansatz statt, der folgende Komponenten enthält:

0,1 M Tris-Puffer (pH 8,3)

0,3 M L-Glutamat

0,05 M L-Aspartat

100 μM Pyridoxal-5-Phosphat (Co-Faktor PLP-abhängiger Aminotransferasen;
lichtempfindlich)

5 mM Dithiothreitol

0,5 U Aspartat-Aminotransferase (isoliert aus Schweine-Herzen, Sigma-Aldrich
Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

1 U Malat-Dehydrogenase (isoliert aus Schweine-Herzen , Roche Diagnostics
Co., Mannheim, Deutschland)

50 μM NADH

zu testendes Substrat und rekombinantes Protein werden in entsprechender Menge zugegeben

Die einzelnen Komponenten werden alle auf ihren pH-Wert kontrolliert und pH 7-9 eingestellt.

Die Enzymtests wurden an einem Ultrospec 3100-Photometer (von Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) mit temperiertem Küvettenhalter (37 °C) durchgeführt. Die Absorptionsmessung erfolgt bei 340 nm.

Die einzelnen Komponenten des Reaktionsansatzes werden bis auf das NADH und das rekombinante Protein auf Eis vorgelegt. Dieser Ansatz wird in eine 1 ml-Quarzküvette überführt und für 2 min im temperierten Küvettenhalter des Photometers inkubiert. Anschließend wird das NADH zugegeben und der Ansatz durch Auf- und Abpipettieren gut durchmischt. Nun wird die Absorption für 50 sec am Photometer verfolgt. In dieser Zeit darf es zu keiner Absorptionsänderung kommen. Falls dies doch der Fall sein sollte, deutet es auf eine schlechte Durchmischung des Ansatzes hin. Bleibt die Extinktion konstant, wird das Proteinlysate hinzugegeben und der Ansatz durchmischt. Nun wird die Absorptionsabnahme für 250 sec gemessen. Nach jedem Schließen des Photometerdeckels wird grundsätzlich 15 sec mit dem Fortfahren der Messung gewartet, da es aufgrund des Lichts im Küvettenraum zu Artefakten kommen kann.

Am Ende der Messung zeigt das Photometer die Extinktionsabnahme ΔE pro Minute an. Ausgehend von diesem Wert kann man die Aktivität des rekombinanten Proteins mit der nachfolgenden Formel berechnen:

$$(\Delta E * \text{Reaktionsvolumen})$$

$$\text{Aktivität} = \frac{\text{---}}{(\text{NADH-Extinktionskoeffizient} * \text{Schichtdicke} * \text{Enzymvolumen})}$$

Extinktionsabnahme	ΔE [1 / min]
Reaktionsvolumen	0,2 [ml]
Extinktionskoeffizient für NADH	6,22 [l / mmol * cm]
Schichtdicke der Küvette	1 [cm]
Volumen des Enzyms	w [ml]

Aktivität x [$\mu\text{mol} / \text{min} * \text{ml}$]

Bezieht man nun die Konzentration des Enzyms mit ein, erhält man die Spezifische Aktivität des Enzyms. Diese entspricht der Reaktionsgeschwindigkeit und ist damit ein Maß für die Aktivität des Enzyms. Hierfür wird die Konzentration des Proteinlysats photometrisch bestimmt.

$$\text{Spezifische Aktivität} = \frac{\text{Aktivität}}{\text{Konzentration des rekombinanten Proteins}}$$

Aktivität x [$\mu\text{mol} / \text{min} * \text{ml}$]
 Konzentration des rekombinanten Proteins y [mg / ml]
 Spezifische Aktivität z [$\mu\text{mol} / \text{min} * \text{mg} = \text{U} / \text{mg}$]

3.3.2 HPLC-unterstützter Enzymtest zur Deaminierungsaktivität

Die Analyse der Deaminierungsaktivität der Branched-Chain Aminotransferase erfolgt mit einem Testverfahren, das von Jones und Gilligan 1983 etabliert wurde.

Bei diesem Verfahren handelt es sich um einen diskontinuierlichen Test, da die Reaktion nach einer bestimmten Zeit gestoppt wird und der Umsatz des Co-Substrats bestimmt wird. Von diesem ausgehend kann auf den Substratumsatz des Enzyms geschlossen werden, der zur Berechnung der Enzymaktivität dient.

Der verwendete Enzymtest umfasst nur eine Reaktion, die Transaminierung der Aminosäure zur entsprechenden Ketosäure mit α -Ketoglutarat als Co-Substrat. α -Ketoglutarat dient hierbei als Aminogruppenakzeptor und wird zu L-Glutamat aminiert. Nach Ablauf der Reaktion wird die L-Glutamatmenge nach Auftrennung in der HPLC bestimmt. Die gebildete Glutamatmenge entspricht dem Substratumsatz des Enzyms, da die Deaminierung der Aminosäure und die Aminierung des Co-Substrats α -Ketoglutarat in dem Verhältnis 1:1 ablaufen.

Mit diesem Test kann grundsätzlich die Deaminierung jeder Aminosäure untersucht werden, da sich keine gekoppelten Enzyme an diese Reaktion anschließen, die unterschiedliche Affinitäten zu der gebildeten Ketosäure aufweisen könnten und somit die Reaktionsgeschwindigkeit beeinflussen würden.

Der Reaktionsansatz umfasst ein Gesamtvolumen von 100 μ l und setzt sich aus den folgenden Komponenten zusammen, die jeweils in der angegebenen Endkonzentration vorliegen:

0,3 M Tris-Puffer (pH 8,3)

5 mM α -Ketoglutarat

100 μ M Pyridoxal-5-Phosphat (Co-Faktor der PLP-abhängigen
Aminotransferasen; lichtempfindlich)

5 mM Dithiothreitol

Die zu testende Aminosäure und das rekombinante Protein werden in
entsprechender Menge zugegeben.

Alle Bestandteile des Ansatzes wurden filtriert (0,2 μ m), ihr pH-Wert kontrolliert und dieser gegebenenfalls zwischen pH 7-9 eingestellt.

Die einzelnen Komponenten der Deaminierungsreaktion werden bis auf das rekombinante Protein auf Eis zusammengegeben. Dieser Ansatz wird dann 4 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Danach wird das rekombinante Enzym zugegeben und der Reaktionsansatz durch Invertieren gemischt. Nun folgt eine 20-minütige Inkubation bei 37 °C, in der die Aminosäure durch das rekombinante Protein zur entsprechenden Ketosäure umgesetzt wird. Die Transaminierung wird durch eine Hitzeinaktivierung bei 94 °C für 10 min gestoppt. Die Reaktion muss sofort und dauerhaft beendet werden, so dass sich die Messgröße nicht mehr ändert. Die Proben können mehrere Wochen bei -20 °C gelagert werden und ohne weitere Behandlung in die HPLC eingesetzt werden.

Der zweite Schritt dieser Methode setzt sich aus Derivatisierung, Auftrennung und Detektion zusammen und wurde im Rahmen einer Kooperation am Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie in Jena in der Arbeitsgruppe von Prof. Gershenzon durchgeführt. Im ersten Schritt der Analyse, der Vorsäulenderivatisierung wird L-Glutamat mit dem Derivatisierungsreagenz ortho-Phthaldialdehyd (OPA) zu einem Isoindol-Derivat umgesetzt. Diese Aminosäure-

Derivate werden in einer Reversed-Phase-High-Performance-Liquid-Chromatographie aufgetrennt und mit einem Fluoreszenzdetektor erfasst. Die Aminosäure wird aufgrund ihrer Retentionszeit identifiziert. Durch die Bestimmung der Peakfläche (entspricht der absoluten Glutamatmenge) kann auf die Glutamatkonzentration geschlossen werden, die zur Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeit bzw. der Aktivität notwendig ist.

$$\text{Aktivität} = \frac{\text{absolute Glutamatmenge in } 100\mu\text{l Reaktionsansatz}}{\text{Reaktionszeit} * \text{Reaktionsvolumen}}$$

Glutamatmenge in 100µl Reaktionsansatz	y	[µmol]
Reaktionszeit	20	[min]
Reaktionsvolumen	0,1	[ml]
Aktivität	x	[µmol / min*ml]

Bezieht man in die Berechnung die eingesetzte Menge an rekombinantem Protein mit ein, so erhält man wiederum die Spezifische Aktivität. Diese entspricht der Reaktionsgeschwindigkeit und ist damit ein Maß für die Aktivität eines Enzyms.

$$\text{Spezifische Aktivität} = \frac{\text{Aktivität}}{\text{Konzentration des rekombinanten Proteins}}$$

Aktivität	x	[µmol / min*ml]
Konzentration des rekombinanten Proteins	y	[mg / ml]
Spezifische Aktivität	z	[µmol / min*mg = U / mg]

3.4 Fütterungsversuche mit verschiedenen Aminosäuren

Die Gabe von Aminosäuren führt zu Veränderungen im Gehalt und in der Zusammensetzung der freien Aminosäuren und Glucosinolate in *Arabidopsis thaliana*. Zudem führen größere Mengen an Aminosäuren zu einer starken Beeinflussung des Pflanzenwachstums. Um genauer herauszufinden, wie sich die Gabe bestimmter Aminosäuren auf das Aminosäure- und Glucosinolat-Profil auswirkt, wurden „Fütterungs“-Versuche durchgeführt.

Hierfür wurden *Arabidopsis thaliana* Pflanzen auf Erde in einer Klimakammer bei 21 °C angezogen. Die genauen Anzuchtbedingungen können unter Material 2.2 entnommen werden. Die Auswirkungen kurzzeitiger, längerer und langfristiger Gabe von Aminosäuren wurde in drei verschiedenen Ansätzen untersucht.

In dem kurzzeitigen Fütterungsversuch werden 3 Wochen alte Pflanzen einmalig mit einer Aminosäure-Lösung gegossen. 4,5 h nach der Aminosäure-Gabe (2 mM) werden die Rosetten in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Für den mittelfristigen Gießversuch wird 2 Wochen alten Pflanzen jeden zweiten Tag und insgesamt dreimal mit 2 mM Aminosäurelösung behandelt. Die 20 Tage alten Pflanzen werden 48 h nach der letzten Applikation der Aminosäure-Lösung in flüssigem Stickstoff geerntet.

Bei dem Langzeit-Gießversuch werden die *Arabidopsis* Pflanzen 3 Wochen unter normalen Bedingungen angezogen und anschließend bis zur Samenreife mit Aminosäure versetztem Gießwasser gegossen. Die Samen werden von etwa 10 Wochen alten Pflanzen 3-4 Wochen nach der letzten Verabreichung von Gießwasser mit Aminosäure-Zusatz geerntet.

Diese drei Ansätze ermöglichen eine Untersuchung über den gesamten Lebenszyklus der Pflanzen und zeigen, ob diese schnelle und/oder längerfristige Anpassungsmechanismen an die veränderten Bedingungen besitzen. Als Kontrolle werden mehrere Pflanzen jeder Pflanzenlinie grundsätzlich mit bidestilliertem Wasser ohne Aminosäure-Zusatz gegossen. Unterschiede im Aminosäure- und Glucosinolatgehalt zwischen den Kontrollpflanzen und den Aminosäure behandelten Pflanzen sind somit auf den Zusatz der Aminosäuren zurückzuführen.

Die Analyse des Blattmaterials und der Samen auf ihren Aminosäure- bzw. Glucosinolatgehalt erfolgt nach den unter 3.5 und 3.6 beschriebenen Methoden.

3.5 Bestimmung und Quantifizierung freier Aminosäuren in *Arabidopsis thaliana*

Die Auftrennung freier Aminosäuren aus *A. thaliana* Blattmaterial und Samen erfolgt mittels Reversed-Phase-High-Performance-Liquid-Chromatographie (RP-HPLC) nach Sarwar und Botting (1993). Die fluorimetrische Detektion der Aminosäuren erfolgt zuvor in einer Vorsäulenderivatisierung mit dem Derivatisierungsreagenz ortho-Phthaldialdehyd [Roth, M. 1971].

3.5.1 Aufschluss pflanzlicher Gewebe für die Aminosäure-Analyse

Die in dieser Arbeit untersuchten *Arabidopsis*-Pflanzen wurden unter standardisierten Bedingungen auf Erde in einer Klimakammer angezogen wurden (siehe Material 2.2).

Für die Analyse der Aminosäuren aus Blattmaterial, werden die Rosettenblätter 3 Wochen alter Pflanzen verwendet. Diese werden zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend gefriergetrocknet. Die Rosettenblätter von 5 Pflanzen werden jeweils zu einem Pool vereinigt und durch Edelstahlkugeln in einem Dispergiergerät (Ultra-TURRAX® Tube Drive; IKA® Werke GmbH & Co KG, Deutschland) aufgeschlossen. Von dem Pulver werden 20 mg zur Extraktion freier Aminosäuren verwendet. Hierzu wird die Pflanzenprobe mit 800 µl 0,1 N HCl versetzt und zur gleichmäßigen Rehydrierung des Materials gut gemischt. Nach einer 15minütigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgt eine Zentrifugation bei 16.100 x g und Raumtemperatur für 5 min zur Abtrennung der unlöslichen Pflanzenpartikel. Der Überstand, der die löslichen Aminosäuren enthält, wird abgenommen. Davon werden 100 µl zur Neutralisierung mit Kaliumborat Puffer (siehe Material 2.5.3) in einem Verhältnis 1:1 versetzt. Das Puffergemisch wird für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 16.100 x g und Raumtemperatur für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird für die HPLC Analyse verwendet.

Für den Aufschluss freier Aminosäuren aus Samen werden die Samen 8-10 Wochen alter *A. thaliana* Pflanzen verwendet. Die Extraktion der freien Aminosäuren erfolgt aus 20 mg Samenmaterial. Die Aufreinigung und Bestimmung der Aminosäuren in Samen wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Gershenzon (MPI, Jena) nach oben genannter Methode durchgeführt.

3.5.2 Qualitative und quantitative Bestimmung freier Aminosäuren mittels High-Performance-Liquid-Chromatographie (HPLC)

Zur Identifizierung und Quantifizierung der Aminosäuren werden diese in einer Vorsäulenderivatisierung mit ortho-Phthaldialdehyd zu Derivaten umgesetzt, die mittels der Reversed-Phase Chromatographie aufgetrennt und mit einem Fluoreszenzdetektor erfasst werden können.

Zur Durchführung der Methode wurde eine High-Performance-Liquid-Chromatographie Anlage (HPLC) (LC-10A VP Serie, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg) eingesetzt. Die Auftrennung erfolgte an einer SupelcosilTM LC-18-DB Säule (5 µm Partikelgröße; Ausmaße der Säule: 25 cm x 4,6 mm; Supelco, Bellefonte, USA).

Von dem hergestellten Aminosäure-Extrakt werden je zwei Verdünnungen angesetzt und β -Aminobutyrat als interner Standard hinzugefügt. Mit Hilfe des internen Standards kann nach der HPLC-Analyse die Qualität der Derivatisierungsreaktion bewertet werden.

Dieser Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

5 bzw. 40 µl	Aminosäure-Extrakt
10 µl	0,5 mM β -Aminobutyrat (interner Standard)
300 µl	0,5 M Kaliumborat Puffer (pH 11)
ad 600 µl	mit 0,1 N HCl

Die Analyse beginnt zunächst mit der Vorsäulenderivatisierung, bei der das Derivatisierungsreagenz ortho-Phthaldialdehyd (OPA) (Gebrauchslösung mit 2-Mercaptoethanol; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) verwendet wird. Die Aminosäure wird mit ortho-Phthaldialdehyd in Anwesenheit von 2-Mercaptoethanol zu einem Isoindolderivat umgesetzt. Diese Aminosäure-Derivate sind durch die Kopplung mit einem aromatischen Rest stabiler und hydrophober und lassen sich somit gut an Reversed-Phase-Materialien auftrennen. Die Einführung eines Fluorophors erhöht zudem die Nachweisempfindlichkeit.

Der Probengeber wird für die Vorsäulenderivatisierung so programmiert, dass erst 9 µl der Derivatisierungslösung (OPA-Reagenz), dann 10 µl der zu analysierenden Aminosäure-Verdünnung und anschließend nochmals 9 µl des OPA-Reagenz mit der Nadel aufgenommen

werden. Diese Lösungen werden in der Probenschleife gemischt. Nach einer Wartezeit von 1 min, in der die Derivatisierungsreaktion stattfindet, wird das Gemisch vollständig injiziert.

Die Aminosäure-Phthaldialdehyd-Derivate (Isoindolderivate) werden in der mobilen Phase an der stationären Phase der Reversed-Phase Säule entlang transportiert, wobei sie mit unterschiedlicher Affinität an deren hydrophoben C18-Ketten aufgrund ihrer unterschiedlichen Hydrophobizität binden. Die mobile Phase besteht aus dem organischen Lösungsmittel-Gemisch Methanol/Acetonitril (Eluent B) und dem Natrium-Citrat-Puffer (Eluent A) (siehe Material 2.5.3). Damit werden die Derivate während einer Gradientenelution von der Säule gewaschen, indem die Polarität der mobilen Phase durch Zumischen des organischen Lösungsmittels verringert und damit die Elutionskraft gesteigert wird. Anschließend werden die Aminosäure-Derivate fluormetrisch detektiert. In der Abbildung 3.1 ist ein Chromatogramm der freien Aminosäuren beispielhaft dargestellt.

Nachfolgend ist das Programm der Gradientenelution und die Einstellungen am Fluoreszenzdetektor aufgeführt.

Gradienten-Programm zur Elution der Aminosäuren:

Zeit [min]	Anteil Eluent A [%]	Anteil Eluent B [%]	Flussmenge [ml/min]
0,01	85	15	1,0
42	62	38	1,0
43	55	45	1,0
63	38	62	1,0
63,5	0	100	1,0
67	85	15	1,0
75	85	15	1,0

Einstellungen am Fluoreszenzdetektor:

Anregungswellenlänge: 330 nm

Emissionswellenlänge: 300-500 nm (Scangeschwindigkeit: schnell)

Gain: 4 (Sensitivität in der Software)

Sensitivität: mittel

Response: 3 (Sensitivität des Detektors)

Der Detektor misst die Absorption im Abstand von 500 msec.

Die Aminosäuren werden im Chromatogramm anhand ihrer Retentionszeit identifiziert. In der folgenden Tabelle sind die Aminosäuren mit ihren Retentionszeiten aufgeführt:

Aminosäure	Retentionszeit [min]
Asparaginsäure	10,6
Glutaminsäure	16,5
Asparagin	17,9
S-Methylmethionin	18,4
Histidin	19,3
Serin	20,6
Glutamin	23,5
Arginin	27,7
Glycin	28,4
Threonin	29
Alanin	37
Tyrosin	40
β-Aminobutyrat	44,8
Methionin	52,5
Valin	52,7
Tryptophan	53
Phenylalanin	55,2
Isoleucin	57,7
Leucin	59,1
Lysin	68

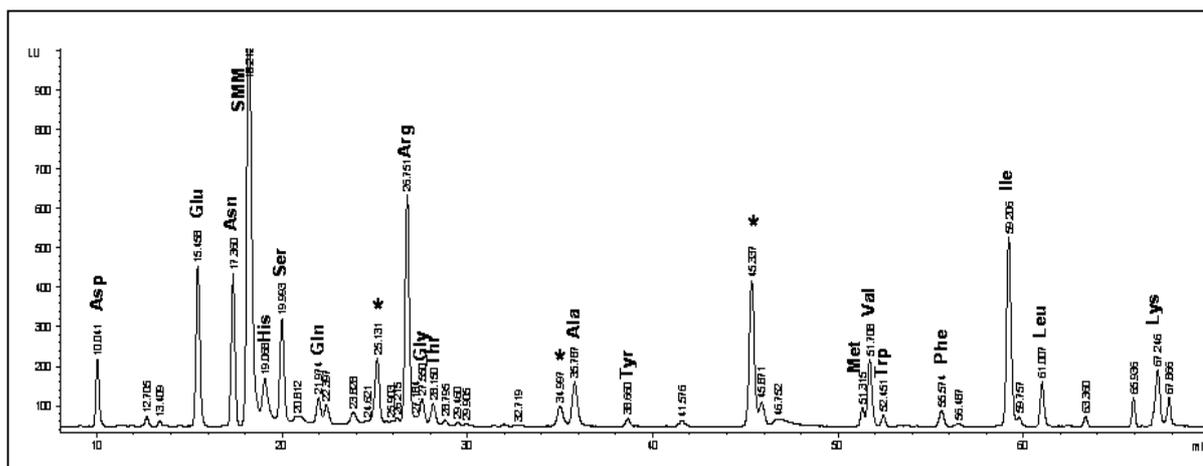


Abbildung 3.1 Chromatogramm freier Aminosäuren. Dargestellt ist das Profil freier Aminosäure in den Samen der AtBCAT3/AtBCAT4-Doppel-Knock-Out-Mutante. Die mit * gekennzeichneten Peaks konnten bisher nicht identifiziert werden.

Als interner Standard wurde die Aminosäure β -Aminobutyrat gewählt, da diese in *Arabidopsis thaliana* Pflanzen nicht vorkommt und sie aufgrund ihrer Retentionszeit (44,8 min) eine günstige Lage im Chromatogramm aufweist. Der Standard ist notwendig, um die Qualität der Derivatisierung bewerten zu können. Deshalb wird jeder zu analysierende Ansatz mit β -Aminobutyrat in einer Endkonzentration von 5 μ M versetzt. Die zur Quantifizierung verwendete Software „Class VP“ (Version 5.03x; Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg) verrechnet grundsätzlich die Peakfläche des internen Standards mit der Peakfläche der zu analysierenden Aminosäure, so dass sich Fehler aufgrund unterschiedlicher Derivatisierung minimieren lassen. Um nun die Peakfläche der jeweiligen Aminosäure einer bestimmten Menge zuordnen zu können, wird im Vorfeld für jede Aminosäure eine eigene Kalibrierreihe erstellt. Hierfür wurden 5 unterschiedliche Verdünnungen eines Aminosäure-Mix (1 mM; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) nach dem hier beschriebenen Verfahren analysiert. Für die Etablierung dieser Kalibrierreihen wurden Aminosäurekonzentrationen zwischen 0,17 und 3,3 μ M eingesetzt. Die Software „Class VP“ ermöglicht dann die Herstellung einer linearen Beziehung zwischen Peakfläche und Aminosäuremenge, indem diese gegeneinander aufgetragen werden.

3.6 Bestimmung und Quantifizierung der aliphatischen Glucosinolate in *Arabidopsis thaliana*

Die Extraktion und Bestimmung aliphatischer Glucosinolate in Rosettenblättern und Samen von *Arabidopsis* Pflanzen erfolgt nach einer von Brown et al. 2003 etablierten Methode. Die

Analyse wurde im Rahmen einer Kooperation am Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie in Jena in der Arbeitsgruppe von Prof. Gershenzon durchgeführt.

Zur Gewinnung des Pflanzenmaterials wurden *Arabidopsis* Pflanzen auf Erde in einer Klimakammer angezogen. Die genauen Anzuchtbedingungen sind unter Material 2.2 aufgeführt.

Für die Analyse werden Rosettenblätter 3 Wochen alter Pflanzen und die Samen von 8-10 Wochen alten Pflanzen verwendet. Die gesamten Rosettenblätter von 5 Pflanzen werden beim Ernten in flüssigem Stickstoff zu einem Pool vereinigt und anschließend gefriergetrocknet. Das gefriergetrocknete Blattmaterial und die Samen werden mittels Stahlkugeln zerkleinert. Jeweils 20 mg des pulverisierten, gepoolten Blattmaterials und der Samen werden zur Extraktion der Glucosinolate verwendet. Zur Isolierung der Glucosinolate aus dem Pflanzenmaterial wird die Probe in einem Methanol/Wasser-Gemisch aufgenommen und anschließend bei 13.000 x g zentrifugiert. Die Glucosinolate im löslichen Überstand werden in einer Anionenaustausch-Chromatographie angereichert und durch Zugabe einer Sulfatase als Desulfoglucosinolate eluiert. Anschließend werden diese in einer RP-HPLC-Analyse aufgetrennt und über UV-Absorption detektiert.

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zur Branched-Chain Aminotransferase 4 aus *A. thaliana*

Die Branched-Chain Aminotransferasen (BCAT) werden klassisch dem Aufbau oder Abbau der verzweigt-kettigen Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin zugeordnet. Das cytosolische Mitglied der BCAT-Familie in *A. thaliana*, AtBCAT4, fiel bereits sehr früh durch eine veränderte Substratspezifität auf. In Komplementationstudien mit einer Hefemutante, in der beide endogenen Scbcat-Gene ausgeschaltet sind, konnten alle AtBCATs mit Ausnahme des AtBCAT4 Ketomethylvalerat und Ketoisovalerat zu Isoleucin und Valin umsetzen [Diebold et al., 2002]. Dieses veränderte Substratspektrum wurde in *in vitro*-Aktivitätstests mit rekombinantem AtBCAT4 bestätigt. Zusätzlich stellte sich heraus, dass Ketomethylthiobutyrat, die Ketosäure von Methionin das Hauptsubstrat von AtBCAT4 ist und das Enzym eine hohe Affinität zu Methionin zeigt. Ketoisocaproat und Leucin werden als einzige der getesteten verzweigt-kettigen Ketosäuren bzw. Aminosäuren umgesetzt [Knill, 2005]. Methionin und dessen entsprechende Ketosäure sind Substrate aus dem Kettenverlängerungszyklus, dem ersten Abschnitt der Glucosinolatbiosynthese. Dies führte zu der Annahme, dass AtBCAT4 an der Synthese von Methionin-abgeleiteten Glucosinolaten beteiligt sein könnte. Die Reduktion der Methionin-abgeleiteten Glucosinolate um ~50 % in zwei unabhängigen AtBCAT4-Knock-Out-Mutanten unterstützt eine Funktion von AtBCAT4 in der Glucosinolatbiosynthese. Erste Ergebnisse von *in vitro*-Substratspezifitätstests mit Verbindungen aus dem Kettenverlängerungszyklus sollten in einem verbesserten Testverfahren überprüft werden. Deshalb wurden ein Substratvergleichstest mit verschiedenen Aminosäuren und *in vitro*-Aktivitätstests für Deaminierungskinetiken mit Methionin und Leucin mittels einem HPLC-gekoppelten Assay durchgeführt.

Das verwendete AtBCAT4-Überexpressionskonstrukt lag zu Beginn dieser Arbeit bereits vor und umfasst das gesamte AtBCAT4-Leseraster (354 Aminosäuren). Die Überexpression des rekombinanten AtBCAT4-Proteins wurde im *E. coli* Stamm AD494(DE3)pLys nach der unter 3.2.1 beschriebenen Methode durchgeführt. Die anschließende Aufreinigung des rekombinanten Proteins aus dem *E. coli*-Gesamtproteinlysate erfolgte mit dem S-Protein-Aufreinigungs-Kit der Firma Novagen (Madison, USA). Die Vorgehensweise ist unter dem Punkt 3.2.2 ausführlich beschrieben. In einer Enterokinase-Reaktion wurde der gesamte „Tag-Bereich“ vom rekombinanten Enzym abgeschnitten.

4.1.1 Aktivität von AtBCAT4 mit verschiedenen Aminosäuren

Eigentlich handelt es sich bei den von BCATs katalysierten Reaktionen um Transaminierungen. Um jedoch eindeutig die Reaktionsrichtung im Bezug auf das getestete Substrat anzugeben, werden die Reaktionen hier mit Deaminierung und Aminierung bezeichnet. Die Charakterisierung der Deaminierung der Aminosäuren erfolgte mit dem HPLC-unterstützten Enzym-Aktivitätstest nach Jones und Gilligan (1983) (siehe 3.3.2). Mit Hilfe dieses Tests (Abb. 4.1) kann die Umsetzung jeder beliebigen Aminosäure untersucht werden. In diesem Enzymtest erfolgt die Transaminierung der zu testenden Aminosäure zur entsprechenden Ketosäure. Die abgespaltene Aminogruppe wird auf das Co-Substrat übertragen, das dadurch zu L-Glutamat aminiert wird. Der Reaktionsansatz wird nach Abstoppen der Reaktion durch HPLC aufgetrennt und die gebildete Glutamatmenge quantifiziert. Nachdem sich die Deaminierung der Aminosäure und die Aminierung des Co-Substrats α -Ketoglutarat äquimolar verhalten, kann anhand der gebildeten Glutamatmenge die Enzymaktivität des rekombinanten AtBCAT4-Proteins berechnet werden.

In dem früher verwendeten Test wurde der Umsatz anhand der noch vorhandenen Menge an Aminosäure nach der Reaktion bestimmt. Dieses Verfahren führt jedoch zu hohen Schwankungen.

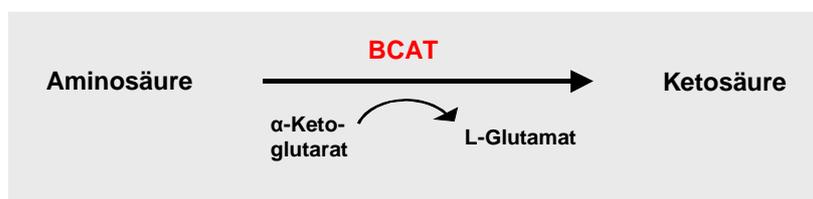


Abbildung 4.1 Ablauf des Enzymtests für die Deaminierung von Aminosäuren. Die Branched-Chain Aminotransferase (BCAT) deaminiert die Aminosäure zur entsprechenden Ketosäure. Gleichzeitig wird das Co-Substrat α -Ketoglutarat zu Glutamat aminiert.

In die Transaminierungsreaktionen des Substrat-Vergleichstests wurden 1 mM und 5 mM der jeweiligen Aminosäure eingesetzt. Die Reaktionen wurden für jede Substratkonzentration der jeweiligen Aminosäure dreimal durchgeführt. Pro Test wurden 48 μ g AtBCAT4-Gesamt-Proteinlysate eingesetzt. Im verwendeten AtBCAT4-Proteinlysate betrug der Anteil an rekombinantem BCAT4 15,95 % bzw. 7,7 μ g. Der Anteil an rekombinantem AtBCAT4-Protein im Gesamtproteinlysate wurde bestimmt, indem das Lysat in einer SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) aufgetrennt und die entsprechende Proteinbande nach Anfärbung mit Coomassie-Blau an einer Gel-Dokumentationsanlage (Fluor-S MultiImager) mit Hilfe der Software „Multi-Analyst“ (Bio-Rad) quantitativ vermessen wurde.

Um sicherzustellen, dass das aufgereinigte rekombinante AtBCAT4 katalytisch aktiv ist, wurde die Aktivität in der Aminierungsreaktion mit Ketomethylthiobutyrat am Photometer überprüft. Dabei wird außerdem die Menge an rekombinantem Protein so eingestellt, dass hohe Substratumsätze erreicht werden können. Die Einstellung der Proteinmenge ist notwendig, um genügend rekombinantes AtBCAT4 in den Deaminierungsreaktionen zu verwenden. So wird sichergestellt, dass eine zur Bestimmung ausreichende Menge an Glutamat anfällt.

In der Tabelle 4.1 ist die Aktivität und spezifische Aktivität des rekombinanten AtBCAT4-Proteins in den Transaminierungsreaktionen mit den getesteten Aminosäuren aufgeführt. Die Berechnung der Aktivität und spezifischen Aktivität erfolgt nach den unter 3.3.2 beschriebenen Formeln. In der Abbildung 4.2 sind die spezifischen Aktivitäten des AtBCAT4 mit den verschiedenen Substraten bei den beiden gemessenen Konzentrationen in Relation zueinander in einem Diagramm dargestellt. In den Transaminierungsreaktionen mit Methionin wurden bei beiden Konzentrationen die höchsten Reaktionsgeschwindigkeiten erreicht, so dass diese auf 100 % gesetzt werden. Die gemessenen Reaktionsgeschwindigkeiten mit den übrigen getesteten Aminosäuren werden in Relation zu diesem Standard angegeben. Bei 1 mM Substratkonzentration wird Leucin als einzige der verzweigtkettigen Aminosäuren vom rekombinanten AtBCAT4 deaminiert. Die Reaktionsgeschwindigkeit erreicht dabei 29 % verglichen mit dem Standard. Bei der Substratkonzentration von 5 mM katalysiert AtBCAT4 die *in vitro*-Deaminierung von Leucin und Isoleucin. Die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Umsetzung von Leucin beträgt 62 %, in der Deaminierungsreaktion mit Isoleucin erreicht diese nur 8 % verglichen mit dem Standard. Die Deaminierung von Homomethionin, das um eine Methylengruppe verlängerte Methionin-Derivat erfolgt bei ähnlichen Reaktionsgeschwindigkeiten wie sie für Leucin gemessen wurden. Homomethionin wurde verglichen mit Methionin bei 1 mM Substratkonzentration mit 37 % der Geschwindigkeit im Test deaminiert. Bei 5 mM Substratkonzentration erreichte die Umsetzung von Homomethionin 65 % der Reaktionsgeschwindigkeit mit Methionin.

Substrat	Substrat-konz. [mM]	Mittelwert der gemessenen Glutamat-konzentrationen [μ M]	Aktivität [μ mol/min*ml]	Spezif. Aktivität [μ mol/min*mg]
Methionin	1	305 (+ 7/- 8)	0,0152	0,00191
Homomethionin	1	114 (+ 3/- 4)	0,0057	0,00071
Leucin	1	88 (+ 3/- 2)	0,0044	0,00055
Valin	1	0 (+ 0,3/- 0,2)	0	0
Isoleucin	1	0 (+ 1,4/- 2,2)	0	0
Methionin	5	491 (+ 30/- 51)	0,0245	0,00307
Homomethionin	5	320 (+ 28/- 17)	0,0160	0,00200
Leucin	5	305 (+ 18/- 10)	0,0153	0,00191
Valin	5	0 (+ 0,9/- 0,9)	0	0
Isoleucin	5	39 (+ 3,6/- 2,7)	0,0020	0,00024

Tabelle 4.1 Ergebnisse des Deaminierungstests des rekombinanten AtBCAT4-Proteins mit verschiedenen Aminosäuren. Aktivität = Glutamatmenge in 100 μ l/(Reaktionszeit * Reaktionsvolumen); Spezifische Aktivität (Spezif. Aktivität) = Aktivität/Konzentration des rekombinanten Proteins. Substratkonz. = Substratkonzentration.

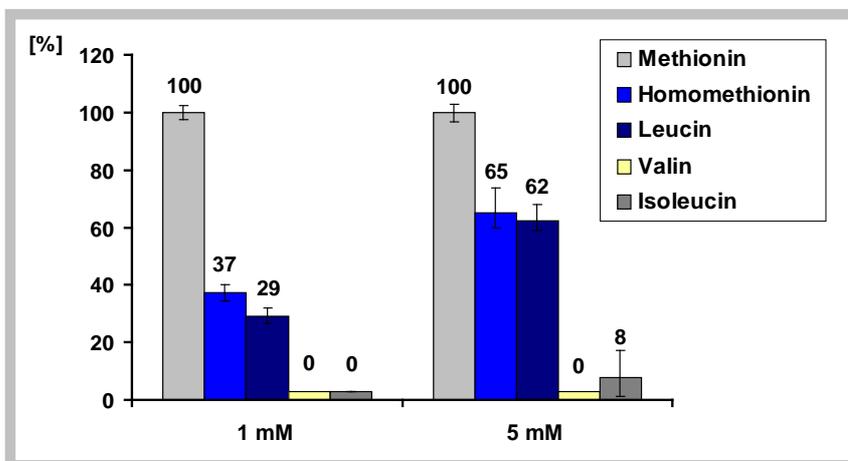


Abbildung 4.2 Ergebnisse des Substrat-Vergleichstests. Die Aminosäuren wurden in Deaminierungsreaktionen mit dem rekombinanten AtBCAT-4-Protein eingesetzt. Die Umsetzung der Aminosäuren wurde bei 1 mM und 5 mM Konzentration untersucht. Die Fehlerbalken geben die Abweichung zum größten und kleinsten Wert an.

4.1.2 AtBCAT4 zeigt in den Deaminierungskinetiken große Affinität zu Methionin

Substrat-Vergleichstest mit rekombinantem AtBCAT4 hat sich gezeigt, dass bei den eingesetzten Substratkonzentrationen die höchsten Reaktionsgeschwindigkeiten mit Methionin gemessen wurden. Zudem konnte das von den Substratspektren anderer Branched-

Chain Aminotransferasen abweichende Spektrum von AtBCAT4 bestätigt werden. Leucin wird als einzige der verzweigt-kettigen Aminosäuren deaminiert. Um nun genauere Aussagen über die Affinitäten von AtBCAT4 zu Methionin und Leucin treffen zu können, wurde mit beiden Substraten eine Transaminierungskinetik durchgeführt.

Die Deaminierungskinetiken für die BCAT4-Enzymaktivität mit Methionin und Leucin wurden mit dem unter Punkt 4.1.1 beschriebenen Testverfahren erstellt. In die Reaktionen wurden jeweils 15 unterschiedliche Methionin- bzw. Leucinmengen eingesetzt. Für Methionin wurden 13 Doppelbestimmungen und 2 Dreifachbestimmungen durchgeführt, für Leucin wurde bei 7 Substratkonzentrationen doppelt und bei 8 dreifach bestimmt. Es wurden pro Test 12 µg des AtBCAT4-Gesamtproteinlysats verwendet, das einen Anteil von 15,95 % an rekombinatem AtBCAT4 aufwies. Damit wurden im Test jeweils 1,9 µg des rekombinanten Proteins eingesetzt. Der Anteil an rekombinanten AtBCAT4-Protein im Gesamtproteinlysats wurde, wie bereits unter Punkt 4.1.1 beschrieben, bestimmt. Zur Erstellung der Kinetiken waren mehrere Präparationen des AtBCAT4-Gesamtproteinlysats notwendig. Bei den verschiedenen Aufreinigungen kann es zu geringen Schwankungen in der AtBCAT4-Aktivität kommen. Damit diese Schwankungen nicht zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen, wurde die Aktivität jedes AtBCAT4-Gesamtproteinlysats an einen Referenzwert angepasst. Für diesen Referenzwert wurde die gebildete Glutamatmenge mit einem bestimmten Substrat bei einer bestimmten Konzentration dreifach bestimmt und als Standard 100 % gesetzt. Die gemessenen Glutamatmengen mit den Lysaten aus weiteren Aufreinigungen wurden mit diesem Standard verglichen und an diesen rechnerisch angeglichen. Grundsätzlich waren die eingesetzten Substrate in ausreichender Menge im Reaktionsansatz vorhanden, so dass die Voraussetzungen für eine Michaelis-Menten-Kinetik gegeben waren. Die ermittelte Aktivität und spezifische Aktivität des rekombinanten AtBCAT4-Proteins bei den unterschiedlichen Methionin- und Leucinkonzentrationen sind in der Tabelle 4.2 zusammengefasst. Die Aktivität und spezifische Aktivität wurden mit den unter Punkt 3.3.2 angegebenen Formeln berechnet. Die berechnete spezifische Aktivität entspricht dabei der Aktivität, die mit einem Gesamtproteinlysats dessen Anteil an rekombinatem AtBCAT4 15,95 % beträgt, gemessen wird. In der letzten Spalte der Tabelle ist die spezifische Aktivität berechnet, die von 100% rekombinanten Proteins hervorgerufen wird.

Methionin-konz. [mM]	Mittelwert der gemessenen Glutamat-konzentrationen [μ M]	Aktivität [μ mol/min*ml]	Spezif. Aktivität [μ mol/min*mg]	Spezif. Aktivität (100% AtBCAT4)
0,25	236 (\pm 16)	0,0118	0,00393	0,096
0,5	317 (\pm 16)	0,0159	0,00529	0,129
0,75	376 (\pm 4)	0,0188	0,00627	0,153
1,25	508 (\pm 5)	0,0254	0,00847	0,206
1	406 (\pm 30)	0,0203	0,00676	0,165
2	540 (\pm 20)	0,0270	0,00901	0,220
2,5	605 (+ 43/- 76)	0,0303	0,01009	0,246
3	644 (+ 65/- 74)	0,0322	0,01074	0,262
4	653 (\pm 4)	0,0327	0,01089	0,265
5	686 (\pm 0)	0,0343	0,01143	0,279
6	731 (\pm 65)	0,0366	0,01219	0,297
7	740 (\pm 56)	0,0370	0,01233	0,301
8	787 (\pm 52)	0,0393	0,01312	0,320
9	778 (\pm 17)	0,0389	0,01297	0,316
10	798 (\pm 85)	0,0399	0,01331	0,325
Leucin-konz. [mM]	Mittelwert der gemessenen Glutamat-konzentrationen [μ M]	Aktivität [μ mol/min*ml]	Spezif. Aktivität [μ mol/min*mg]	Spezif. Aktivität (100% AtBCAT4)
0,25	44 (\pm 10)	0,002	0,00074	0,005
0,5	80 (\pm 15)	0,004	0,00133	0,008
1	161 (+ 50/- 27)	0,009	0,00290	0,018
1,5	225 (\pm 10)	0,011	0,00375	0,024
2	302 (+ 9/- 13)	0,015	0,00507	0,032
2,5	380 (+ 63/- 44)	0,019	0,00635	0,040
3	395 (+ 41/- 23)	0,020	0,00651	0,041
4	446 (+ 64/- 38)	0,022	0,00733	0,046
5	543 (+ 35/- 28)	0,027	0,00903	0,057
6	539 (+ 22/- 19)	0,027	0,00897	0,056
7	609 (+ 17/- 11)	0,030	0,01011	0,063
8	666 (+ 106/- 56)	0,033	0,01087	0,068
9	657 (\pm 36)	0,033	0,01097	0,069
10	733 (\pm 17)	0,037	0,01223	0,077
15	751 (\pm 40)	0,038	0,01254	0,079

Tabelle 4.2 Aktivität und spezifische Aktivität des AtBCAT4-Proteins in der Deaminierungskinetik mit Methionin (oben) und Leucin (unten). Aktivität = Glutamatmenge in 100 μ l / (Reaktionszeit *Reaktionsvolumen); Spezifische Aktivität (Spezif. Aktivität) = Aktivität/Konzentration des rekombinanten AtBCAT4-Gesamtproteinlysats. Spezif. Aktivität (100% AtBCAT4) = Spezif. Aktivität bei einem Einsatz von 100% rekombinanten AtBCAT4 Protein. Substratkonz. = Substratkonzentration.

Die ermittelten Substrat-Enzymaktivitäts-Beziehungen verhalten sich wie die Michaelis-Menten-Beziehungen, was sich in dem typisch hyperbolischen Kurvenverlauf der Kinetiken widerspiegelt (Abb. 4.3 A und B). Die K_m - und V_{max} -Werte wurden mittels nichtlinearer Regression unter Verwendung der „Origin“-Software (OriginLab Corporation, Nordhampton, USA) basierend auf der Michaelis-Menten-Gleichung ($V = (V_{max} * [S]) / (K_m + [S])$) berechnet. Der K_m -Wert entspricht der Substratkonzentration bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit und stellt ein Maß für die Affinität des zu untersuchenden Enzyms dar. Ist der K_m -Wert hoch, so ist viel Substrat zum Erreichen der halbmaximalen Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms nötig, und damit die Affinität zu diesem Substrat gering. Ein niedriger K_m -Wert weist jedoch darauf hin, dass nur wenig Substrat zur Halbsättigung des Enzyms benötigt wird, und somit die Affinität zum Substrat hoch ist.

In der Deaminierungskinetik des rekombinanten AtBCAT4 mit Methionin beträgt der K_m -Wert 0,93 mM, in der mit Leucin 4,86 mM. Dies bedeutet, dass AtBCAT4 *in vitro* eine höhere Affinität zu Methionin aufweist als zu Leucin, da eine geringere Substratmenge an Methionin ausreicht, um die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit zu erreichen. Die relativen Maximalgeschwindigkeiten liegen mit 0,088 $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ für Methionin und 0,11 $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ für Leucin etwa im gleichen Bereich.

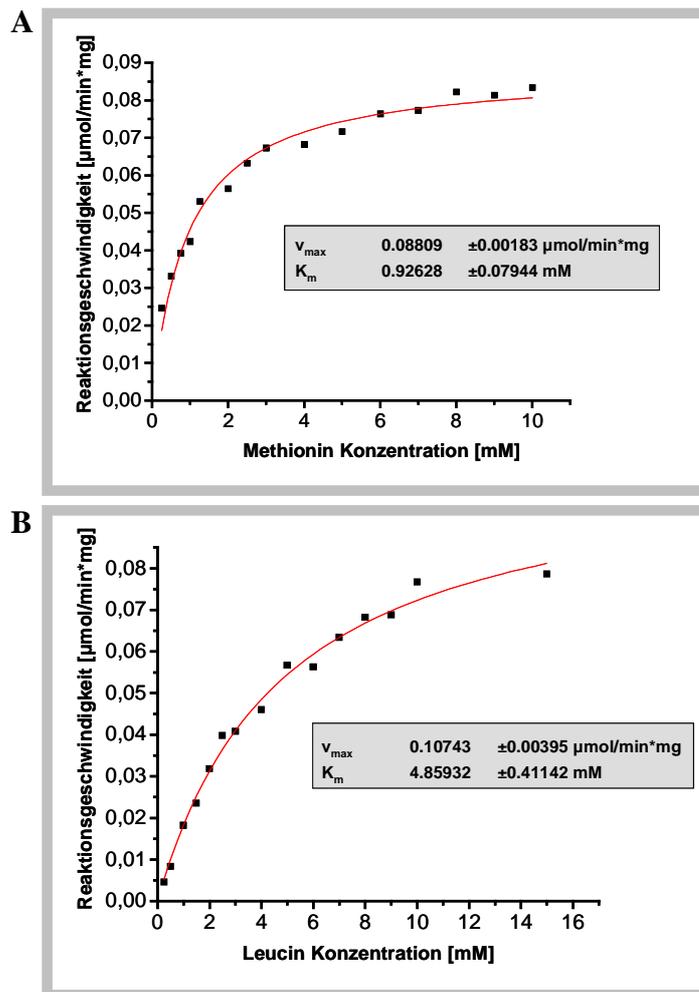


Abbildung 4.3 Darstellung der Deaminierungskinetiken mit Methionin (A) und Leucin (B). Es wurde jeweils die Substratkonzentration gegen die Reaktionsgeschwindigkeit aufgetragen. Für beide Substrate ergibt sich eine typische Michaelis-Menten-Kinetik.

4.1.3 Subzelluläre Lokalisierung der Branched-Chain Aminotransferase 4 in einem Zellfraktionierungsexperiment

Aus früheren Studien existieren Hinweise für die subzelluläre Lokalisation der Branched-Chain Aminotransferase 4 aus *A. thaliana* [Knill, 2005; Schuster et al., 2006]. Dabei wurde auf cDNA-Ebene das gesamte AtBCAT4-Protein (354 Aminosäuren) mit dem N-Terminus des grün fluoreszierenden Proteins smGFP (*soluble modified green fluorescent protein*) fusioniert und transient in Tabak-Protoplasten (*Nicotiana tabacum*) exprimiert. Die Fluoreszenz des AtBCAT4:smGFP-Fusionsproteins wurde hierbei eindeutig im Cytosol nachgewiesen.

Um die Lokalisation in einem zweiten, unabhängigen Experiment zu untersuchen, wurde nun eine Zellfraktionierung mit anschließender Immunodetektion durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Zellfraktionen mit einem AtBCAT4-spezifischen Antikörper untersucht. Ein Detektionssignal deutet dann auf AtBCAT4 in dieser Zellfraktion hin. Für den Versuch wurden lösliche Gesamtproteinlysate der AtBCAT4-Knock-Out-Mutante (*bcat4-1*; SALK 013627) und des *Arabidopsis* Wildtyps verwendet. Zudem wurden Zellfraktionen, in denen cytosolische, chloroplastidäre bzw. mitochondriale Proteine angereichert wurden, eingesetzt. Die Gewinnung der verschiedenen Proteinlysate und der Cytosolfraktion ist unter den Punkten 3.1.1 und 3.1.2 ausführlich beschrieben. Die Chloroplasten wurden mittels differentieller Zentrifugation und anschließender Aufreinigung über Percoll Gradienten gewonnen [Aseeva et al. 2004]. Nach einem ähnlichen Verfahren, das für die Aufreinigung von Mitochondrien optimiert wurde, wurde eine Mitochondrien-Fraktion aus *Arabidopsis* Zellsuspensionskultur isoliert [Klein et al., 1998].

Die verschiedenen Proteinlysate wurden in einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) (12,5% Polyacrylamid; 4 M Urea) aufgetrennt und die Proteine mit Hilfe des Western-Blot-Verfahrens auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Auftrennung und der Transfer erfolgten nach Standard Elektrophorese- und Transfer-Techniken (Sambrook et al., 1998). Die Immunodetektion wurde nach Anleitung des Herstellers des ECL-Detektionssystems (Amersham, Biosciences) durchgeführt.

In der Abbildung 4.4 sind die Ergebnisse der Immunodetektion dargestellt. AtBCAT4 wird in den Gesamtproteinlysaten aus Keimlingen und 3 Wochen alter Wildtyp-Pflanzen detektiert. Zudem wurde ein eindeutiges Signal in der Cytosolfraktion nachgewiesen. In der Chloroplasten- und Mitochondrien-Fraktion kann AtBCAT4 nicht nachgewiesen werden. Die ausschließliche Detektion von AtBCAT4 in der Cytosol-Fraktion, bestätigt die cytosolische Lokalisation von AtBCAT4.

Dieses Experiment bestätigt zudem den Knock-Out von AtBCAT4 in der *bcat4-1* Mutante auf Proteinebene, da die Aminotransferase im Gesamtproteinlysate dieser Mutante nicht nachgewiesen werden kann.

Um die Reinheit der einzelnen Fraktionen zu überprüfen, wurden diese mit den Antikörpern gegen Proteine mit unterschiedlicher subzellulärer Lokalisation, die cytosolische UDP-Glucose-Pyrophosphorylase (UGPase), die plastidäre Ferredoxin-NADP⁺-Reductase (FNR) und das mitochondriale Porin (siehe 2.4 Material) untersucht. Die Markerproteine wurden in der jeweiligen Fraktion, ihrer Lokalisation entsprechend nachgewiesen. In der Mitochondrien-Fraktion wird ausschließlich das mitochondriale Markerprotein Porin und in der

chloroplastidären Fraktion das plastidär lokalisierte FNR-Markerprotein nachgewiesen. In diesen Fraktionen liegen demnach keine oder sehr wenig Verunreinigungen mit Proteinen anderer Fraktionen vor. In der Cytosolfraktion wird der cytosolische Marker, die UGPase, aber auch das plastidäre FNR-Protein detektiert. Dies bedeutet, dass die cytosolische Fraktion in geringem Ausmaß mit chloroplastidären Proteinen kontaminiert ist. Die ausschließliche Detektion von AtBCAT4 in der Cytosol-Fraktion spricht dennoch für die eindeutig cytosolische Lokalisation dieser Aminotransferase.

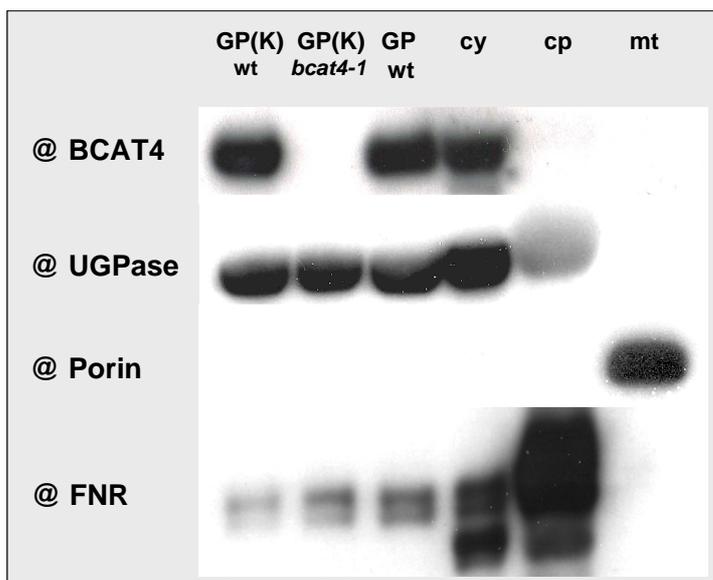


Abbildung 4.4 Immunodetektionsanalyse subzellulärer Protein-Fractionen. Die Branched-Chain Aminotransferase 4 aus *Arabidopsis thaliana* wird ausschließlich im Cytosolextrakt detektiert. Abkürzungen: GP(K) wt, Gesamtproteinlysate aus Wildtyp Keimlingen; GP(K) *bcat4-1*, Gesamtproteinlysate aus Keimlingen der AtBCAT4-Knock-Out-Mutante (*bcat4-1*); GP wt, Gesamtproteinlysate aus 3 Wochen alten Wildtyp-Pflanzen; cy, Cytosol; cp, Chloroplasten-Fraktion; mt, Mitochondrien-Fraktion. Die verwendeten Antikörper (@) richten sich gegen AtBCAT4 (BCAT4), den cytosolischen Marker UDP-Glucose-Pyrophosphorylase (UGPase), den mitochondrialen Marker Porin und den plastidären Marker Ferredoxin-NADP⁺-Reduktase (FNR).

4.1.4 Fraßversuch mit *Spodoptera*-Raupen an AtBCAT4-Knock-Out-Pflanzen

Alle Pflanzen, die Glucosinolate enthalten, produzieren das Enzym Myrosinase, eine β -Thioglucosidase, die den Abbau der Glucosinolate katalysiert. Dieses Enzym wird in Myrosinzellen, getrennt von den Glucosinolaten gespeichert. Wird das Pflanzengewebe jedoch durch Insektenfraß verwundet, kommen die Glucosinolate mit der Myrosinase in Berührung und werden zu einer Vielzahl von Stoffen hydrolysiert. Diese Abbauprodukte (Isothiocyanate, Thiocyanate, Nitrile, Epithionitrile) sind für die biologischen Aktivitäten der Glucosinolate verantwortlich und dienen u.a. als Schutz gegen den Befall von Herbivoren (Pflanzenfresser).

Die beiden AtBCAT4-Knock-Out-Mutanten (*bcat4-1* und *bcat4-2*; siehe Material 2.2) enthalten in den Rosettenblättern etwa 50 % weniger Methionin-abgeleitete Glucosinolate als der Wildtyp. Um zu untersuchen, ob sich die Reduktion der Glucosinolate bzw. der Hydrolyseprodukte auf das Fraßverhalten von Schädlingen auswirkt, wurden die beiden Mutanten in einem „choice“-Test mit dem Generalisten *Spodoptera littoralis* (Ägyptische Baumwoll-Motte) untersucht. Dieser Schädling eignet sich sehr gut für diesen Fraßversuch, da er sich von unterschiedlichen Nutzpflanzen (Generalist) ernährt. Darunter finden sich u.a. Brassicaceen, zu denen ebenfalls *Arabidopsis thaliana* gehört. In dem Versuch wurde den *Spodoptera*-Raupen Pflanzen von 8 unterschiedlichen Pflanzenlinien angeboten. Neben den *bcat4-1* und *bcat4-2* Mutanten und den dazugehörigen Wildtypen (*Arabidopsis thaliana* Columbia), wurde die AtBCAT3-Mutante (*bcat3-1*) und die Isopropylmalat-Isomerase-Knock-Out-Mutante (*ipmi ssu2-1*) (siehe Material 2.2) mit den entsprechenden Wildtypen eingesetzt. Die *bcat3-1* Mutante weist in den Blättern 18 % mehr Methionin-abgeleitete Glucosinolate auf als der Wildtyp. Die *ipmi ssu2-1* Mutante unterscheidet sich im Gesamt-Glucosinolatgehalt nicht vom Wildtyp, weist jedoch spezifische Unterschiede in einzelnen Glucosinolat-Spezies auf. Die Verwendung von Pflanzen mit unterschiedlichen Glucosinolat-Spektren soll nun zeigen, in wie weit sich geringe spezifische bzw. große Veränderungen im Glucosinolat-Spektrum den Schutz der Pflanze gegen Schädlinge beeinflusst.

Für diesen Fraßversuch wurden jeweils 36 Pflanzen einer Linie in zufälliger Anordnung unter Langtag-Bedingungen in einer Klimakammer angezogen (Anzuchtbedingungen siehe 2.2 Material). Die Raupen wurden auf drei Wochen alte Pflanzen gesetzt und nach 24 h wieder abgesammelt. Anschließend wurde der durch den Fraß verursachte Blattschaden geschätzt. Der Fraßversuch wurde insgesamt dreimal an unterschiedlichen Tagen durchgeführt. Die Schätzung des Blattschadens wurde von insgesamt drei Personen durchgeführt, so dass diese verlässlich ist. Für den ersten Versuch wurden 4 Raupen pro Pflanze verwendet, beim zweiten 3 Raupen und beim dritten Ansatz 2 Raupen pro Pflanze. Das Ausmaß des Fraßschadens wird in Schadensklassen eingeordnet (siehe Tab. 4.3).

Schadensklasse	Blattschaden in Prozent %
0	0-4
1	5-10
2	11-20
3	21-30
4	31-40
5	41-50
6	51-60
7	61-70
8	71-80
9	81-90
10	91-100

Tabelle 4.3 Einteilung des Fraßschadens in Schadensklassen.

Die Fraß-geschädigten Pflanzen wurden in die einzelnen Schadensklassen kategorisiert und die Anzahl der Pflanzen einer Linie, die den gleichen Blattschaden aufweisen bestimmt. Zur Veranschaulichung der Verteilung der Schadensklassen wurde die jeweilige Anzahl der Pflanzen und die Schadensklasse gegeneinander aufgetragen. Die Verteilung der Schadensklassen für die Mutante wurde zudem mit der Verteilung des jeweiligen Wildtyps verglichen. In der Abbildung 4.5 ist die Verteilung der Schadensklassen in den beiden AtBCAT4-Mutanten und deren Wildtypen dargestellt. Bei beiden Wildtypen sind die meisten Pflanzen mit einem Fraßschaden von 11-20 % betroffen. Die meisten Pflanzen der *bcat4-1* Mutante gehören der Schadensklasse 4 (31-40 %) an. In der *bcat4-2* Mutante sind die meisten Pflanzen in der Schadensklasse 3 (21-30 %) betroffen. Für die Isopropylmalat-Isomerase-Mutante ergibt sich eine Verteilung der Schadensklassen wie im Wildtyp (Abb. 4.6, B). Die Mehrzahl der Pflanzen dieser Linien haben einen Blattschaden von 11-20 %. Die meisten Pflanzen der AtBCAT3-Knock-Out Mutante weisen einen Blattschaden von 5-10 % auf und werden deshalb in die Schadensklasse 1 eingeordnet (Abb. 4.6, A). Betrachtet man den entsprechenden Wildtyp, so weist die Mehrzahl der Pflanzen einen Blattschaden von 11-20 % auf.

Der Fraßversuch zeigt, dass die Pflanzen der AtBCAT4-Knock-Out-Linien mit reduziertem Glucosinolatgehalt einen größeren Blattschaden aufweisen als die Wildtyp-Pflanzen. Die spezifischen Veränderungen im Glucosinolat-Spektrum der *ipmi ssu2-1* Mutante scheint das Fraßverhalten des Schädling nicht zu beeinflussen. Die *bcat3-1* Mutante mit erhöhtem Glucosinolatgehalt zeigt einen leicht reduzierten Blattschaden verglichen mit dem Wildtyp.

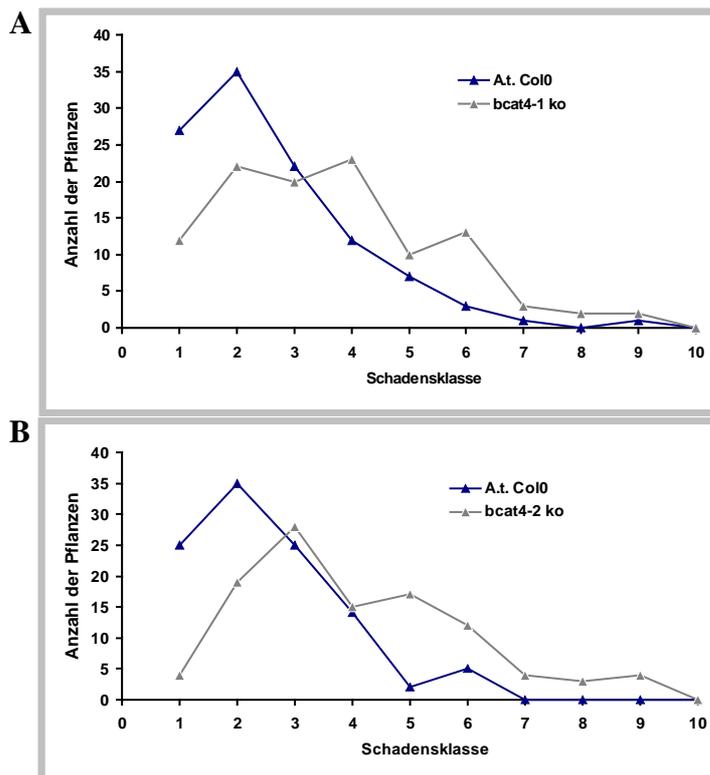


Abbildung 4.5 Verteilung der Schadensklassen in den AtBCAT4-Mutanten. Die Zahl der Pflanzen der *bcat4-1* Mutante (A), der *bcat4-2* Mutante (B) und dem *Arabidopsis thaliana* Wildtyp (A.t. Col0), die einen bestimmten Blattschaden aufweisen, ist gegen die jeweilige Schadensklasse aufgetragen.

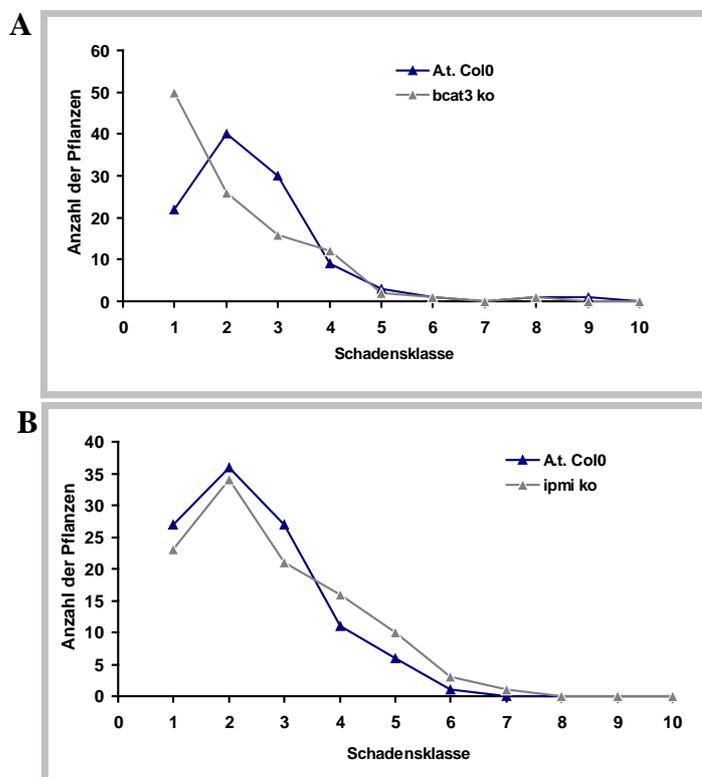


Abbildung 4.6 Verteilung der Schadensklassen in der *bcat3-1* und *ipmi ssu2-1* Mutante. Die Zahl der Pflanzen der *bcat3-1* Mutante (A), der *ipmi SSU2* Mutante (B) und dem *Arabidopsis thaliana* Wildtyp (A.t. Col0), die einen bestimmten Fraßschaden aufweisen, ist gegen die jeweilige Schadensklasse aufgetragen.

Um mathematisch beurteilen zu können, ob es sich bei den unterschiedlichen Verteilungen um signifikante Unterschiede handelt, wurde ein U-Test (Signifikanztest nach Wilcoxon, Mann, und Whitney) durchgeführt. Ist die mit diesem Test ermittelte Wahrscheinlichkeit P kleiner als 0,001, dann sind die betrachteten Messwerte signifikant unterschiedlich. Der U-Test mit den Medianen (Zentralwert einer Datenreihe) der Versuchsergebnisse ergab, dass ein signifikanter Unterschied im Blattschaden für die AtBCAT4-Knock-Out-Linien nachgewiesen wurde (Tab. 4.4). Für die Isopropylmalat-Isomerase- und die AtBCAT3-Knock-Out-Mutante ergeben sich keine signifikante Unterschiede in den Fraßschaden beim Vergleich mit dem jeweiligen *A. thaliana* Wildtyp. Dies bedeutet, dass die Pflanzen mit einem geringeren Glucosinolatgehalt von den Raupen signifikant mehr gefressen wurden.

Linie	Median der Schadensklasse	U-Test
<i>bcat4-1</i>	3	P < 0,001
<i>A.t. Col-0</i>	2	
<i>bcat4-2</i>	4	P < 0,001
<i>A.t. Col-0</i>	2	
<i>bcat3-1</i>	2	P = 0,004
<i>A.t. Col-0</i>	2	
<i>ipmi ssu2</i>	2	P = 0,182
<i>A.t. Col-0</i>	2	

Tabelle 4.4 Ergebnisse des U-Tests

4.2. Charakterisierung der Branched-Chain Aminotransferase 3 aus *A. thaliana*

Für die plastidäre Branched-Chain Aminotransferase 3 aus *A. thaliana* gibt es *in vitro* bereits Hinweise, dass diese an der Glucosinolatbiosynthese und gleichzeitig an der Synthese verzweigtkettiger Aminosäuren beteiligt ist (Knill, 2005). Aminierungskinetiken mit den Ketosäuren der verzweigtkettigen Aminosäuren sollen zunächst das Affinitätsverhalten des rekombinanten AtBCAT3 in der Biosynthese verzweigtkettiger Aminosäuren klären. Um die Funktion von AtBCAT3 im Aminosäure- und Glucosinolatmetabolismus *in vivo* näher zu analysieren, sollte eine entsprechende Knock-Out-Mutante etabliert werden. Die Analysen zum Glucosinolatgehalt und zur Konzentration freier Aminosäuren in der Mutante sollen weitere Hinweise zur Rolle des AtBCAT3 in den beiden Stoffwechselwegen liefern.

4.2.1 *In vitro*-Analysen zur Substratspezifität des rekombinanten AtBCAT3 Proteins

Substratvergleichstest vorangegangener Studien haben gezeigt, dass das rekombinante AtBCAT3 alle verzweigt-kettigen Ketosäuren zu den entsprechenden Aminosäuren umsetzt [Knill, 2005]. Um nun genauer zu untersuchen, welche Affinität AtBCAT3 zu den einzelnen Substraten besitzt, wurde für jede verzweigt-kettige Ketosäure eine Aminierungskinetik erstellt. Diese Experimente sollen weitere Erkenntnisse über die Funktion der Branched-Chain Aminotransferase 3 in der Biosynthese der jeweiligen verzweigt-kettigen Aminosäure liefern.

Das für die Herstellung des rekombinanten Proteinlysats verwendete Überexpressionskonstrukt lag zu Beginn dieser Arbeit vor und umfasst das AtBCAT3-Leseraster (353 Aminosäuren) ohne das potentielle plastidäre Signalpeptid am N-Terminus (60 Aminosäuren). Die Überexpression des rekombinanten AtBCAT-3-Proteins wurde im *E. coli* Stamm AD494(DE3)pLys nach der unter 3.2.1 beschriebenen Methode durchgeführt. Die anschließende Aufreinigung des rekombinanten Proteins aus dem *E. coli*-Gesamtproteinlysats erfolgte mit dem S-Protein-Aufreinigungs-Kit der Firma Novagen (Madison, USA) und ist unter dem Punkt 3.2.2 ausführlich beschrieben. In einer Enterokinase-Reaktion wurde der gesamte „Tag-Bereich“, der ausschließlich für die Aufreinigung des rekombinanten Proteinlysats dient, abgetrennt.

Zur Untersuchung der Aminierungsreaktion wurde das kontinuierliche Testverfahren nach Schadewaldt und Adelmeyer verwendet (Abb. 4.7). Dieses photometrische Verfahren ist unter 3.3.1 Methoden ausführlich beschrieben.

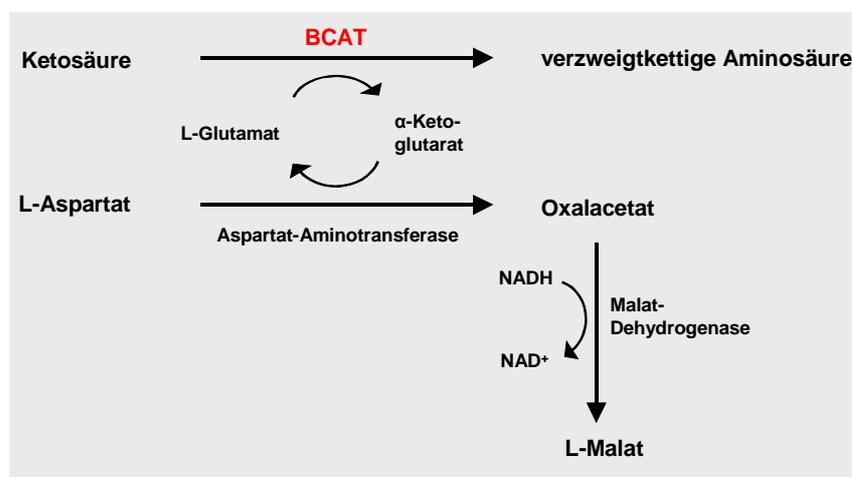


Abbildung 4.7 Ablauf des BCAT-Enzymtests nach Schadewaldt und Adelmeyer. Der Test untersucht die Aminierung verzweigt-kettiger Ketosäuren. Es handelt sich um einen gekoppelten Enzymtest, in dem in der letzten Reaktion der NADH-Verbrauch als Absorptionsabnahme am Photometer verfolgt werden. Aus dem NADH-Verbrauch lässt sich die Branched-Chain Aminotransferase-Aktivität im Test berechnen.

Es handelt sich hierbei um einen gekoppelten Enzymtest, der mit der Transaminierung der zur untersuchenden Ketosäure zu der entsprechenden Aminosäure beginnt. Dieser Schritt wird von der BCAT katalysiert. Gleichzeitig wird das Co-Substrat L-Glutamat in dieser Reaktion zu α -Ketoglutarat deaminiert. Auf diese Reaktion folgend, wird L-Aspartat durch die Aspartat-Aminotransferase zu Oxalacetat umgesetzt. Das im ersten Schritt gebildete α -Ketoglutarat dient hierbei als Aminogruppenakzeptor. Oxalacetat wird in der nachfolgenden NADH-abhängigen Reaktion durch die Malat-Dehydrogenase zu L-Malat umgesetzt. Der NADH-Verbrauch führt zu einer messbaren Absorptionsabnahme bei 340 nm, die mit der Reaktionsgeschwindigkeit der initialen Aminierung korreliert. Da sich die einzelnen Reaktionen in diesem Enzymtest äquimolar verhalten, wird die Geschwindigkeit der BCAT-katalysierten Reaktion anhand der NADH-Abnahme berechnet.

Für die Kinetiken mit Ketomethylthiobutyrat (MTOB) wurde das Substrat in 10 verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Für 9 Konzentrationen wurde eine Doppelbestimmungen durchgeführt, ein Wert wurde dreifach bestimmt. Die Umsetzung von Ketoisocaproat (KIC) und Ketomethylvalerat (KMV), den Ketosäuren von Leucin und Isoleucin, wurde bei jeweils 13 unterschiedlichen Substratkonzentrationen getestet. Im Falle des Ketoisocaproats wurden dabei 3 Doppel- und 10 Dreifachbestimmungen durchgeführt. Für Ketomethylvalerat waren es 7 Doppel- und 6 Dreifachbestimmungen. In den Aminierungsreaktionen mit Ketoisovalerat (KIV), der Ketosäure von Valin wurden 14 unterschiedliche Konzentrationen verwendet. Dabei wurde bei 7 Konzentrationen des KIV die Absorptionsabnahme jeweils doppelt bestimmt und bei 7 Konzentrationen dreifach. In jede Einzelreaktion der Enzymtests wurde 4,64 μ g des aufgereinigten AtBCAT3-Gesamtproteinlysats eingesetzt. Der Anteil an rekombinanten AtBCAT3 beträgt in diesem Lysat 13,7 % bzw. 0,64 μ g. Der Anteil an rekombinantem AtBCAT3 wurde bestimmt, indem nach Auftrennung des Gesamtproteinlysats in einer SDS-PAGE und Anfärben der Proteine mit Coomassie-Blau, die entsprechende Proteinbande mit Hilfe einer Gel-Dokumentationsanlage und der Software „GenTools“ (Syngene) quantifiziert wurde.

Für die Aminierungskinetiken waren mehrere AtBCAT3-Gesamtproteinlysats-Aufreinigungen nötig. Bei den verschiedenen Aufreinigungen kann es zu geringen Schwankungen in der AtBCAT3-Aktivität kommen. Damit diese Schwankungen nicht zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen, wurde die Aktivität jedes AtBCAT3-Gesamtproteinlysats an einen Referenzwert angepasst. Für diesen Referenzwert wurde die Extinktionsabnahme mit einem

bestimmten Substrat bei einer bestimmten Konzentration dreifach bestimmt und als Standard 100 % gesetzt. Die gemessenen Extinktionsabnahmen mit den Lysaten aus weiteren Aufreinigungen wurden mit diesem Standard verglichen und an diesen angeglichen. Die berechnete Aktivität und spezifische Aktivität des rekombinanten AtBCAT3-Proteins in den Aminierungsreaktionen mit den getesteten Ketosäuren ist in der Tabelle 4.5 dargestellt. Die Formeln für die Berechnung der Aktivität und der spezifischen Aktivität ist dem Punkt 3.3.2 zu entnehmen. Die berechnete spezifische Aktivität entspricht dabei der Aktivität, die ein Gesamtproteinlysate mit einem Anteil an rekombinantem AtBCAT3 von 13,7 % aufweist. In der letzten Spalte der Tabelle ist die spezifische Aktivität berechnet, die von 100% rekombinanten Proteins hervorgerufen wird.

Die eingesetzten Substrate waren im Reaktionsansatz grundsätzlich in ausreichender Menge vorhanden, so dass die Voraussetzungen für eine Michaelis-Menten-Kinetik gegeben war. Die ermittelten Substrat-Enzymaktivität-Beziehungen verhalten sich wie die Michaelis-Menten-Beziehungen, was sich in dem typisch hyperbolischen Kurvenverlauf der Kinetiken widerspiegelt (siehe 8.2 im Anhang). Die K_m - und V_{max} -Werte wurden mittels nichtlinearer Regression unter Verwendung der „Origin“-Software (OriginLab Corporation, Nordhampton, USA) basierend auf der Michaelis-Menten-Gleichung ($V = (V_{max} * [S]) / (K_m + [S])$) berechnet. Die Ergebnisse der Aminierungskinetiken des rekombinanten AtBCAT3-Proteins sind in der Tabelle 4.6 zusammengefasst. In den Kinetiken mit Ketoisocaproat (KIC) und Ketomethylvalerat (KMV) wurde jeweils ein K_m -Wert von 0,14 mM ermittelt. Die berechneten K_m -Werte in den Aminierungskinetiken mit den zwei weiteren Ketosäuren Ketomethylthiobutyrate (MTOB) und Ketoisovalerat (KIV) liegen mit 1,92 mM und 1,38 mM höher. Nachdem der K_m -Wert die Substratkonzentration angibt, die zum Erreichen der halbmaximalen Reaktionsgeschwindigkeit eines Enzyms nötig ist, sind die Substrate KIC und KMV bereits in einer geringeren Konzentration für die Halbsättigung des AtBCAT3-Proteins ausreichend. AtBCAT3 zeigt die höchste Affinität zu den Ketosäuren von Leucin und Isoleucin. In der Aminierung von Ketoisocaproat wird zudem die doppelte maximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht verglichen mit den beiden weiteren Kinetiken.

MTOB-konz. [mM]	Mittelwert der gemessenen $\Delta E/\text{min}$ [1/min]	Aktivität [$\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{ml}$]	Spezif. Aktivität [$\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$]	Spezif. Aktivität (100% AtBCAT3)
0,1	0,009 ($\pm 0,000$)	0,30	0,07	0,48
0,5	0,084 ($\pm 0,000$)	2,71	0,58	4,26
1	0,128 ($\pm 0,000$)	4,13	0,89	6,50
1,5	0,180 ($\pm 0,003$)	5,79	1,25	9,10
2	0,199 ($\pm 0,001$)	6,41	1,38	10,09
3	0,259 ($\pm 0,010$)	8,34	1,80	13,12
4,5	0,305 ($\pm 0,009$)	9,80	2,11	15,42
7	0,364 ($\pm 0,012$)	11,71	2,52	18,42
10	0,334 ($\pm 0,005$)	10,74	2,32	16,90
20	0,358 ($\pm 0,008$)	11,50	2,48	18,09
KIC-konz. [mM]	Mittelwert der gemessenen $\Delta E/\text{min}$ [1/min]	Aktivität [$\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{ml}$]	Spezif. Aktivität [$\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$]	Spezif. Aktivität (100% AtBCAT3)
0,05	0,113 ($\pm 0,009$)	3,63	0,78	5,72
0,1	0,158 (+ 0,005/- 0,008)	5,08	1,09	7,99
0,15	0,186 ($\pm 0,006$)	5,98	1,29	9,40
0,175	0,197 ($\pm 0,000$)	6,34	1,37	9,97
0,2	0,386 (+ 0,015/- 0,022)	12,40	2,67	19,51
0,25	0,432 (+ 0,019/- 0,010)	13,89	2,99	21,86
0,3	0,450 (+ 0,022/- 0,045)	14,47	3,12	22,77
0,4	0,430 ($\pm 0,003$)	13,84	2,98	21,77
0,5	0,499 (+ 0,018/- 0,014)	16,04	3,46	25,24
1	0,494 (+ 0,006/- 0,005)	6,15	3,42	24,99
2	0,484 (+ 0,020/- 0,012)	15,89	3,35	24,47
4	0,488 (+ 0,033/- 0,019)	15,56	3,38	24,66
10	0,485 (+ 0,008/- 0,012)	15,68	3,36	24,52
KMV-konz. [mM]	Mittelwert der gemessenen $\Delta E/\text{min}$ [1/min]	Aktivität [$\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{ml}$]	Spezif. Aktivität [$\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$]	Spezif. Aktivität (100% AtBCAT3)
0,05	0,038 ($\pm 0,001$)	1,23	0,26	1,93
0,1	0,088 (+ 0,007/- 0,009)	2,83	0,61	4,45
0,15	0,115 ($\pm 0,000$)	3,68	0,79	5,80
0,2	0,142 (+ 0,007/- 0,005)	4,58	0,99	7,21
0,25	0,188 (+ 0,013/- 0,008)	6,04	1,30	9,51
0,3	0,203 (+ 0,016/- 0,018)	6,53	1,41	10,26
0,4	0,220 ($\pm 0,007$)	7,07	1,52	11,12
0,5	0,236 ($\pm 0,005$)	7,59	1,64	11,94
1	0,236 ($\pm 0,014$)	7,57	1,63	11,91
2	0,234 ($\pm 0,020$)	7,52	1,62	11,83
4	0,240 (+ 0,018/- 0,020)	7,71	1,66	12,13
10	0,244 ($\pm 0,015$)	7,84	1,69	12,33

KIV-konz. [mM]	Mittelwert der gemessenen $\Delta E/\text{min}$ [1/min]	Aktivität [$\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{ml}$]	Spezif. Aktivität [$\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$]	Spezif. Aktivität (100% AtBCAT3)
0,1	0,024 ($\pm 0,002$)	0,76	0,16	1,20
0,2	0,037 ($\pm 0,000$)	1,20	0,26	1,88
0,3	0,056 (+ 0,003/- 0,004)	1,81	0,39	2,84
0,4	0,068 ($\pm 0,003$)	2,17	0,47	3,42
0,5	0,079 (+ 0,006/- 0,004)	2,55	0,55	4,02
0,75	0,105 (+ 0,009/- 0,006)	3,37	0,73	5,31
1	0,142 ($\pm 0,006$)	4,55	0,98	7,16
1,5	0,144 (+ 0,011/- 0,008)	4,62	1,00	7,27
2	0,160 ($\pm 0,015$)	5,13	1,11	8,07
2,5	0,183 (+ 0,007/- 0,005)	5,87	1,27	9,24
4	0,209 ($\pm 0,019$)	6,71	1,45	10,55
7	0,252 (+ 0,017/- 0,014)	8,10	1,75	12,74
10	0,258 ($\pm 0,003$)	8,29	1,79	13,04

Tabelle 4.5 Aktivität und spezifische Aktivität des rekombinanten AtBCAT3-Proteins in den Aminierungsreaktionen mit verschiedenen Ketosäuren. Aktivität = Glutamatmenge in 100 μl / (Reaktionszeit * Reaktionsvolumen); Spezifische Aktivität (Spezif. Aktivität) = Aktivität/Konzentration des rekombinanten AtBCAT4. Spezif. Aktivität (100% AtBCAT4) = Spezif. Aktivität bei einem Einsatz von 100% rekombinanten AtBCAT4 Protein. MTOB-konz., Ketomethylthiobutyratkonzentration; KIC-konz., Ketoisocaproat-konzentration; KMV-konz., Ketomethylvaleratkonzentration; KIV-konz., Ketoisovalerat-konzentration.

Substrate	K_m [mM]	V_{max} [$\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$]
MTOB	1,92 \pm 0,27	21,01 \pm 0,93
KIC	0,14 \pm 0,04	27,42 \pm 2,09
KMV	0,14 \pm 0,03	13,33 \pm 0,68
KIV	1,38 \pm 0,10	14,79 \pm 0,35

Tabelle 4.6 K_m - und V_{max} -Werte der Aminierungskinetiken des rekombinanten AtBCAT3. Es wurden die folgenden Substrate getestet: MTOB, Ketomethylthiobutyrat; KIC, Ketoisocaproat; KMV, Ketomethylvalerat und KIV, Ketoisovalerat.

4.2.2 Etablierung und Molekulargenetische Charakterisierung einer AtBCAT3-T-DNA-Insertionslinie für *in vivo*-Untersuchungen

Um Hinweise auf die Funktion der Branched-Chain Aminotransferase 3 *in vivo* zu erhalten, wurde eine homozygote AtBCAT3-Knock-Out-Mutante etabliert. Die *Arabidopsis*-Linie (GABI Kat 002A11) des GABI-Kat Konsortiums weist eine T-DNA-Insertion im AtBCAT3-Gen auf. PCR-Analysen (*Polymerase Chain Reaction* = Polymerase-Kettenreaktion)

genomischer DNA aus dieser Linie mit genspezifischen Primern und Oligonukleotiden, die spezifisch an die Border-Sequenzen der T-DNA binden, ergaben, dass sich die T-DNA-Insertionsstelle in Exon 4 befindet (Abb. 4.8 A). Die Sequenzierung des PCR-Fragments, das mit einem T-DNA-spezifischen und einem *AtBCAT3*-spezifischen Primer amplifiziert wurde, identifizierte die Insertion an der Position 1276 der cDNA (Transkriptionsstart ATG = +1).

Durch Genotypisierung von Nachkommen dieser T-DNA-Insertionslinie wurde eine homozygote T-DNA-Pflanze (#2) und eine Wildtyp-Pflanze (#1) etabliert.

Um herauszufinden, ob die Transkription des *AtBCAT3*-Gens in der homozygoten T-DNA-Pflanze ausgeschaltet ist, wurde gesamt RNA von Nachkommen der homozygoten und der Wildtyp-Pflanze in einem Northern Blot-Experiment untersucht (Abb. 4.8 B). Das Wildtyp-Transkript wurde mit einer *AtBCAT3*-spezifischen Sonde detektiert, die mit den Oligonukleotiden *bcat3N.1* und *bcat3N.2* amplifiziert wurde. Um sicherzustellen, dass gleiche RNA-Mengen verwendet wurden, wurde die konstitutiv exprimierte 18S rRNA nachgewiesen. In der Wildtyp-Pflanze #1 wurde das ~1,5 kb große *AtBCAT3*-Transkript detektiert (Abb. 4.8 B, #1), während in der Pflanze, die das *bcat3*-T-DNA Allel homozygot trägt (*bcat3-1*), kein entsprechendes Transkript detektierbar ist. In dieser Pflanze wird kein nachweisbares *AtBCAT3*-Transkript gebildet, so dass es sich um eine *AtBCAT3*-Knock-Out-Mutante handelt.

Dieses Ergebnis wurde mit einer zweiten Methode, der RT-PCR (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*) überprüft. Hierzu wurde die gesamt RNA von Nachkommen der homozygoten und der Wildtyp-Pflanze in eine cDNA-Synthese eingesetzt. Die cDNA-Synthese wurde hierbei durch den Primer DTXSC, dessen 3'-Bereich aus 17 Thymidinbasen besteht, initiiert. Damit werden vorwiegend kernkodierte mRNAs mit einem Poly-A-Schwanz am 3'-Ende zu cDNAs transkribiert. Anschließend wurde die cDNA als Ausgangsmaterial für die Amplifikation des *BCAT3*-spezifischen PCR-Produkts mit den Oligonukleotiden *bcat3ue.BamHI* und 3314.2, die den T-DNA Insertionsbereich flankieren, eingesetzt (Abb. 4.8 A). In einer Kontroll-PCR wurde das konstitutiv exprimierte Ubiquitin 10 amplifiziert (*UBQ10.H* und *UBQ.10.R*), um die Qualität der cDNA-Synthese zu überprüfen. Die PCR-Produkte der RT-PCR sind in der Abbildung 4.8 C dargestellt. Mit der RNA der Wildtyp-Pflanze wurde das *AtBCAT3*-spezifische Transkript mit einer erwarteten Größe von 854 bp amplifiziert, hingegen wurde mit der RNA der *bcat3-1* Mutante kein PCR-Produkt generiert. Das Kontroll-Gen Ubiquitin wurde mit der RNA beider Pflanzen gleichermaßen amplifiziert und wird durch ein 500 bp-Fragment repräsentiert. Mit Hilfe dieser Methode wurde ebenfalls

kein *AtBCAT3*-spezifisches Transkript in der *bcat3-1* Mutante nachgewiesen und damit der *AtBCAT3*-Knock-Out bestätigt.

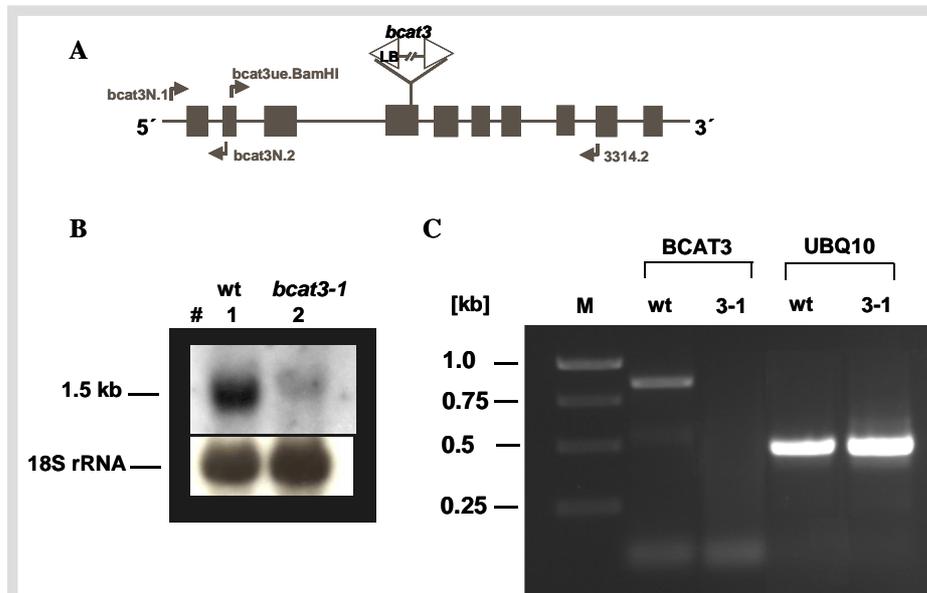


Abbildung 4.8 Etablierung und molekulargenetische Untersuchung einer *AtBCAT3*-T-DNA-Insertionsmutante. **A** Die Skizze zeigt die genomische Struktur des *AtBCAT3*-Gens. Schwarze Boxen stellen die Exons dar, die dazwischen liegenden Striche sind Introns. Die Lage der T-DNA-Insertion in der GABI Kat-Linie 002A11 ist durch die Dreiecke angegeben. Die Pfeile zeigen die Lage von Oligonukleotiden an, die zur Sondenherstellung (*bcat3N.1/bcat3N.2*) für die Northern Blot-Analyse und für die RT-PCR (*bcat3ue.BamHI/3314.2*) verwendet wurden. **B** Northern Blot-Experiment mit gesamt RNA der Wildtyp-Pflanze #1 und der *bcat3-1* Mutante #2. Im Wildtyp wird das 1,5 kb große *AtBCAT3*-Transkript detektiert. Als Ladekontrolle dient die 18S rRNA. **C** RT-PCR-Analyse der *BCAT3* mRNA mit Oligonukleotiden (*bcat3ue.BamHI/3314.2*) (*BCAT3*), die die Insertionsstelle flankieren. Ein etwa 850 bp großes PCR-Fragment, das der erwarteten Größe entspricht, wird mit der cDNA des Wildtyps (wt) amplifiziert, mit der cDNA der Pflanze #2 nicht, da diese homozygot für das *bcat3-1* Allel (3-1) ist. In der Kontroll-PCR wurde das 500 bp-Fragment des Ubiquitin-Gens (*UBQ10*) amplifiziert. Die Länge der DNA-Marker-Fragmente (M) sind in Kilobasenpaaren (kb) angegeben.

4.2.3 Die Metabolit-Analyse der *AtBCAT3*-Knock-Out-Linie zeigt eine Beteiligung von *AtBCAT3* im Primär- und Sekundärmetabolismus

Die Nachkommen der etablierten Wildtyp-Pflanze und der *bcat3-1* Mutante, die beide aus dem Samenpool des GABI Kat-Konsortiums stammen, wurden nun für die Metabolit-Analyse verwendet. Hierbei wurde jeweils die Konzentration freier Aminosäuren und der Glucosinolatgehalt in den Rosettenblättern drei Wochen alter Pflanzen und in den Samen bestimmt. Die Extraktion und Bestimmung der freien Aminosäuren ist unter 3.5.1 und 3.5.2 im Methodenteil beschrieben. Die Isolierung und Quantifizierung der Glucosinolate ist dem Punkt 3.6 zu entnehmen.

Für eine statistische Auswertung wurden die freien Aminosäuren und Glucosinolate (GS) aus sieben Pools mit Rosettenblättern von je 5 Einzelpflanzen bestimmt. Für die Bestimmung der Aminosäuren und Glucosinolate in Samen wurden jeweils 10 Wildtyp-Pflanzen und 8 *bcat3-1* Mutanten untersucht. Die Ergebnisse der Metabolit-Analysen des Wildtyps und der Mutante wurden miteinander verglichen und der Signifikanz-Test, t-Test angewendet, um signifikante Unterschiede zwischen den beiden Pflanzenlinien feststellen zu können. Die signifikanten Unterschiede im Aminosäure- und Glucosinolatgehalt der Wildtyp-Pflanzen und der *bcat3-1* Mutante sind in den Tabellen 4.7-4.9 aufgeführt.

In der AtBCAT3-Knock-Out-Mutante ist der Gesamt-Aminosäuregehalt in Blättern nicht signifikant verändert (Tab. 4.7). Jedoch sind Serin (20 %), Threonin (10 %) und Valin (32 %) eindeutig reduziert. Die Samen-Analysen ergaben keine Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der AtBCAT3-Knock-Out-Mutante (siehe 8.1.1). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass AtBCAT3 möglicherweise an der Biosynthese der verzweigtkettigen Aminosäure Valin beteiligt ist.

Der Gesamt-Glucosinolatgehalt und der Gesamtgehalt an Methionin-abgeleiteten Glucosinolaten im Blattmaterial sind schwach erhöht (Tab. 4.8). Das mengenmäßig in den Blättern dominierende Glucosinolat 4MSOB ist unverändert. 5MSOP ist in der Knock-Out-Mutante 5-fach erhöht, 7MSOH 2-fach und 8MSOO (17 %) gering erhöht. 3MSOP ist das einzige der Methionin-abgeleiteten Glucosinolate, das reduziert ist. 1MOI3M ist als einziges der indolischen Glucosinolate schwach reduziert. Neben den Methionin-abgeleiteten Glucosinolaten wurden in den Rosettenblättern der *bcat3-1* Knock-Out-Mutante Leucin-abgeleitete Glucosinolate detektiert. Diese Glucosinolatspezies sind in Arabidopsis Wildtyp-Pflanzen fast nicht nachweisbar und daher nicht näher untersucht. Das Auftreten und die Funktion dieser Glucosinolate ist bislang ungeklärt. Die Daten aus der *bcat3-1* Knock-Out-Mutante zeigen, dass der Verlust des AtBCAT3 Gens zu einem signifikanten Auftreten an Leucin-abgeleiteten Glucosinolaten führt (Tab. 4.8).

Der Gehalt an Glucosinolaten in den Samen der Wildtyp-Pflanze und der *bcat3-1* Mutante ist in der Tabelle 4.9 dargestellt. In den Samen unterscheidet sich der Gesamt-Glucosinolatgehalt nicht signifikant zwischen Wildtyp und Knock-Out-Mutante. Die Glucosinolate 4OHB (25 %), 4BZO (11 %) und 3BZO (14 %) sind in den Samen der Mutante reduziert. Hingegen sind 5MSOP 3-fach, 5MTP 2,8-fach und 7MTH um 31 % in der Knock-Out-Mutante erhöht. Das einzig detektierbare Indolglucosinolat I3M ist in der Mutante um 50% reduziert. Die Ergebnisse aus den Analysen mit Blattmaterial und Samen weisen darauf hin, dass AtBCAT3

am Stoffwechsel der Methionin-abgeleiteten Glucosinolate in *Arabidopsis* beteiligt sein könnte.

Aminosäuregehalt in Rosettenblättern [nmol/mg getrocknetes Blattmaterial]

Aminosäure	<i>bcat3-1</i>	<i>Arabidopsis Col-0</i>	t-Test
Total	147,92 ± 7,73	158,82 ± 8,13	0,02445
Ser	7,37 ± 0,52	9,21 ± 0,32	0,00000
Thr	5,70 ± 0,42	6,32 ± 0,31	0,00832
Val	0,67 ± 0,03	0,98 ± 0,07	0,00000

Tabelle 4.7 Aminosäuregehalt im Wildtyp (Col-0) aus der GABI Kat-Kollektion und der AtBCAT3-Mutante (*bcat3-1*). Der Aminosäuregehalt ist signifikant unterschiedlich zwischen Wildtyp und Mutante, wenn im t-Test $P < 0,01$. Abkürzungen: Total, Aminosäuregehalt gesamt.

Glucosinolatgehalt in Rosettenblättern [$\mu\text{mol/g}$ getrocknetes Blattmaterial]

Glucosinolat Typ	<i>bcat3-1</i>	<i>Arabidopsis Col-0</i>	t-Test
Total Met GS	41,25 ± 5,57	33,93 ± 3,66	0,01321
Total	46,51 ± 6,13	37,38 ± 3,98	0,00626
3MSOP	2,26 ± 0,33	2,87 ± 0,34	0,00542
4MTB	0,05 ± 0,03	0,09 ± 0,02	0,01481
5MSOP	6,97 ± 0,98	1,20 ± 0,12	0,00000
6MSOH	0,46 ± 0,05	0,15 ± 0,02	0,00000
7MSOH	1,34 ± 0,14	0,56 ± 0,08	0,00000
4MP	1,32 ± 0,16	0,04 ± 0,01	0,00000
5MH	0,54 ± 0,06	0,02 ± 0,00	0,00000
1MOI3M	0,54 ± 0,07	0,89 ± 0,25	0,00374

Tabelle 4.8 Glucosinolatgehalt im Wildtyp (Col-0) aus der GABI Kat-Kollektion und der AtBCAT3-Mutante (*bcat3-1*). Der Glucosinolatgehalt ist zwischen Wildtyp und Mutante signifikant unterschiedlich, wenn im t-Test $P < 0,01$.

Abkürzungen: 3MSOP, 3-Methylsulfinylpropylglucosinolat; 4MTB, 4-Methylthiobutylglucosinolat; 5MSOP, 5-Methylsulfinylpentylglucosinolat; 6MSOH, 6-Methylsulfinylhexylglucosinolat; 7MSOH, 7-Methylsulfinylheptylglucosinolat; 4MP, 4-Methylpentylglucosinolat; 5MH, 5-Methylhexylglucosinolat; 1MOI3M, 1-Methoxyindol-3-ylmethylglucosinolat; Total, Glucosinolate gesamt; Total Met GS, von Methionin abgeleitete Glucosinolate gesamt.

Glucosinolat Typ	Glucosinolatgehalt in Samen [$\mu\text{mol/g}$ Samen]		
	<i>bcat3-1</i>	<i>Arabidopsis Col-0</i>	t-Test
Total Met GS	73,45 \pm 6,79	75,66 \pm 7,97	0,54308
Total	78,59 \pm 6,89	85,84 \pm 8,57	0,07038
3BZO	4,63 \pm 0,43	5,37 \pm 0,60	0,00984
4OHB	2,85 \pm 0,22	3,81 \pm 0,59	0,00054
4BZO	14,31 \pm 0,84	16,15 \pm 0,52	0,00003
4MSOB	0,71 \pm 0,17	0,90 \pm 0,32	0,14931
5MTP	8,21 \pm 0,76	2,95 \pm 0,28	0,00000
5MSOP	0,43 \pm 0,07	0,15 \pm 0,04	0,00000
7MTH	5,43 \pm 0,95	4,13 \pm 0,78	0,00571
7MSOH	1,23 \pm 0,28	0,90 \pm 0,25	0,01555
I3M	5,14 \pm 2,65	10,19 \pm 1,18	0,00006

Tabelle 4.9 Glucosinolatgehalt im Wildtyp (Col-0) aus der GABI Kat-Kollektion und der AtBCAT3-Mutante (*bcat3-1*). Der Glucosinolatgehalt ist zwischen Wildtyp und Mutante signifikant unterschiedlich, wenn im t-Test $P < 0,01$.

Abkürzungen: 3BZO, 3-Benzoyloxypropylglucosinolat; 4OHB, 4-Hydroxybutylglucosinolat; 4BZO, 4-Benzoyloxybutylglucosinolat; 4MSOB, 4-Methylsulfinylbutylglucosinolat; 5MTP, 5-Methylthiopentylglucosinolat; 5MSOP, 5-Methylsulfinylpentylglucosinolat; 7MTH, 7-Methylthioheptylglucosinolat; 7MSOH, 7-Methylsulfinylheptylglucosinolat; I3M, Indol-3-ylmethylglucosinolat; Total, Glucosinolate gesamt; Total Met GS, von Methionin abgeleitete Glucosinolate gesamt.

4.3 Untersuchung einer AtBCAT3/AtBCAT4-Doppel-Knock-Out-Mutante

Die Reduktion des Gesamt-Glucosinolatgehalts in der *bcat4-1* und *bcat4-2* Mutante um ~50 % weist deutlich auf eine Beteiligung der cytosolischen Branched-Chain Aminotransferase 4 an der Glucosinolatbiosynthese hin [Schuster et al., 2006]. Die Metabolit-Analyse der *bcat3-1* Mutante im vorangegangenen Abschnitt 4.2.3 ergab, dass AtBCAT3 aufgrund der Veränderungen im Glucosinolat-Spektrum der Mutante, ein weiterer Kandidat für die Katalyse der Transaminierungsreaktionen im Kettenverlängerungszyklus der Biosynthese dieser Sekundärmetabolite sein könnte. Weitere Anhaltspunkte zur Funktion des AtBCAT3-Proteins sollte eine AtBCAT3/AtBCAT4-Doppel-Knock-Out-Mutante liefern.

4.3.1 Etablierung und Charakterisierung einer homozygoten AtBCAT3/AtBCAT4-Doppel-Knock-Out-Mutante

Die Kreuzung der *bcat3-1* Mutante (GABI Kat 002A11) mit der *bcat4-2* Mutante (GABI Kat 163D11) wurde bereits vor dem Beginn dieser Arbeit durchgeführt. Die Nachkommen der gekreuzten Knock-Out Mutanten wurden zunächst mittels PCR-Analysen auf das Vorhandensein der beiden T-DNA-Insertionen untersucht. In der F1-Generation wurde eine Pflanze identifiziert, die wie erwartet, für beide T-DNA-Allele heterozygot ist. Nach einer Selbstung wurden die Nachkommen dieser Pflanze mit den genspezifischen Primern bezüglich der Zygotie der *AtBCAT3* und *-4*-Gene untersucht. Dabei wurde die Pflanze #12 identifiziert, die für die T-DNA-Insertion in *AtBCAT4* homozygot und für die T-DNA-Insertion in *AtBCAT3* heterozygot ist. Diese Pflanze wurde vermehrt und die Nachkommen dann mit *AtBCAT3*-spezifischen Primern in einer PCR analysiert. Hierbei wurden die Pflanzen #2 und #3 gefunden, die auch homozygot für die T-DNA-Insertion in *AtBCAT3* sind. Diese beiden Pflanzen sind homozygot für beide T-DNA-Allele. Abschließend wurden die T-DNA-Insertionen in *AtBCAT3* und *-4* nochmals über PCR nachgewiesen. Diese Analysen bestätigten, dass es sich bei den Pflanzen #2 und #3 um *AtBCAT3/AtBCAT4*-Doppel-Knock-Out Mutanten handelt.

4.3.2 Metabolit-Analyse der Doppel-Knock-Out-Mutante

Die Nachkommen der *AtBCAT3/AtBCAT4*-Doppel-Knock-Out-Mutante #3 und die Nachkommen der *Arabidopsis* Wildtyp-Linien, die jeweils aus dem Samenpool der *bcat3-1* und *bcat4-2* Mutante aus der GABI Kat-Kollektion etabliert wurden, wurden hinsichtlich ihres Aminosäure- und Glucosinolatgehalts untersucht.

Die Herstellung der Aminosäure- und Glucosinolatextrakte, sowie die quantitative Bestimmung dieser Metabolite ist unter den Punkten 3.5 und 3.6 ausführlich beschrieben. Für eine statistische Auswertung wurden die Rosettenblätter von 52 *AtBCAT3/AtBCAT4*-Knock-Out-Pflanzen und jeweils 36 Wildtyp-Pflanzen untersucht. Für die Metabolit-Analyse der Samen wurden 10 Mutanten und je 6 Wildtyp-Pflanzen verwendet. Die Aminosäure- und Glucosinolatkonzentrationen der Doppelmutante wurden jeweils mit denen der Wildtyp-Pflanzen in einem t-Test verglichen. Ist die Wahrscheinlichkeit P kleiner als 0,01, so handelt es sich um einen signifikanten Unterschied.

In der Tabelle 4.10 sind die Aminosäurekonzentrationen in Rosettenblättern der Doppel-Knock-Out-Pflanze und der Wildtyp-Pflanze aus dem Samenpool der *bcat4-2* Mutante (GABI Kat 163D11) gegenübergestellt. Der Vergleich der Metabolit-Daten der Doppel-Mutante mit denen des Wildtyps aus dem Samenpool der *bcat3-1* Mutante (GABI Kat 002A11) hat ähnliche Ergebnisse ergeben.

Das Aminosäure-Profil der Doppel-Mutante weist viele signifikante Veränderungen auf. Die stärksten Erhöhungen zeigen sich im Methioningehalt (25-fach) und im Gehalt des S-Methylmethionins (SMM). SMM entspricht einem Methionin mit einer zusätzlichen Methylengruppe am Schwefelatom. Für SMM, das im Wildtyp in kaum detektierbaren Mengen enthalten ist, wurde in der Mutante eine Konzentration von $1,16 \pm 0,33$ nmol/mg gemessen. Der Gesamt-Aminosäuregehalt erreicht in der AtBCAT3/AtBCAT4-Doppel-Knock-Out Mutante 88 % des Gehaltes im Wildtyp. Dies ist hauptsächlich auf die Reduktion von Glutamin um ~30 % zurückzuführen, da diese Aminosäure mengenmäßig in den Blättern überwiegt. Außerdem ist Valin, ähnlich wie in der *bcat3-1* Mutante, um ~21 % reduziert.

In den Samen führt der Ausfall der Aminotransferasen AtBCAT3 und AtBCAT4 zu einem 4-fachen Anstieg des Gesamt-Aminosäuregehalts (Tab. 4.11). Es sind alle analysierten Aminosäuren, ausgenommen Glutaminsäure und Phenylalanin sind in der Mutante erhöht. SMM bildet mit einer Konzentration von $15,57 \pm 2,08$ μ mol/g Samen den Hauptanteil der freien Aminosäuren in den Samen. Die Aminosäuren Arginin (10-fach), Histidin (18,4-fach) und Isoleucin (22,8-fach) sind in der Doppel-Mutante ebenfalls sehr stark angereichert.

Deutliche Veränderungen sind ebenfalls im Glucosinolat-Spektrum sowohl in den Rosettenblättern als auch in den Samen der Mutante zu erkennen (Tab. 4.12 und 4.13). Der Gehalt an Methionin-abgeleiteten Glucosinolaten ist in beiden Pflanzengewebe stark reduziert. In den Blättern erreichen die Methionin-abgeleiteten Glucosinolate nur 44 % und in den Samen 28 % des Wildtyp-Gehalts.

In den Rosettenblättern sind bis auf 5MSOP, das in der Mutante 3-fach erhöht ist, alle Methionin-abgeleiteten Glucosinolate reduziert (Tab. 4.12). Die im Wildtyp kaum nachweisbaren Leucin-abgeleiteten Glucosinolate 4MP und 5MH weisen in der Doppel-Mutante höhere Konzentrationen als in der *bcat3-1* Einzel-Mutante auf. 5MH erreicht dabei 75 % des Gehaltes an 4MSOB, dem mengenmäßig häufigsten Glucosinolat in den Rosettenblättern. Unter den indolischen Glucosinolaten in der Mutante gibt es Spezies, deren Gehalte in der Mutante leicht reduziert sind (1MOI3M und 4MOI3M). Außerdem sind einige Spezies bis zu 2,6-fach erhöht (I3M und 4OHI3M).

In den Samen der *bcat3-1/bcat4-2* Mutante ist 4MTP, das den Hauptanteil des Glucosinolatgehalts in diesem Gewebe bildet, bis auf 10 % des Gehalts in den Wildtyp-Pflanzen reduziert (Tab. 4.13). Die Konzentrationen der Methionin-abgeleiteten Glucosinolate sind in der Doppel-Mutante mit Ausnahme von 2MSOE und der C5-Glucosinolate reduziert. Das Glucosinolat 2MSOE wird direkt ohne Kettenverlängerung von Methionin abgeleitet und erreicht in der Mutante eine Konzentration von $1,53 \pm 0,20 \mu\text{mol/g}$ Samen. Außerdem findet man in den Samen der Mutante das Leucin-abgeleitete Glucosinolat 5MH. Im Wildtyp-Samen hingegen sind 2MSOE und 5MH in nicht ausreichend detektierbaren Mengen vorhanden. Die verglichen mit der *bcat4* Einzel-Mutante stärkere Reduktion des Glucosinolatgehaltes in der *bcat3-1/bcat4-2* Doppel-Mutante deutet daraufhin, dass AtBCAT3 beim Ausfall von AtBCAT4 die initiale Transaminierung zur Gewinnung des Grundbausteins MTOB der Glucosinolatbiosynthese katalysiert und somit an der Glucosinolatbiosynthese beteiligt ist.

Aminosäuregehalt in Rosettenblättern [nmol/mg getrocknetes Blattmaterial]

Aminosäure	<i>bcat3-1/bcat4-2</i>	<i>A. thaliana</i> Col-0	t-Test
Total	236,76 \pm 20,88	270,04 \pm 13,51	0,00832
Ala	9,16 \pm 1,45	10,00 \pm 0,81	0,24389
Arg	1,74 \pm 0,46	0,82 \pm 0,09	0,00072
Asn	10,08 \pm 1,01	10,56 \pm 0,86	0,39513
Asp	22,24 \pm 1,41	18,88 \pm 1,16	0,00115
Gln	113,12 \pm 11,92	159,84 \pm 10,23	0,00003
Glu	44,64 \pm 3,14	43,68 \pm 1,80	0,53032
Gly	5,48 \pm 1,12	6,24 \pm 1,08	0,25931
His	1,02 \pm 0,26	0,40 \pm 0,06	0,00020
Ile	0,36 \pm 0,19	0,24 \pm 0,00	0,14493
Leu	0,60 \pm 0,11	0,36 \pm 0,00	0,00027
Lys	0,82 \pm 0,14	0,70 \pm 0,09	0,10861
Met	3,04 \pm 0,79	0,12 \pm 0,00	0,00000
Phe	0,58 \pm 0,09	0,38 \pm 0,05	0,00076
Ser	13,76 \pm 0,78	11,52 \pm 0,61	0,00025
SMM	1,16 \pm 0,33	0,00 \pm 0,00	0,00001
Thr	7,48 \pm 1,44	4,84 \pm 0,51	0,00174
Trp	0,02 \pm 0,05	0,00 \pm 0,00	0,34089
Tyr	0,18 \pm 0,10	0,14 \pm 0,05	0,40103
Val	0,82 \pm 0,09	1,04 \pm 0,10	0,00235

Tabelle 4.10 Aminosäuregehalt im Wildtyp (Col-0) aus der GABI Kat-Kollektion 163D11 und der AtBCAT3/AtBCAT4-Doppel-Knock-Out-Mutante. Der Aminosäuregehalt ist signifikant unterschiedlich zwischen Wildtyp und Mutante, wenn im t-Test $P < 0,01$. Abkürzungen: Total, Aminosäuren gesamt; SMM, S-Methylmethionin.

Aminosäure	Aminosäuregehalt in Samen [$\mu\text{mol/g}$ Samen]		
	<i>bcat3-1/bcat4-2</i>	<i>A. thaliana</i> Col-0	t-Test
Total	51,41 \pm 6,09	13,13 \pm 1,42	0,00000
Ala	1,44 \pm 0,41	0,90 \pm 0,51	0,03173
Arg	6,82 \pm 1,48	0,68 \pm 0,09	0,00000
Asn	5,89 \pm 0,87	2,81 \pm 0,32	0,00000
Asp	2,01 \pm 0,26	1,34 \pm 0,22	0,00006
Gln	2,38 \pm 1,85	0,43 \pm 0,21	0,01438
Glu	3,90 \pm 0,68	4,46 \pm 0,72	0,11948
Gly	1,40 \pm 0,40	0,37 \pm 0,11	0,00001
His	1,84 \pm 0,38	0,10 \pm 0,02	0,00000
Ile	3,64 \pm 0,98	0,16 \pm 0,03	0,00000
Leu	0,69 \pm 0,16	0,09 \pm 0,03	0,00000
Met	0,22 \pm 0,06	0,05 \pm 0,02	0,00001
Phe	0,31 \pm 0,04	0,31 \pm 0,05	0,99727
Ser	2,64 \pm 0,49	0,52 \pm 0,06	0,00000
SMM	15,57 \pm 2,08	0,00 \pm 0,00	0,00000
Thr	0,76 \pm 0,44	0,25 \pm 0,05	0,00871
Trp	0,44 \pm 0,13	0,27 \pm 0,05	0,00644
Tyr	0,18 \pm 0,03	0,08 \pm 0,03	0,00000
Val	1,29 \pm 0,24	0,29 \pm 0,05	0,00000

Tabelle 4.11 Aminosäuregehalt im Wildtyp (Col-0) aus der GABI Kat Kollektion (163D11) und der AtBCAT3/AtBCAT4- Doppel-Mutante. Der Aminosäuregehalt ist signifikant unterschiedlich zwischen Wildtyp und Mutante, wenn im t-Test $P < 0,01$. Abkürzungen: Total, Aminosäuren gesamt; SMM, S-Methylmethionin.

Glucosinolat Typ	Glucosinolatgehalt in Rosettenblättern [$\mu\text{mol/g}$ getrocknetes Blattmaterial]		
	<i>bcat3-1/bcat4-2</i>	<i>Arabidopsis</i> Col-0	t-Test
Total Met GS	17,32 \pm 3,61	39,57 \pm 3,09	0,00000
Total	40,42 \pm 9,52	46,45 \pm 2,94	0,16554
3MSOP	1,17 \pm 0,27	3,47 \pm 0,25	0,00000
4MTB	0,59 \pm 0,12	1,65 \pm 0,21	0,00000
4MSOB	11,69 \pm 2,45	29,24 \pm 2,21	0,00000
5MSOP	3,01 \pm 0,64	0,91 \pm 0,08	0,00001
7MSOH	0,09 \pm 0,02	0,57 \pm 0,06	0,00000
8MSOO	0,65 \pm 0,17	3,68 \pm 0,42	0,00000
4MP	3,91 \pm 1,10	0,00 \pm 0,00	0,00000
5MH	8,76 \pm 2,59	0,00 \pm 0,00	0,00001
I3M	8,89 \pm 1,82	4,91 \pm 0,19	0,00026
1MOI3M	0,92 \pm 0,39	1,26 \pm 0,50	0,20083
4MOI3M	0,62 \pm 0,11	0,72 \pm 0,03	0,05991
4OHI3M	0,12 \pm 0,05	0,05 \pm 0,02	0,00962

Table 4.12 Glucosinolatgehalt in den Rosettenblättern des Wildtyps (Col-0) aus der GABI Kat-Kollektion (163D11) und der *bcat3-1/bcat4-2* Mutante. Der Glucosinolatgehalt ist zwischen Wildtyp und Mutante signifikant unterschiedlich, wenn im t-Test $P < 0,01$.

Abkürzungen: 3MSOP, 3-Methylsulfinylpropylglucosinolat; 4MTB, 4-Methylthiobutylglucosinolat; 4MSOB, 4-Methylsulfinylbutylglucosinolat; 5MSOP, 5-Methylsulfinylpentylglucosinolat; 7MSOH, 7-Methylsulfinylheptylglucosinolat; 8MSOO, 8-Methylsulfinyloctylglucosinolat; 4MP, 4-Methylpentylglucosinolat; 5MH, 5-Methylhexylglucosinolat; I3M, Indol-3-ylmethylglucosinolat; 1MOI3M, 1-Methoxyindol-3-ylmethylglucosinolat; 4MOI3M, 4-Methoxyindol-3-ylmethylglucosinolat; Total, Glucosinolate gesamt; Total Met GS, von Methionin abgeleitete Glucosinolate gesamt.

Glucosinolatgehalt in Samen [$\mu\text{mol/g}$ Samen]			
Glucosinolat Typ	<i>bcat3-1/bcat4-2</i>	<i>Arabidopsis</i> Col-0	t-Test
Total Met GS	23,51 \pm 4,34	84,14 \pm 9,99	0,00000
Total	29,70 \pm 4,75	86,60 \pm 9,73	0,00000
2MSOE	1,53 \pm 0,20	0,00 \pm 0,00	0,00000
3OHP	0,22 \pm 0,07	1,00 \pm 0,28	0,00000
3BZO	0,54 \pm 0,17	4,55 \pm 0,46	0,00000
4OHB	1,17 \pm 0,31	5,18 \pm 0,36	0,00000
4MTB	3,30 \pm 0,83	34,00 \pm 5,49	0,00000
4BZO	2,75 \pm 0,68	14,37 \pm 1,47	0,00000
4MSOB	2,70 \pm 0,72	1,64 \pm 0,38	0,00901
5MTP	5,00 \pm 0,71	3,34 \pm 0,48	0,00043
5BZO	0,20 \pm 0,04	0,11 \pm 0,02	0,00059
5MSOP	3,02 \pm 0,51	0,24 \pm 0,07	0,00000
6MSOH	0,09 \pm 0,01	0,10 \pm 0,04	0,36608
7MTH	0,38 \pm 0,05	4,00 \pm 0,74	0,00000
7MSOH	0,11 \pm 0,03	0,94 \pm 0,33	0,00000
8MTO	0,81 \pm 0,16	6,73 \pm 1,01	0,00000
8MSOO	1,68 \pm 0,23	7,92 \pm 1,66	0,00000
5MH	2,30 \pm 0,37	0,02 \pm 0,00	0,00000
I3M	3,71 \pm 0,42	2,36 \pm 0,46	0,00007
4MOI3M	0,18 \pm 0,04	0,10 \pm 0,03	0,00146

Table 4.13 Glucosinolatgehalt in den Samen des Wildtyps (Col-0) aus der GABI Kat-Kollektion (163D11) und der *bcat3-1/bcat4-2* Mutante. Der Glucosinolatgehalt ist zwischen Wildtyp und Mutante signifikant unterschiedlich, wenn im t-Test $P < 0,01$.

Abkürzungen: 2MSOE, 2-Methylsulfinylethylglucosinolat; 3OHP, 3-Hydroxypropylglucosinolat; 3BZO, 3-Benzoyloxypropylglucosinolat; 4OHB, 4-Hydroxybutylglucosinolat; 4MTB, 4-Methylthiobutylglucosinolat; 4BZO, 4-Benzoyloxybutylglucosinolat; 4MSOB, 4-Methylsulfinylbutylglucosinolat; 5MTP, 5-Methylthiopentylglucosinolat; 5BZO, 5-Benzoyloxypropylglucosinolat; 5MSOP, 5-Methylsulfinylpentylglucosinolat; 6MSOH, 6-Methylsulfinylhexylglucosinolat; 7MTH, 7-Methylthioheptylglucosinolat; 7MSOH, 7-Methylsulfinylheptylglucosinolat; 8MTO, 8-Methylthiooctylglucosinolat; 8MSOO, 8-Methylsulfinyloctylglucosinolat; 5MH, 5-Methylhexylglucosinolat; I3M, Indol-3-ylmethylglucosinolat; 4MOI3M, 4-Methoxyindol-3-ylmethylglucosinolat; Total, Glucosinolate gesamt; Total Met GS, von Methionin abgeleitete Glucosinolate gesamt.

4.4 Fütterungsversuche an verschiedenen AtBCAT-Knock-Out-Mutanten

In der *bcat3-1* Knock-Out-Mutante wurde gezeigt, dass der Verlust des *AtBCAT3* Gens zu einem signifikanten Auftreten von Leucin-abgeleiteten Glucosinolaten führt (Tab. 4.5). Zudem lässt der reduzierte Valinehalt in der *bcat3-1* Mutante darauf schließen, dass BCAT3 an der Valin-Biosynthese beteiligt ist. Betrachtet man die Biosynthesewege der verzweigtkettigen Aminosäuren, so würde man in der Mutante eine Zunahme an Leucin erwarten, da Ketosäuren aus der nicht vollendeten Valin-Synthese zusätzlich für die Leucin-Synthese zur Verfügung stehen. In der Mutante wurde jedoch kein erhöhter Leucingehalt detektiert. Diese Beobachtung führt zu der Annahme, dass in der *AtBCAT3*-Knock-Out-Mutante insgesamt zwar mehr Leucin gebildet wird, der Überschuss an dieser Aminosäure jedoch zu Leucin-abgeleiteten Glucosinolaten umgesetzt wird. Zudem ist bekannt, dass die Gabe verschiedener Aminosäuren zu Wachstumshemmungen führt. Um zu untersuchen, ob und wie sich die *Arabidopsis*-Pflanzen an solche veränderten Bedingungen anpassen, wurden Fütterungsversuche nach der unter 3.4 beschriebenen Methode durchgeführt. In den Versuchen wurden drei Ansätze gewählt, bei denen die Verabreichung der Aminosäuren über unterschiedliche Zeiträume erfolgte. Die anschließend bestimmten Glucosinolate und Aminosäuren sollen Aufschluss darüber geben, ob die Pflanzen überschüssige Aminosäuren in entsprechende Glucosinolate umsetzen und ob die Pflanzen schnelle und/oder längerfristige Anpassungsmechanismen an diese veränderten Bedingungen besitzen. Die Extraktion und Bestimmung der freien Aminosäuren und Glucosinolate erfolgte nach den unter 3.5 und 3.6 beschriebenen Methoden.

4.4.1 Aminosäure- und Glucosinolatgehalt in Blättern nach einmaliger Gabe von Aminosäuren

Für diesen Kurzzeit-Gießversuch wurden 3 Wochen alte Wildtyp- und *AtBCAT3*-Knock-Out-Pflanzen einmalig mit einer 2 mM Aminosäure-Lösung (jeweils Valin, Leucin, Isoleucin und bidestilliertes Wasser als Kontrolle) gegossen und die Rosettenblätter 4,5 h nach der Zugabe geerntet. Die Aminosäure-Profile beider Linien zeigten, dass die jeweils verabreichten verzweigtkettigen Aminosäuren akkumulieren und im Falle der Fütterung mit Leucin eine geringe Abnahme an Valin zu beobachten ist (Tab. 4.14 und Tab. 4.15). Der Gehalt weiterer proteinogener Aminosäuren ist nicht verändert. Das Glucosinolat-Spektrum weist kaum

signifikante bzw. substantielle Veränderungen auf (Tab. 4.16 und Tab. 4.17). Die Leucin-abgeleiteten Glucosinolate sind aufgrund der Aminosäure-Gabe nicht stärker akkumuliert. Die Anreicherung der jeweils verabreichten Aminosäure und das Nichtauftreten (im Wildtyp) bzw. der gleichbleibende Gehalt an Leucin-abgeleiteten Glucosinolaten in der AtBCAT3-Mutante deutet darauf hin, dass Leucin und Isoleucin bis zu einer bestimmten Konzentration akkumuliert werden können. Eine verstärkte Biosynthese von Leucin-abgeleiteten Glucosinolaten wurde in den Pflanzen nach einmaliger Fütterung mit Aminosäuren nicht ausgelöst.

Die Ergebnisse dieses Kurzzeit-Gießversuchs weisen darauf hin, dass in den Pflanzen aufgrund des beschränkten bzw. kurzzeitigen Überschuss an verzweigtkettigen Aminosäuren die jeweils verabreichte Aminosäure verstärkt akkumuliert wird.

Aminosäuregehalt in Rosettenblättern [nmol/mg getrocknetes Blattmaterial]

Aminosäure	Col-0 Ile	Col-0 Leu	Col-0 Val	Col-0 Kontrolle
Total	139,18 ± 30,94	133,90 ± 12,87	143,86 ± 8,41	135,72 ± 2,79
Ile	3,67 ± 1,06	0,28 ± 0,07	0,30 ± 0,03	0,25 ± 0,01
Leu	0,27 ± 0,05	1,50 ± 0,33	0,36 ± 0,07	0,20 ± 0,03
Ser	7,42 ± 1,57	7,68 ± 0,81	9,00 ± 0,31	8,02 ± 0,30
Val	0,85 ± 0,12	0,61 ± 0,06	2,23 ± 0,30	0,86 ± 0,02

Tabelle 4.14 Aminosäuregehalt in Rosettenblättern des *Arabidopsis* Wildtyps Columbia (Col-0) 4,5 h nach Verabreichung der Aminosäuren Ile, Leu und Val. Die Tabelle zeigt den Gesamt-Aminosäuregehalt (Total), sowie den Gehalt an Aminosäuren, die signifikante Unterschiede zur Kontrolle aufwiesen.

Aminosäuregehalt in Rosettenblättern [nmol/mg getrocknetes Blattmaterial]

Aminosäure	<i>bcat3-1</i> Ile	<i>bcat3-1</i> Leu	<i>bcat3-1</i> Val	<i>bcat3-1</i> Kontrolle
Total	178,03 ± 10,73	174,45 ± 8,73	169,61 ± 6,63	153,87 ± 9,01
Gln	77,70 ± 6,17	79,64 ± 5,70	78,54 ± 3,00	68,22 ± 4,45
Gly	3,65 ± 0,74	3,31 ± 0,54	2,49 ± 0,24	2,24 ± 0,16
Ile	6,53 ± 1,86	0,34 ± 0,06	0,37 ± 0,07	0,30 ± 0,03
Leu	0,64 ± 0,09	3,28 ± 1,08	0,48 ± 0,15	0,40 ± 0,08
Met	0,03 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01
SMM	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Thr	9,82 ± 0,38	6,47 ± 0,35	6,50 ± 0,29	6,32 ± 0,25
Val	0,69 ± 0,06	0,50 ± 0,11	2,55 ± 0,44	0,70 ± 0,04

Tabelle 4.15 Aminosäuregehalt in Rosettenblättern des *bcat3-1* Mutante 4,5 h nach Verabreichung der Aminosäuren Ile, Leu und Val. Die Tabelle zeigt den Gesamt-Aminosäuregehalt (Total), sowie den Gehalt an Aminosäuren, die signifikante Unterschiede zur Kontrolle aufwiesen. SMM, S-Methylmethionin.

Glucosinolatgehalt in Rosettenblättern [$\mu\text{mol/g}$ getrocknetes Blattmaterial]

Glucosinolat Typ	Col-0 Ile	Col-0 Leu	Col-0 Val	Col-0 Kontrolle
Total Met GS	21,93 \pm 1,35	18,77 \pm 1,77	20,98 \pm 0,87	19,41 \pm 1,83
Total	24,12 \pm 1,11	21,11 \pm 1,83	23,26 \pm 1,01	21,17 \pm 1,12
4MP	0,03 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01	0,02 \pm 0,00
5MH	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00

Tabelle 4.16 Glucosinolatgehalt in Rosettenblättern des *Arabidopsis* Wildtyps Columbia (Col-0) 4,5 h nach der Verabreichung von Ile, Leu, Val. Die Gesamt-Glucosinolatgehalte sind unverändert. Die Gabe der verzweigtkettigen Aminosäuren führt zu keiner Anhäufung der Leucin-abgeleiteten Glucosinolate, 4MP und 5MH.

Abkürzungen: 4MP, 4-Methylpentylglucosinolat; 5MH, 5-Methylhexylglucosinolat; Total Met GS, Methionin-abgeleitete Glucosinolate gesamt; Total, Glucosinolate gesamt.

Glucosinolatgehalt in Rosettenblättern [$\mu\text{mol/g}$ getrocknetes Blattmaterial]

Glucosinolat Typ	<i>bcat3-1</i> Ile	<i>bcat3-1</i> Leu	<i>bcat3-1</i> Val	<i>bcat3-1</i> Kontrolle
Total Met GS	22,73 \pm 1,32	20,82 \pm 0,95	19,93 \pm 0,63	19,80 \pm 0,31
Total	25,98 \pm 1,40	24,22 \pm 1,24	22,81 \pm 0,68	22,93 \pm 0,48
3MSOP	1,19 \pm 0,06	1,09 \pm 0,07	0,99 \pm 0,09	1,01 \pm 0,05
4MSOP	15,22 \pm 0,90	13,90 \pm 0,79	12,98 \pm 0,78	12,99 \pm 0,36
5MSOP	3,80 \pm 0,26	3,52 \pm 0,20	3,44 \pm 0,22	3,29 \pm 0,04
7MSOH	0,66 \pm 0,04	0,62 \pm 0,01	0,68 \pm 0,05	0,67 \pm 0,02
4MP	0,64 \pm 0,10	0,79 \pm 0,13	0,63 \pm 0,04	0,65 \pm 0,11
5MH	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00

Tabelle 4.17 Glucosinolatgehalt in Rosettenblättern der *bcat3-1* Mutante 4,5 h nach der Verabreichung von Ile, Leu, Val. Die Gesamt-Glucosinolatgehalte sind kaum verändert. Die Gabe der verzweigtkettigen Aminosäuren führt zu keiner Anhäufung der Leucin-abgeleiteten Glucosinolate, 4MP und 5MH in der Mutante.

Abkürzungen: 3MSOP, 3-Methylsulfinylpropylglucosinolat; 4MSOB, 4-Methylsulfinylbutylglucosinolat; 5MSOP, 5-Methylsulfinylpentylglucosinolat; 7MSOH, 7-Methylsulfinylheptylglucosinolat; 4MP, 4-Methylpentylglucosinolat; 5MH, 5-Methylhexylglucosinolat; Total Met GS, Methionin-abgeleitete Glucosinolate gesamt; Total, Glucosinolate gesamt.

Die einmalige Gabe von Aminosäuren wurde in einem weiteren Fütterungsversuch an der *bcat4-2* Mutante untersucht. Der Funktionsverlust des AtBCAT4-Proteins in der Mutante führt zu einer Reduktion des Gesamt-Glucosinolatgehalts um etwa 50 %. Gleichzeitig sind Methionin und dessen Transportform S-Methylmethionin (SMM) stark erhöht. Nachdem Methionin eine zentrale Rolle im Zellstoffwechsel einnimmt, wäre es denkbar, dass freies Methionin nicht unbegrenzt akkumuliert werden kann. Um die Homöostasis dieser Aminosäure wiederherzustellen, könnte das angehäuften Methionin für die Biosynthese Methionin-abgeleiteter Glucosinolate genutzt werden. Um die Auswirkungen auf das

Metabolprofil der Pflanzen bei einer erhöhten Methionin-Zufuhr näher zu untersuchen, wurde Wildtyp-Pflanzen und *bcat4-2* Mutanten Methionin im Gießwasser verabreicht.

Für diesen Gießversuch wurden 3 Wochen alte Wildtyp- und *bcat4-2* Knock-Out-Pflanzen einmalig mit einer 2 mM Aminosäure-Lösung (Methionin und bidestilliertes Wasser als Kontrolle) gegossen und die Rosettenblätter 4,5 h nach der Verabreichung geerntet.

Beide Pflanzenlinien zeigen eine etwa 4-fach erhöhte Akkumulation von freiem Methionin verglichen mit den Kontrollpflanzen (Tab. 4.18). Das Methionin-Derivat S-Methylmethionin ist ebenfalls im Wildtyp und in der Mutante erhöht. In der *bcat4-2* Mutante findet man einen um 70 % gesteigerten Gehalt an SMM und im Wildtyp erreicht der SMM-Gehalt, der in der Kontrollpflanze in nicht detektierbarer Menge vorliegt, $0,63 \pm 0,11$ nmol/mg gefriergetrocknetes Blattmaterial. Der Gehalt an Serin im Wildtyp um 27 % und in der Mutante um 47 % erhöht. Zudem ist in der Mutante Glycin um 44 % stärker akkumuliert. Der Gehalt weiterer Aminosäuren ist unverändert. Das Glucosinolat-Spektrum der beiden untersuchten Pflanzen weist keine signifikanten Veränderungen auf (Daten nicht gezeigt). Sowohl der *A. thaliana* Wildtyp als auch die *bcat4-2* Mutante akkumulieren Methionin und SMM als unmittelbare Antwort auf die Methionin-Gabe.

Aminosäuregehalt in Rosettenblättern [nmol/mg getrocknetes Blattmaterial]

Aminosäure	Col-0 Met	Col-0 Kontrolle	<i>bcat4-2</i> Met	<i>bcat4-2</i> Kontrolle
Total	225,15 ± 24,34	207,09 ± 9,80	208,92 ± 7,46	205,53 ± 11,46
Gly	1,74 ± 0,21	1,92 ± 0,35	2,16 ± 0,17	1,50 ± 0,21
Met	0,84 ± 0,26	0,12 ± 0,00	1,65 ± 0,46	0,45 ± 0,11
Ser	15,12 ± 2,13	11,28 ± 0,92	18,00 ± 1,44	12,24 ± 1,64
SMM	0,63 ± 0,11	0,00 ± 0,00	0,87 ± 0,18	0,51 ± 0,15

Tabelle 4.18 Aminosäuregehalt in Rosettenblättern des *Arabidopsis* Wildtyps (Col-0) und der *bcat4-2* Mutante 4,5 h nach der Methionin-Gabe. Die Tabelle zeigt den Gesamt-Aminosäuregehalt (Total), sowie den Gehalt an Aminosäuren, die signifikante Unterschiede zur Kontrolle aufwiesen. SMM, S-Methylmethionin.

4.4.2 Metabolit-Analysen an Blättern nach mehrmaliger Gabe von Aminosäuren

Um die Auswirkungen einer mehrfachen Gabe von Aminosäuren auf das Glucosinolat- und Aminosäure-Spektrum zu untersuchen, wurde ein zweiter Versuchsansatz gewählt. Hierfür wurden in einem zweiten Gießversuch 2 Wochen alte Wildtyp- und AtBCAT3-Knock-Out-Pflanzen eine Woche lang jeden zweiten Tag mit einer Aminosäure-Lösung (jeweils 2 mM

Valin, Leucin, Isoleucin und bidestilliertes Wasser als Kontrolle) gegossen und die Rosettenblätter 24 h nach der letzten Aminosäure-Gabe geerntet. Zudem wurde in diesem Gießversuch die *bcat3-1/bcat4-2* Doppel-Mutante untersucht, da in dieser eine stärkere Akkumulation der Leucin-abgeleiteten Glucosinolate als in der *bcat3-1* Mutante beobachtet werden kann (Tab. 4.12 und Tab. 4.13). Dies lässt vermuten, dass in der *bcat3-1/bcat4-2* Mutante ein stärkerer Überschuss an Leucin vorliegt. In einem weiteren Experiment wurde die Doppel-Mutante und die Wildtyp-Pflanzen mit Methionin-versetztem Gießwasser gegossen.

Die mehrmalige Gabe von Valin und Leucin führt in der *bcat3-1* Mutante und im Wildtyp zu einer Erhöhung des Gesamt-Aminosäuregehalts, was in der *bcat3-1/bcat4-2* Mutante nicht der Fall ist (Tab. 4.19-4.21). Die Erhöhung des Gesamt-Aminosäuregehalts im Wildtyp ist auf den Anstieg der Aminosäuren Ala, Asn, Asp, Gln und Glu zurückzuführen (Tab. 4.19). Dies verhält sich in der *bcat3-1* Mutante ähnlich, wobei keine signifikanten Änderungen im Glutamat- und Aspartatgehalt zu beobachten sind (Tab. 4.20). Die Akkumulationen der jeweils verabreichten verzweigtkettigen Aminosäure sind im Wildtyp und in der *bcat3-1* Mutante sehr geringfügig erhöht. Hingegen führt die Fütterung der verzweigtkettigen Aminosäuren in der Doppel-Mutante jeweils zur signifikanten Erhöhung von Val, Ile und Leu (Tab. 4.21). Außerdem ist jeweils der Lysingehalt nach der Gabe der verzweigtkettigen Aminosäuren erhöht. Die Fütterung von Leucin führt zu einer Reduktion von Methionin um 63 % in der Doppel-Mutante.

Der Gesamt-Glucosinolatgehalt ist nur in der Doppel-Mutante durch die Gabe von Isoleucin und Leucin reduziert. Die Abnahme im Gesamt-Glucosinolatgehalt resultiert vor allem aus der Reduktion von 3MSOP (3-Methylsulfinylglucosinolat), 4MSOB (4-Methylsulfinylglucosinolat) und 5MSOP (5-Methylsulfinylglucosinolat) (Tab. 4.24). Betrachtet man die Leucin-abgeleiteten Glucosinolate in den Wildtyp-Pflanzen, so wird ausschließlich durch die Zugabe von Leucin eine Erhöhung der Leucin-abgeleiteten Glucosinolate, 4MP und 5MH (4-Methylpentyl- und 5-Methylhexylglucosinolat) erzielt. Hier steigt der Gehalt von nicht detektierbar in der Kontrollpflanze auf 0,25 bzw. 0,20 µmol/g (Tab. 4.22). In der *bcat3-1* Mutante führen Leucin und Isoleucin zu erhöhten 4MP und 5MH Mengen (Tab. 4.23). Dies verhält sich umgekehrt in der *bcat3-1/bcat4-2* Mutante, in der man einen signifikant reduzierten Gehalt an Leucin-abgeleiteten Glucosinolaten beobachtet (Tab. 4.24). Die Wildtyp-Pflanzen weisen eine signifikante Erhöhung von 7MSOH (7-Methylsulfinylglucosinolat) und 8MSOO (8-Methylsulfinylglucosinolat) nach Fütterung von

Leucin und Isoleucin auf. Eine geringe, jedoch signifikante Erhöhung dieser beiden Glucosinolate ist ebenfalls in der Doppel-Mutante nach Valin-Gabe zu beobachten. In der *bcat3-1* Mutante ist der Gehalt an 8MSOO nach Zusatz von Isoleucin und Leucin erhöht. Diese Ergebnisse deuten an, dass ein erhöhter Gehalt an verzweigtkettigen Aminosäuren über einen längeren Zeitraum zur Bildung von Leucin-abgeleiteten Glucosinolaten führt.

Die mehrmalige Fütterung von Methionin führt in den Wildtyp-Pflanzen zu einer Erhöhung des Gesamt-Aminosäuregehalts um etwa 44 % (Tab. 4.25). Diese Erhöhung resultiert überwiegend aus dem Anstieg der Aminosäuren Histidin, Methionin, Serin, S-Methylmethionin (SMM) und Threonin. Die stärksten Akkumulationen sind hierbei für Methionin und SMM zu beobachten. Methionin ist im Wildtyp nach der Methionin-Gabe 186-fach erhöht verglichen mit der Kontrollpflanze und erreicht eine Konzentration von $48,48 \pm 14,75$ nmol/mg gefriergetrocknetes Blattmaterial. In der *bcat3-1/bcat4-2* Doppel-Mutante führt die Methionin-Fütterung zu keiner Änderung im Gesamt-Aminosäuregehalt. Geringer als im Wildtyp ist in der Doppel-Mutante eine 12-fache Erhöhung des Methioningehalts und eine 4-fache Erhöhung des SMM-Gehalts aufgrund der Methionin-Fütterung zu beobachten. Zudem erreichen diese Aminosäuren mit den Konzentrationen $37,10 \pm 8,33$ nmol/mg gefriergetrocknete Blätter für Methionin und $3,11 \pm 1,82$ für SMM nmol/mg gefriergetrocknete Blätter nicht die Absolutwerte, die diese im Wildtyp aufweisen. Weitere weniger starke Akkumulationen in der Doppel-Mutante sind für die Aminosäuren Histidin, Lysin und Threonin zu beobachten. Die Aminosäuren Asparaginsäure, Glutaminsäure und Glutamin sind in der Mutante reduziert, im Wildtyp ist dies ähnlich. Die verzweigtkettigen Aminosäuren sind in der Doppel-Mutante und im Wildtyp nach mehrmaliger Gabe von Methionin im Vergleich zur Kontrolle stärker angereichert. Hierbei wird in der *bcat3-1/bcat4-2* Mutante und im Wildtyp Isoleucin (16-fach bzw. 11-fach) am stärksten angehäuft, Leucin (3,5-fach bzw. 4,6-fach) und Valin (4,8-fach bzw. 5,8-fach) etwa im gleichen Ausmaß.

Die Glucosinolat-Spektren der *bcat3-1/bcat4-2* Mutante und des Wildtyps weisen ähnliche signifikante Veränderungen auf. Der Gesamt-Glucosinolatgehalt ist 1,7-fach bzw. 2,7-fach erhöht. Der Gehalt an Methionin-abgeleiteten Glucosinolaten ist in der Doppel-Mutante 3,4-fach erhöht, im Wildtyp 3-fach erhöht. Die Erhöhung des Gesamt-Glucosinolatgehalts ist in der Mutante wie auch im Wildtyp auf die Akkumulation aller Methionin-abgeleiteten Glucosinolate zurückzuführen.

Zusammengefasst führt die mehrfache Verabreichung von Methionin in der Doppel-Mutante und in den Wildtyp-Pflanzen zu einem Anstieg der verabreichten Aminosäure und des Methionin-Derivats, SMM, sowie zu einer Erhöhung des Glucosinolatgehalts.

Aminosäure	Aminosäuregehalt in Rosettenblättern [nmol/mg getrocknetes Blattmaterial]			
	Col-0 Ile	Col-0 Leu	Col-0 Val	Col-0 Control
Total	154,01 ± 13,30	170,93 ± 12,30	200,55 ± 12,50	147,80 ± 7,32
Ala	6,80 ± 0,85	7,10 ± 1,27	8,28 ± 1,08	5,92 ± 0,85
Asn	6,12 ± 0,70	6,36 ± 1,06	9,14 ± 0,57	5,26 ± 0,46
Asp	20,48 ± 2,30	18,62 ± 1,09	19,75 ± 0,94	15,36 ± 1,05
Gln	76,80 ± 12,66	90,43 ± 11,63	109,30 ± 10,94	71,68 ± 3,42
Glu	29,87 ± 3,61	32,06 ± 2,21	34,42 ± 1,51	26,40 ± 0,80
Ile	0,60 ± 0,10	0,38 ± 0,05	0,39 ± 0,06	0,44 ± 0,12
Leu	0,63 ± 0,18	0,58 ± 0,21	0,62 ± 0,13	n.b.
Val	1,00 ± 0,13	0,94 ± 0,10	1,08 ± 0,10	1,10 ± 0,14

Tabelle 4.19 Aminosäuregehalt in Rosettenblättern des *Arabidopsis* Wildtyps (Col-0) nach mehrfacher Verabreichung der Aminosäuren Ile, Leu und Val. Die Tabelle zeigt den Gesamt-Aminosäuregehalt (Total), sowie den Gehalt an Aminosäuren, die signifikante Unterschiede zur Kontrolle aufwiesen.

Aminosäure	Aminosäuregehalt in Rosettenblättern [nmol/mg getrocknetes Blattmaterial]			
	<i>bcat3-1</i> Ile	<i>bcat3-1</i> Leu	<i>bcat3-1</i> Val	<i>bcat3-1</i> Kontrolle
Total	165,90 ± 19,14	186,19 ± 7,02	197,26 ± 23,42	165,11 ± 17,58
Ala	7,36 ± 0,62	10,01 ± 0,52	9,80 ± 0,29	7,01 ± 0,66
Asn	6,18 ± 0,92	8,81 ± 0,73	7,72 ± 1,36	6,42 ± 0,72
Asp	20,64 ± 1,46	16,51 ± 1,25	17,92 ± 0,99	19,92 ± 2,22
Gln	79,68 ± 9,43	100,22 ± 4,97	107,68 ± 19,22	82,44 ± 12,43
Glu	32,32 ± 2,89	30,91 ± 2,08	33,12 ± 3,02	31,44 ± 3,19
Ile	0,65 ± 0,18	0,43 ± 0,11	0,44 ± 0,15	0,42 ± 0,06
Leu	0,80 ± 0,33	0,82 ± 0,10	0,70 ± 0,05	0,66 ± 0,16
Val	0,92 ± 0,15	0,98 ± 0,20	1,10 ± 0,23	0,89 ± 0,11

Tabelle 4.20 Aminosäuregehalt in Rosettenblättern der *bcat3-1* Mutante nach mehrfacher Verabreichung der Aminosäuren Ile, Leu und Val. Es sind ausschließlich der Gesamt-Aminosäuregehalt (Total) und Aminosäuregehalte, die signifikante Unterschiede zur Kontrolle aufweisen, aufgelistet.

Aminosäure	Aminosäuregehalt in Rosettenblättern [nmol/mg getrocknetes Blattmaterial]				
	<i>bcat3-1/bcat4-2</i> Ile	<i>bcat3-1/bcat4-2</i> Leu	<i>bcat3-1/bcat4-2</i> Val	<i>bcat3-1/bcat4-2</i> Met	<i>bcat3-1/bcat4-2</i> Kontrolle
Total	187,23 ± 15,12	178,10 ± 20,35	176,88 ± 16,31	171,59 ± 61,68	172,52 ± 10,61
Ala	9,75 ± 0,55	8,86 ± 0,37	9,28 ± 0,67	4,01 ± 0,84	9,36 ± 0,89
Arg	1,30 ± 0,15	1,03 ± 0,07	1,06 ± 0,14	3,58 ± 4,24	1,03 ± 0,07
Asn	6,17 ± 0,56	5,47 ± 0,57	5,84 ± 0,59	2,41 ± 1,75	5,51 ± 0,51
Asp	17,28 ± 1,75	16,70 ± 1,61	16,16 ± 1,76	4,18 ± 0,94	14,93 ± 1,10
Gln	89,14 ± 8,63	86,98 ± 17,79	82,24 ± 9,46	37,63 ± 14,87	80,26 ± 6,91
Glu	34,56 ± 3,72	32,83 ± 1,58	32,16 ± 3,02	13,63 ± 4,40	33,28 ± 2,37
Gly	2,13 ± 0,38	1,66 ± 0,69	2,18 ± 0,41	1,44 ± 0,69	3,30 ± 0,49
His	0,98 ± 0,18	0,60 ± 0,08	0,84 ± 0,13	4,42 ± 2,24	0,75 ± 0,10
Ile	0,74 ± 0,09	0,60 ± 0,00	0,60 ± 0,08	6,00 ± 2,69	0,37 ± 0,03
Leu	0,77 ± 0,09	0,72 ± 0,08	0,70 ± 0,09	1,70 ± 0,66	0,49 ± 0,04
Lys	0,33 ± 0,09	0,43 ± 0,07	0,34 ± 0,09	0,52 ± 0,22	0,20 ± 0,03
Met	2,67 ± 0,54	1,18 ± 0,58	2,91 ± 1,14	37,10 ± 8,33	3,20 ± 0,86
Phe	0,51 ± 0,06	0,46 ± 0,05	0,50 ± 0,05	0,70 ± 0,37	0,56 ± 0,02
Ser	11,71 ± 0,81	12,19 ± 0,48	13,00 ± 1,46	11,83 ± 4,62	10,50 ± 0,75
SMM	0,93 ± 0,18	0,62 ± 0,23	0,76 ± 0,12	3,11 ± 1,82	0,78 ± 0,15
Thr	6,70 ± 1,88	6,26 ± 0,81	7,08 ± 1,81	16,37 ± 5,12	6,77 ± 0,61
Trp	0,12 ± 0,10	0,12 ± 0,00	0,14 ± 0,05	0,03 ± 0,04	0,04 ± 0,04
Tyr	0,33 ± 0,06	0,29 ± 0,07	0,28 ± 0,06	0,39 ± 0,12	0,29 ± 0,04
Val	0,94 ± 0,11	1,10 ± 0,05	0,98 ± 0,05	3,24 ± 1,26	0,68 ± 0,06

Tabelle 4.21 Aminosäuregehalt in Rosettenblättern der *bcat3-1/bcat4-2* Doppel-Knock-Out-Mutante nach mehrfacher Verabreichung der Aminosäuren Ile, Leu, Val und Met.

Abkürzungen: Total, Aminosäuregehalt gesamt; SMM, S-Methylmethionin.

Glucosinolat Typ	Glucosinolatgehalt in Rosettenblättern [μ mol/g getrocknetes Blattmaterial]			
	Col-0 Ile	Col-0 Leu	Col-0 Val	Col-0 Control
Total Met GS	20,38 ± 3,43	19,07 ± 1,34	19,28 ± 1,59	18,29 ± 1,51
Total	23,07 ± 3,83	21,87 ± 1,49	22,01 ± 1,67	20,92 ± 1,61
7MSOH	0,34 ± 0,04	0,29 ± 0,02	0,33 ± 0,02	0,24 ± 0,02
8MSOO	1,96 ± 0,21	1,66 ± 0,09	1,59 ± 0,10	1,25 ± 0,20
4MP	0,00 ± 0,00	0,25 ± 0,05	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
5MH	0,00 ± 0,00	0,20 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

Tabelle 4.22 Glucosinolatgehalt in Rosettenblättern des *Arabidopsis* Wildtyps (Col-0) nach mehrmaliger Verabreichung von Ile, Leu und Val. Die Gesamt-Glucosinolatgehalte sind kaum verändert. Die Fütterung mit Leucin führt zu einer Anhäufung der Leucin-abgeleitete Glucosinolate, 4MP und 5MH.

Abkürzungen: 7MSOH, 7-Methylsulfinylheptylglucosinolat; 8MSOO, 8-Methylsulfinyloctylglucosinolat; 4MP, 4-Methylpentylglucosinolat; 5MH, 5-Methylhexylglucosinolat; Total Met GS, Methionin-abgeleitete Glucosinolate gesamt; Total, Glucosinolate gesamt.

Glucosinolatgehalt in Rosettenblättern [$\mu\text{mol/g}$ getrocknetes Blattmaterial]

Glucosinolat Typ	<i>bcat3-1</i> Ile	<i>bcat3-1</i> Leu	<i>bcat3-1</i> Val	<i>bcat3-1</i> Kontrolle
Total Met GS	19,76 \pm 1,03	19,08 \pm 1,18	17,13 \pm 1,71	18,15 \pm 1,52
Total	24,23 \pm 1,16	23,43 \pm 1,40	21,09 \pm 2,44	21,97 \pm 1,81
7MSOH	0,64 \pm 0,07	0,55 \pm 0,05	0,47 \pm 0,08	0,54 \pm 0,14
8MSOO	2,20 \pm 0,18	1,69 \pm 0,09	1,31 \pm 0,21	1,33 \pm 0,13
4MP	1,11 \pm 0,19	1,24 \pm 0,08	0,83 \pm 0,21	0,78 \pm 0,09
5MH	0,49 \pm 0,04	0,57 \pm 0,05	0,42 \pm 0,08	0,41 \pm 0,05

Tabelle 4.23 Glucosinolatgehalt in Rosettenblättern der *bcat3-1* Mutante nach mehrmaliger Verabreichung von Ile, Leu und Val. Die Gesamt-Glucosinolatgehalte sind kaum verändert. Die Fütterung mit Leucin und Isoleucin führt zu einer Anhäufung der Leucin-abgeleiteten Glucosinolate, 4MP und 5MH. Abkürzungen: 7MSOH, 7-Methylsulfinylheptylglucosinolat; 8MSOO, 8-Methylsulfinyloctylglucosinolat; 4MP, 4-Methylpentylglucosinolat; 5MH, 5-Methylhexylglucosinolat; Total Met GS, Methionin-abgeleitete Glucosinolate gesamt; Total, Glucosinolate gesamt.

Glucosinolatgehalt in Rosettenblättern [$\mu\text{mol/g}$ getrocknetes Blattmaterial]

Glucosinolat Typ	<i>bcat3-1/bcat4-2</i> Ile	<i>bcat3-1/bcat4-2</i> Leu	<i>bcat3-1/bcat4-2</i> Val	<i>bcat3-1/bcat4-2</i> Met	<i>bcat3-1/bcat4-2</i> Kontrolle
Total Met GS	6,19 \pm 0,73	5,92 \pm 0,63	7,73 \pm 0,88	25,10 \pm 3,63	7,45 \pm 0,56
Total	19,12 \pm 1,31	15,69 \pm 0,49	20,24 \pm 4,27	40,02 \pm 4,89	23,63 \pm 1,86
3MSOP	0,39 \pm 0,03	0,32 \pm 0,07	0,49 \pm 0,10	2,62 \pm 0,39	0,53 \pm 0,04
4MTB	0,12 \pm 0,01	0,12 \pm 0,02	0,15 \pm 0,02	0,30 \pm 0,06	0,12 \pm 0,02
4MSOB	4,23 \pm 0,57	3,98 \pm 0,50	5,10 \pm 0,58	16,07 \pm 2,42	4,99 \pm 0,42
5MSOP	1,05 \pm 0,11	1,14 \pm 0,08	1,55 \pm 0,17	2,17 \pm 0,27	1,35 \pm 0,10
7MSOH	0,04 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	0,51 \pm 0,07	0,04 \pm 0,00
8MSOO	0,37 \pm 0,03	0,33 \pm 0,03	0,38 \pm 0,06	3,16 \pm 0,49	0,36 \pm 0,02
4MP	2,13 \pm 0,27	1,47 \pm 0,09	1,12 \pm 0,14	0,84 \pm 0,10	2,29 \pm 0,20
5MH	4,53 \pm 0,40	3,49 \pm 0,21	2,96 \pm 0,29	2,24 \pm 0,31	4,52 \pm 0,12
I3M	4,67 \pm 0,62	3,62 \pm 0,15	6,05 \pm 2,19	10,15 \pm 1,92	7,54 \pm 1,25
1MOI3M	1,16 \pm 0,40	0,62 \pm 0,04	1,79 \pm 1,28	1,25 \pm 0,72	1,43 \pm 0,66
4MOI3M	0,31 \pm 0,02	0,41 \pm 0,01	0,41 \pm 0,03	0,34 \pm 0,05	0,27 \pm 0,03
4OHI3M	0,14 \pm 0,03	0,16 \pm 0,01	0,19 \pm 0,05	0,10 \pm 0,01	0,12 \pm 0,02

Tabelle 4.24 Glucosinolatgehalt in Rosettenblättern der *bcat3-1/bcat4-2* Mutante nach mehrmaliger Verabreichung von Ile, Leu, Val und Met. Der Gesamt-Glucosinolatgehalt ist aufgrund der Methionin-Gabe erhöht. Die Fütterung mit Leucin und Valin führt zu einer Reduktion der Leucin-abgeleiteten Glucosinolate, 4MP und 5MH.

Abkürzungen: 3MSOP, 3-Methylsulfinylpropylglucosinolat; 4MTB, 4-Methylthiobutylglucosinolat; 4MSOB, 4-Methylsulfinylbutylglucosinolat; 5MSOP, 5-Methylsulfinylpentylglucosinolat; 7MSOH, 7-Methylsulfinylheptylglucosinolat; 8MSOO, 8-Methylsulfinyloctylglucosinolat; 5MH, 5-Methylhexylglucosinolat; I3M, Indol-3-ylmethylglucosinolat; 1MOI3M, 1-Methoxyindol-3-ylmethylglucosinolat; 4MOI3M, 4-Methoxyindol-3-ylmethylglucosinolat; 4OHI3M, 4-Hydroxyindol-3-ylmethylglucosinolat; Total, Glucosinolate gesamt; Total Met GS, von Methionin abgeleitete Glucosinolate gesamt.

Aminosäuregehalt in Rosettenblättern [nmol/mg getrocknetes Blattmaterial]			
Aminosäure	Col-0 Met	Col-0 Kontrolle	t-Test
Total	228,05 ± 22,22	158,40 ± 17,58	0,00001
Ala	5,79 ± 0,57	7,86 ± 0,78	0,00003
Arg	2,37 ± 0,44	0,53 ± 0,06	0,00000
Asn	5,15 ± 0,71	5,72 ± 0,84	0,16436
Asp	7,83 ± 0,76	13,56 ± 1,40	0,00000
Gln	74,76 ± 9,11	85,08 ± 11,08	0,06125
Glu	21,48 ± 2,11	29,52 ± 2,50	0,00001
Gly	2,58 ± 0,58	1,95 ± 0,72	0,07447
His	5,49 ± 0,61	0,21 ± 0,08	0,00000
Ile	2,70 ± 1,07	0,24 ± 0,00	0,00001
Leu	1,10 ± 0,22	0,24 ± 0,00	0,00000
Lys	0,50 ± 0,08	0,12 ± 0,00	0,00000
Met	48,48 ± 14,75	0,26 ± 0,24	0,00000
Phe	0,69 ± 0,08	0,33 ± 0,06	0,00000
Ser	23,52 ± 2,24	8,19 ± 0,93	0,00000
SMM	13,23 ± 0,70	0,00 ± 0,00	0,00000
Thr	8,04 ± 0,41	3,69 ± 0,43	0,00000
Trp	0,03 ± 0,06	0,00 ± 0,00	0,14890
Tyr	0,36 ± 0,06	0,24 ± 0,00	0,00011
Val	3,96 ± 0,95	0,68 ± 0,28	0,00000

Tabelle 4.25 Aminosäuregehalt im Wildtyp (Col-0) nach mehrfacher Verabreichung von Methionin. Der Aminosäuregehalt ist signifikant unterschiedlich zwischen der Aminosäure-behandelten Pflanze und der Kontrollpflanze, wenn im t-Test $P < 0,01$. Abkürzungen: total, Aminosäuregehalt gesamt; SMM, S-Methylmethionin.

Glucosinolat Typ	Glucosinolatgehalt in Rosettenblättern [$\mu\text{mol/g}$ getrocknetes Blattmaterial]		
	Col-0 Met	Col-0 Kontrolle	t-Test
total met	64,26 \pm 6,77	21,43 \pm 2,09	0,00000
total	72,48 \pm 8,03	26,64 \pm 2,68	0,00000
3MSOP	14,46 \pm 1,79	1,91 \pm 0,22	0,00000
4MTB	0,88 \pm 0,15	0,61 \pm 0,04	0,00007
4MSOB	41,30 \pm 3,82	16,38 \pm 1,60	0,00000
5MSOP	0,89 \pm 0,12	0,58 \pm 0,06	0,00001
6MSOH	0,52 \pm 0,11	0,08 \pm 0,01	0,00000
7MSOH	2,25 \pm 0,97	0,31 \pm 0,04	0,00002
8MSOO	3,97 \pm 0,55	1,56 \pm 0,22	0,00000
4MP	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	-
5MH	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	-
I3M	6,90 \pm 0,97	3,75 \pm 0,50	0,00000
1MOI3M	0,83 \pm 0,36	1,00 \pm 0,46	0,53377
4MOI3M	0,41 \pm 0,04	0,36 \pm 0,07	0,06274
4OHI3M	0,08 \pm 0,01	0,08 \pm 0,02	0,62031

Tabelle 4.26 Glucosinolatgehalt in Rosettenblättern des *Arabidopsis* Wildtyps nach mehrmaliger Verabreichung von Methionin. Der Glucosinolatgehalt ist signifikant unterschiedlich zwischen der Aminosäure-behandelten Pflanze und der Kontrollpflanze, wenn im t-Test $P < 0,01$.

Abkürzungen: 3MSOP, 3-Methylsulfinylpropylglucosinolat; 4MTB, 4-Methylthiobutylglucosinolat; 4MSOB, 4-Methylsulfinylbutylglucosinolat; 5MSOP, 5-Methylsulfinylpentylglucosinolat; 6MSOH, 6-Methylsulfinylhexylglucosinolat; 7MSOH, 7-Methylsulfinylheptylglucosinolat; 8MSOO, 8-Methylsulfinyloctylglucosinolat; 5MH, 5-Methylhexylglucosinolat; I3M, Indol-3-ylmethylglucosinolat; 1MOI3M, 1-Methoxyindol-3-ylmethylglucosinolat; 4MOI3M, 4-Methoxyindol-3-ylmethylglucosinolat; 4OHI3M, 4-Hydroxyindol-3-ylmethylglucosinolat; Total, Glucosinolate gesamt; Total Met GS, von Methionin abgeleitete Glucosinolate gesamt.

4.4.3 Samen-Analyse auf Aminosäure- und Glucosinolatgehalt nach mehrwöchiger Applikation von Aminosäuren

In einem dritten Versuchsansatz sollten nun die Samen von Pflanzen, die regelmäßig bis zur Samenreife ab dem Alter von 3 Wochen mit Aminosäure-Lösungen gegossen wurden, analysiert werden. Der *bcat3-1* Mutante und den Wildtyp-Pflanzen wurde insgesamt 16 mal eine Aminosäure-Lösung (2 mM Ile, Leu, Val und bidestilliertes Wasser als Kontrolle) verabreicht. Nach der letzten Applikation wurden die Pflanzen nicht weiter gegossen, da die Samenreife abgeschlossen war. Die Samen wurden etwa 3 Wochen nach der letzten Applikation geerntet. Zudem wurde die *bcat4-2* Mutante in dem Langzeit-Gießversuch untersucht. Die *bcat4-2* Mutante wurde hierfür 23 mal mit Isoleucin-versetztem (2 mM) Gießwasser und jeweils 21 mal mit Leucin- bzw. Valin versetztem (2 mM) Gießwasser

gegossen und die reifen Samen geerntet. Die Valin-Gabe führte in der *bcat4-2* Mutante zu sehr geringen Samenausbeuten, so dass keine Metaboli-Analyse möglich war.

In den Wildtyp- und in den *bcat3-1* Knock-Out-Pflanzen sind keine substantiellen Veränderungen im Gesamtgehalt an Aminosäuren und Standard-Glucosinolaten zu beobachten (Profil der Aminosäuren nicht gezeigt; Tab. 4.27 und 4.28). In der *bcat4-2* Mutante ist dies ähnlich, jedoch führt die Leucin-Fütterung zu einer Reduktion des Gesamt-Aminosäuregehalts um 33 % und des Gesamt-Glucosinolatgehalts um 27 % (Tab. 4.29 und 4.30).

Das Leucin-abgeleitete Glucosinolat 4MP ist im Wildtyp und in der *bcat3-1* Mutante nach der Valin-Fütterung unverändert. Hingegen bewirkt die Fütterung von Isoleucin in der *bcat3-1* Mutante eine 1,7-fache Erhöhung dieses Glucosinolats und im Wildtyp eine 2-fache. Die kontinuierliche Gabe von Leucin bewirkt eine verstärkte Akkumulation dieses Leucin-abgeleiteten Glucosinolats (ko: 4-fach; wt: 12-fach). Im Falle des 5MH, hat das Gießen mit Isoleucin keinen Einfluss auf die Bildung dieses Glucosinolats. Die Valin-Verabreichung führt zu einem leichten Anstieg an 5MH und die Fütterung von Leucin bewirkt auch im Falle des 5MH die stärkste Anhäufung. 5MH ist in der *bcat3-1* Mutante 25-fach erhöht, in den Wildtyp-Pflanzen erreicht dieses Glucosinolat, das in den Kontrollpflanzen nicht detektierbar ist, eine Konzentration von 0,37 $\mu\text{mol/g}$ Samen. In den Samen der *bcat4-2* Mutante hingegen ist lediglich das Leucin-abgeleitete Glucosinolat 5MH in detektierbarer Menge vorhanden (Tab. 4.29). Der Gehalt dieses Glucosinolats wird in den Samen der AtBCAT4-Knock-Out-Pflanze durch die Isoleucin-Gabe nicht beeinflusst, hingegen bewirkt die Fütterung mit Leucin einen Anstieg um 74 %.

Die Ergebnisse des Langzeit-Gießversuchs deuten daraufhin, dass die langfristige Fütterung verzweigtkettiger Aminosäuren zur Bildung von Leucin-abgeleiteten Glucosinolaten führt, die in den Samen gespeichert werden.

Glucosinolat Typ	Glucosinolatgehalt in Samen [$\mu\text{mol/g}$ Samen]			
	Col-0 Ile	Col-0 Leu	Col-0 Val	Col-0 Kontrolle
Total Met GS	82,19 \pm 10,76	73,24 \pm 13,05	86,15 \pm 13,11	77,54 \pm 13,41
Total	87,55 \pm 11,07	79,80 \pm 13,20	91,74 \pm 13,26	82,24 \pm 13,50
4MSOB	1,55 \pm 0,49	1,54 \pm 0,50	1,28 \pm 0,26	1,85 \pm 0,53
4MP	0,17 \pm 0,03	1,10 \pm 0,19	0,00 \pm 0,00	0,08 \pm 0,03
5MH	0,02 \pm 0,02	0,37 \pm 0,06	0,04 \pm 0,02	0,00 \pm 0,00
I3M	4,98 \pm 0,70	4,93 \pm 0,69	5,32 \pm 0,72	4,48 \pm 0,46

Tabelle 4.27 Glucosinoltgehalt in Samen der *Arabidopsis* Wildtyp-Pflanzen (Col-0) nach mehrwöchiger Gabe der Aminosäuren Ile, Leu und Val.

Abkürzungen: 4MSOB, 4-Methylsulfinylbutylglucosinolat; 4MP, 4-Methylpentylglucosinolat; 5MH, 5-Methylhexylglucosinolat; I3M, Indol-3-ylmethylglucosinolat; Total, Glucosinolate gesamt; Total Met GS, von Methionin abgeleitete Glucosinolate gesamt.

Glucosinolat Typ	Glucosinolatgehalt in Samen [$\mu\text{mol/g}$ Samen]			
	<i>bcat3-1</i> Ile	<i>bcat3-1</i> Leu	<i>bcat3-1</i> Val	<i>bcat3-1</i> Kontrolle
Total Met GS	74,48 \pm 8,20	88,84 \pm 21,81	104,24 \pm 23,45	85,80 \pm 8,87
Total	76,62 \pm 8,36	92,39 \pm 22,39	106,73 \pm 23,40	77,32 \pm 28,34
3OHP	1,14 \pm 0,13	0,95 \pm 0,16	1,29 \pm 0,29	1,17 \pm 0,50
4BZO	15,13 \pm 0,93	14,63 \pm 0,99	14,47 \pm 0,63	13,84 \pm 5,17
7MTH	4,13 \pm 1,10	7,58 \pm 2,63	8,65 \pm 2,51	3,96 \pm 1,67
8MSOO	5,34 \pm 1,05	8,46 \pm 2,55	10,22 \pm 2,99	6,52 \pm 2,64
8MTO	3,60 \pm 0,97	9,26 \pm 6,66	7,73 \pm 1,36	4,38 \pm 1,94
4MP	0,65 \pm 0,12	1,86 \pm 0,26	0,43 \pm 0,06	0,38 \pm 0,04
5MH	0,03 \pm 0,03	0,50 \pm 0,06	0,10 \pm 0,02	0,02 \pm 0,03
I3M	1,27 \pm 1,08	1,38 \pm 1,31	1,71 \pm 1,85	4,01 \pm 1,73

Tabelle 4.28 Glucosinoltgehalt in Samen der *bcat3-1* Pflanzen nach mehrwöchiger Gabe der Aminosäuren Ile, Leu und Val.

Abkürzungen: 3OHP, 3-Hydroxybutylglucosinolat; 4BZO, 4-Benzoyloxybutylglucosinolat; 7MTH, 7-Methylthioheptylglucosinolat; 8MSOO, 8-Methylsulfinyloctylglucosinolat; 8MTO, 8-Methylthiooctylglucosinolat; 4MP, 4-Methylpentylglucosinolat; 5MH, 5-Methylhexylglucosinolat; I3M, Indol-3-ylmethylglucosinolat; Total, Glucosinolate gesamt; Total Met GS, von Methionin abgeleitete Glucosinolate gesamt.

Glucosinolat Typ	Glucosinolatgehalt in Samen [$\mu\text{mol/g}$ Samen]				
	<i>bcat4-2</i> Ile	<i>bcat4-2</i> Leu	<i>bcat4-2</i> Kontrolle	t-Test Ile	t-Test Leu
Total Met GS	62,77 \pm 11,15	42,75 \pm 6,18	58,61 \pm 8,03	0,36975	0,00007
Total	67,98 \pm 11,65	47,63 \pm 6,11	65,17 \pm 8,71	0,56720	0,00004
3OHP	1,00 \pm 0,13	0,54 \pm 0,10	0,77 \pm 0,17	0,00770	0,00115
3BZO	2,09 \pm 0,39	1,48 \pm 0,21	2,07 \pm 0,42	0,94927	0,00067
3MSOP	0,74 \pm 0,11	0,44 \pm 0,08	0,61 \pm 0,15	0,05939	0,00417
4OHB	4,34 \pm 0,69	2,99 \pm 0,30	3,72 \pm 0,68	0,08193	0,00608
4MTB	24,65 \pm 5,65	12,28 \pm 1,94	20,43 \pm 4,52	0,09888	0,00004
4BZO	15,34 \pm 2,22	14,01 \pm 3,05	15,84 \pm 1,18	0,53892	0,08015
4MSOB	4,89 \pm 1,28	2,13 \pm 0,46	4,17 \pm 1,28	0,26003	0,00014
5MTP	2,52 \pm 0,51	1,89 \pm 0,41	2,57 \pm 0,26	0,81202	0,00023
5MSOP	0,71 \pm 0,19	0,42 \pm 0,09	0,72 \pm 0,13	0,90284	0,00001
7MTH	0,30 \pm 0,04	0,28 \pm 0,04	0,38 \pm 0,03	0,00038	0,00000
7MSOH	0,14 \pm 0,03	0,21 \pm 0,34	0,14 \pm 0,03	0,90761	0,50007
8MTO	1,50 \pm 0,35	1,66 \pm 0,24	1,96 \pm 0,19	0,00227	0,00514
8MSOO	4,56 \pm 0,80	4,42 \pm 0,26	5,24 \pm 0,36	0,02443	0,00001
5MH	0,27 \pm 0,05	0,61 \pm 0,17	0,35 \pm 0,08	0,03392	0,00019
I3M	4,82 \pm 0,52	4,13 \pm 0,73	6,03 \pm 0,94	0,00734	0,00006
4OHI3M	0,12 \pm 0,03	0,14 \pm 0,05	0,19 \pm 0,02	0,00001	0,00365

Tab. 4.29 Glucosinolatgehalt in den Samen der *bcat4-2* Mutante nach mehrwöchiger Applikation von Isoleucin und Leucin. Der Glucosinolatgehalt ist zwischen Aminosäure-behandelter Mutante und Kontrollpflanze signifikant unterschiedlich, wenn im t-Test $P < 0,01$.

Abkürzungen: 3OHP, 3-Hydroxypropylglucosinolat; 3BZO, 3-Benzoyloxypropylglucosinolat; 4OHB, 4-Hydroxybutylglucosinolat; 4MTB, 4-Methylthibutylglucosinolat; 4BZO, 4-Benzoyloxybutylglucosinolat; 4MSOB, 4-Methylsulfinylbutylglucosinolat; 5MTP, 5-Methylthiopentylglucosinolat; 5MSOP, 5-Methylsulfinylpentylglucosinolat; 7MTH, 7-Methylthioheptylglucosinolat; 7MSOH, 7-Methylsulfinylheptylglucosinolat; 8MTO, 8-Methylthiooctylglucosinolat; 8MSOO, 8-Methylsulfinyloctylglucosinolat; 5MH, 5-Methylheptylglucosinolat; I3M, Indol-3-ylmethylglucosinolat; 4OHI3M, 4-Hydroxyindol-3-ylglucosinolat; Total, Glucosinolate gesamt; Total Met GS, von Methionin abgeleitete Glucosinolate gesamt.

Aminosäuregehalt in Samen [nmol/mg Samen]					
Aminosäure	<i>bcat4-2</i> Ile	<i>bcat4-2</i> Leu	<i>bcat4-2</i> Kontrolle	t-Test Ile	t-Test Leu
Total	17,03 ± 2,36	11,00 ± 0,86	15,92 ± 2,68	0,38240	0,00002
Ala	0,79 ± 0,21	0,31 ± 0,05	0,55 ± 0,15	0,01024	0,00012
Arg	2,27 ± 0,73	0,88 ± 0,19	1,52 ± 0,65	0,03625	0,00690
Asn	2,07 ± 0,27	1,10 ± 0,22	1,50 ± 0,30	0,00080	0,00301
Asp	1,03 ± 0,12	0,86 ± 0,20	1,00 ± 0,15	0,62135	0,09248
Gln	0,19 ± 0,11	0,15 ± 0,05	0,15 ± 0,08	0,34754	0,87162
Glu	4,67 ± 0,66	3,10 ± 0,32	3,83 ± 0,39	0,00368	0,00019
Gly	0,67 ± 0,21	0,26 ± 0,15	0,63 ± 0,17	0,65521	0,00004
His	0,37 ± 0,19	0,14 ± 0,09	0,64 ± 0,25	0,02868	0,00001
Ile	0,59 ± 0,22	0,42 ± 0,22	0,56 ± 0,26	0,77839	0,22318
Leu	0,21 ± 0,04	0,16 ± 0,04	0,18 ± 0,06	0,28831	0,24185
Met	0,04 ± 0,02	0,03 ± 0,04	0,06 ± 0,02	0,04997	0,07691
Phe	0,31 ± 0,02	0,21 ± 0,02	0,24 ± 0,02	0,00001	0,00109
Ser	0,88 ± 0,18	0,58 ± 0,10	0,83 ± 0,21	0,56395	0,00314
SMM	2,43 ± 1,02	2,19 ± 0,28	3,22 ± 0,77	0,06570	0,00133
Thr	0,35 ± 0,04	0,18 ± 0,03	0,23 ± 0,04	0,00002	0,01469
Trp	0,20 ± 0,04	0,24 ± 0,04	0,33 ± 0,06	0,00029	0,00093
Tyr	0,16 ± 0,03	0,09 ± 0,01	0,15 ± 0,03	0,47101	0,00002
Val	0,41 ± 0,05	0,29 ± 0,05	0,32 ± 0,07	0,01301	0,25361

Tabelle 4.30 Aminosäuregehalt in den Samen der *bcat4-2* Mutante nach mehrwöchiger Verabreichung der Aminosäuren Ile und Leu. Der Aminosäuregehalt ist zwischen Aminosäure-behandelter Mutante und Kontrollpflanze signifikant unterschiedlich, wenn im t-Test $P < 0,01$.

Abkürzungen: Total, Aminosäuren gesamt; SMM, S-Methylmethionin.

4.5 Etablierung und Charakterisierung von T-DNA-Insertionslinien für die Mitglieder der Aconitase-Genfamilie in *A. thaliana*

Aconitasen katalysieren die Isomerisierungsreaktion, in der Citrat über das instabile Intermediat cis-Aconitat zu Iso-Citrat umgesetzt wird. Diese Reaktion findet man im mitochondrialen Citrat-Zyklus und im cytosolischen Glyoxylatzyklus. Im Citrat-Zyklus folgt nach einer Kondensation die Isomerisierung und anschließend eine oxidative Dearboxylierung. Diese Abfolge und die Art der Reaktionen im Citrat-Zyklus sind identisch mit den Reaktionen in der Leucin-Biosynthese und im Kettenverlängerungszyklus der Glucosinolatbiosynthese. In *E. coli* existieren zwei Aconitasen, Aco A und Aco B [Fouet et al. 1990; Prodromou et al., 1992; Bradbury et al., 1996]. Diese Aconitasen sind an der Isomerisierungsreaktion im Citrat- und Glyoxylatzyklus beteiligt. Die Isopropylmalat-Isomerase

IPMI 5 in *E.coli* ist den Aconitasen sehr ähnlich und ist an der Leucin-Biosynthese beteiligt [Schnarrenberger et al., 2002].

In *Arabidopsis* sind die Aconitasen und Isopropylmalat Isomerasen bislang wenig untersucht. Die Auswertung der zur Verfügung stehenden Expressionsdaten (<http://www.arabidopsis.org/info/expression/ATGenExpress.jsp>) und Daten zu subzellulären Lokalisation (predotar) ergaben erste Hinweise für die Funktion der einzelnen Mitglieder der Aconitase-Familie in *A. thaliana*. Die Etablierung von T-DNA-Insertionsmutanten für die einzelnen Mitglieder der Aconitase-Familie und Metabolit-Analysen dieser Mutanten sollen nun weitere Aufschlüsse über die *in vivo*-Funktion ergeben. Hierbei liegt besonderes Augenmerk auf den an der Leucinbiosynthese und dem Methionin-Kettenverlängerungszyklus beteiligten Isopropylmalat Isomerasen.

4.5.1 Übersicht über die untersuchten Gene in *A. thaliana*

Die potentiellen Mitglieder der Aconitase-Familie in *Arabidopsis* wurde durch eine Datenbank-Recherche mit der Aminosäuresequenz der bakteriellen Aconitase Aco A identifiziert. Im *Arabidopsis* Proteom wurden drei Aconitasen, ACO1-3 gefunden, die durch die Gene At4g35830, At2g05710 und At4g26970 codiert werden (Tab. 4.31). Diese Aconitasen zeigen die größte Ähnlichkeit zu dem *E. coli*-Protein. Zudem wurden vier Isopropylmalat-Isomerase-ähnliche Proteine identifiziert, die große bzw. kleine Untereinheiten dieses Proteins repräsentieren könnten (Tab. 4.31). Die große Untereinheit der Isopropylmalat-Isomerase (IPMI LSU *large subunit*) zeigt eine sehr hohe Sequenzidentität zum N-terminalen Bereich der pflanzlichen Aconitasen und wird durch das Gen At4g13430 codiert. Die kleinen Untereinheiten (IPMI SSU1-3 *small subunit*) hingegen weisen eine hohe Sequenzidentität zum C-terminalen Bereich der pflanzlichen Aconitasen auf und werden durch die Gene At2g43090, At2g43100 und At3g58990 codiert.

Der Vergleich von *in silico* Expressionsdaten der Gene (<http://www.arabidopsis.org/info/expression/ATGenExpress.jsp>) ergab erste Hinweise für die Funktion der einzelnen Mitglieder. Alle Mitglieder der Aconitase-Familie sind diurnal exprimiert, wie die beiden Enzyme, die am Kettenverlängerungszyklus der Glucosinolatbiosynthese beteiligt sind (Tab. 4.31). Mehrere Gene, die Enzyme der Glucosinolatbiosynthese codieren, zeigen bei Schwefelmangel eine reduzierte Expression. Die Co-Expression mit AtBCAT4 und MAM-1 von IPMI LSU (At4g13430), IPMI SSU2

(At2g43100) und *IPMI SSU3* (At3g58990) bei Schwefelmangel, deutet zudem auf eine Beteiligung dieser Isopropylmalat Isomerase an der Glucosinolatbiosynthese hin.

Da die Beteiligung eines Gens an einem Stoffwechselweg nicht nur von der Expression abhängt, sondern ebenso von der subzellulären Lokalisation, wurde eine *in silico* Recherche für alle Aconitaseproteine durchgeführt (Tab. 4.31). Demnach ist die Aconitase 1 im Cytosol lokalisiert, wo der Glyoxylatweg stattfindet. Die Aconitasen 2 und 3 wären aufgrund ihrer potentiellen mitochondrialen Lokalisation Kandidaten für den Citrat-Zyklus. Die Isopropylmalat Isomerasen sind laut Vorhersage in den Plastiden lokalisiert, in denen die Leucin-Biosynthese und die Methionin-Kettenverlängerung der Glucosinolatbiosynthese stattfindet. Die potentielle chloroplastidäre Lokalisation für die beiden Isopropylmalat Isomerasen *IPMI LSU* und *IPMI SSU2* weist ebenfalls auf eine Beteiligung dieser Isopropylmalat Isomerasen an der Glucosinolatbiosynthese hin.

Um die Vorhersage zu überprüfen wurde die Lokalisation von *IPMI SSU2* wurde experimentell untersucht. Dazu wurde das gesamte Leseraster dieser Isopropylmalat-Isomerase (257 Aminosäuren) mit dem N-Terminus des Gens für das grün-fluoreszierende Protein (*smGFP soluble modified green fluorescent protein*) fusioniert. Das Fusionsprotein wurde sowohl transient in Tabak-Protoplasten, als auch stabil in *Arabidopsis*-Pflanzen exprimiert. Das *IPMI SSU2:smGFP*-Fusionsprotein zeigt in den Tabak- und in den *Arabidopsis*-Protoplasten eine eindeutige chloroplastidäre Lokalisation (Abb.4.10). Dieses Ergebnis stimmt mit den *in silico* Daten zu diesem Protein überein.

Name	Gen	Expression		subzelluläre Lokalisation
		diurnal	Schwefel-Mangel	
Aconitase 1 (ACO1)	At4g35830	*		Cytosol
Aconitase 2 (ACO2)	At2g05710	*		Mitochondrien
Aconitase 3 (ACO3)	At4g26970	*		Mitochondrien
Isopropylmalatisomerase gr. UE (<i>IPMI LSU</i>)	At4g13430	*	*	Chloroplasten
Isopropylmalatisomerase kl. UE (<i>IPMI SSU1</i>)	At2g43090	*		Chloroplasten
Isopropylmalatisomerase kl. UE (<i>IPMI SSU2</i>)	At2g43100	*	*	Chloroplasten
Isopropylmalatisomerase kl. UE (<i>IPMI SSU3</i>)	At3g58990	*	*	Chloroplasten

Tabelle 4.31 Mitglieder der Aconitase-Familie in *Arabidopsis thaliana*.

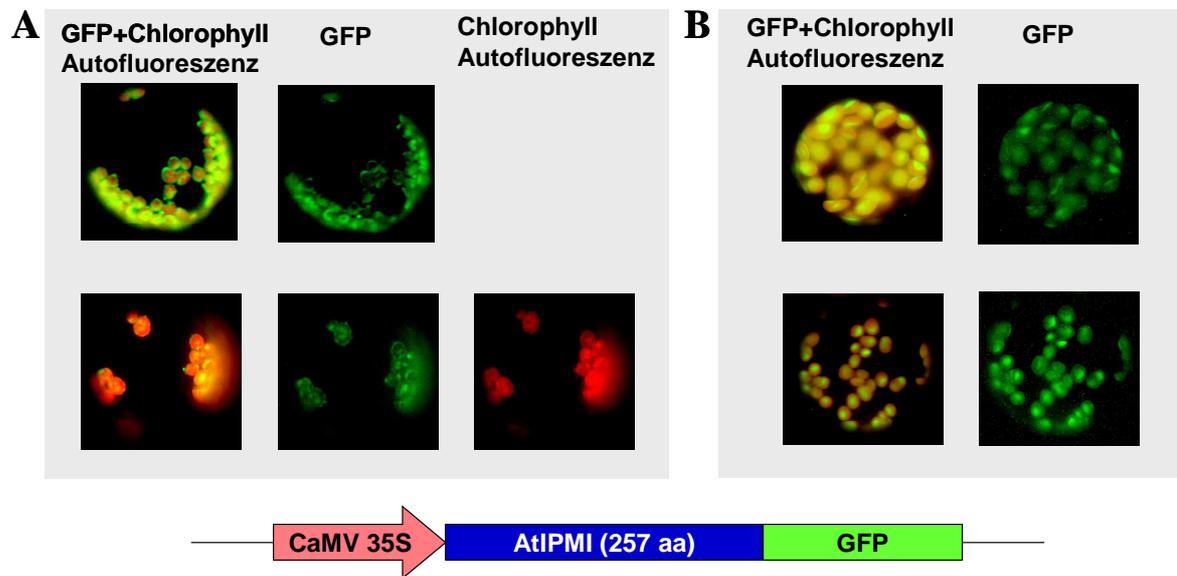


Abbildung 4.10 Lokalisation des IPMI SSU2:smGFP-Fusionsproteins in Tabak-Protoplasten (A) und in *Arabidopsis* Protoplasten (B). Die gesamte IPMI SSU2 cDNA wurde mit dem N-Terminus (=5'-Ende) des GFP-Leseraster fusioniert und sowohl für die transiente Transformation in *Nicotiana tabacum*-Protoplasten, als auch für die stabile Transformation von *Arabidopsis* Pflanzen eingesetzt. Es sind jeweils zwei Protoplasten (oben und unten) dargestellt. Die grüne Färbung der Chloroplasten beruht auf der Lokalisation der IPMI SSU2 in diesen Organellen.

4.5.2 Molekulargenetische Analyse verschiedener T-DNA-Insertionslinien

Um die Funktionen der Mitglieder der Aconitase-Familie *in vivo* zu untersuchen, wurde für jedes Gen mindestens eine T-DNA-Insertionsmutante etabliert. Der Insertionsort der T-DNA wurde jeweils in einer PCR-Analyse (*Polymerase Chain Reaction* = Polymerase-Kettenreaktion) untersucht. Hierfür wurde ein Fragment mit einem genspezifischen Primer und einem Oligonukleotid, das an die Border-Sequenz der T-DNA bindet, amplifiziert. Die Amplifikation dieses PCR-Produkts ist somit nur möglich, wenn die Insertion im vorhergesagten Gen liegt. Die Nukleotid-Abfolge des PCR-Produkts wurde in einer anschließenden Sequenzierung überprüft.

Für die Aconitase 1 und 2 wurde jeweils eine T-DNA-Insertionsmutante (SALK 026148 und SALK 014661) etabliert. In der *aco1-1* Mutante ist die T-DNA 96 Nukleotide vor dem Transkriptionsstartpunkt im 5'-untranslatierten Bereich dieses Gens lokalisiert. In der *aco2-1* Mutante befindet sich die T-DNA-Insertion im Exon 5. In RT-PCR-Analysen (Reverse

Transcription PCR) wurde nachgewiesen, dass die Insertion die Bildung des *ACO1*- bzw. *ACO2*-Transkripts in der jeweiligen Mutante verhindert. Es handelt sich bei den Mutanten um Knock-Out-Mutanten. Für die Aconitase 3 wurden insgesamt vier T-DNA-Mutanten etabliert (Tab. 4.32). Der Insertionsort der T-DNA ist in den einzelnen Mutanten unterschiedlich. Für die Mutantenlinie SALK 031352 wurde mit Hilfe der RT-PCR nachgewiesen, dass es sich um eine Knock-Out-Mutante handelt, da kein *ACO3*-Transkript detektierbar ist.

Für die kleine Untereinheit der Isopropylmalat-Isomerase IPMI SSU1 wurden zwei Insertionslinien untersucht (*ipmi ssu1-1* (SALK 115589) und *ipmi ssu1-2* (SALK 111666)). Es wurde jeweils nur Pflanzen gefunden, die das *ipmi ssu1*-Allel heterozygot enthalten. Da keine homozygote Mutanten identifiziert werden konnten, wurden die Schoten der heterozygoten Pflanzen näher untersucht (Abb. 4.11). Hierbei wurde festgestellt, dass bei den heterozygoten Pflanzen der Linie SALK 115589 die Embryozellen beim Ansatz einiger Samen früh absterben und in der reifen Schote deshalb mehr als 50 % weniger normale Samen enthalten sind (Abb. 4.11 A, B und D). Bei den Pflanzen der Linie SALK 111666 scheint die Embryoletalität zu einem späteren Zeitpunkt der Samenentwicklung einzusetzen (Abb. 4.11 C). In diesen Pflanzen unterscheiden sich die Samen aus noch nicht reifen Schoten in ihrem Erscheinungsbild. Einige Samen scheinen braun und vertrocknet zu sein. In der reifen Schote wurden auch hier etwa 50 % weniger Samen gezählt als in Schoten von Wildtyp-Pflanzen (Abb. 4.11 D).

Für IPMI SSU2 und IPMI SSU3 wurde jeweils eine T-DNA-Insertionsmutante etabliert (Tab. 4.32). Für beide Mutanten wurde der Knock-Out in einer RT-PCR-Analyse bzw. in einem Northern Blot-Experiment bestätigt. Das jeweilige *IPMI SSU*-Transkript ist nicht detektierbar. Für die große Untereinheit der Isopropylmalat-Isomerase IPMI LSU wurden drei Mutanten etabliert (Tab. 4.32). Bei allen Mutanten ist die T-DNA im 5'-untranslatierten Bereich inseriert. In der Mutantenlinie SALK 029510 wurde in einer RT-PCR und in einem Northern Blot-Experiment das *IPMI LSU*-Transkript nachgewiesen. Eine RT-PCR ergab das gleiche Ergebnis für die Mutantenlinie SAIL 369G04. Eine Expression des *IPMI LSU*-Gens wurde hingegen nicht in der GABI Kat-Linie 452D03 detektiert. Bei der GABI Kat-Linie handelt es sich, im Gegensatz zu den beiden anderen untersuchten Linien, um eine Knock-Out-Linie. Die beiden Insertionsmutanten SALK 029510 und SAIL 369G04 unterscheiden sich von der GABI Kat Linie in der Lokalisation der T-DNA. In letzterer liegt die Insertion nur 11 bp vor dem Translationsstartcodon, während in den beiden anderen Linien die Insertion 74 bzw. 70 bp vor dem ATG liegen (Tab. 4.32). Obwohl die Insertion im 5'-untranslatierten Bereich in den Mutanten SALK 029510 und SAIL 369G04 die Akkumulation von *IPMI LSU*-

Transkripten nicht verhindert, wäre es möglich, dass eine Insertion in einem Bereich liegt, der regulatorische Elemente des Gens beinhaltet. Um zu untersuchen, ob sich die Insertion auf die Gewebe- oder Entwicklungsspezifität der Expression von *IPMI LSU* in den beiden Mutanten auswirkt, wurde eine semi-quantitative RT-PCR-Analyse durchgeführt. Hierfür wurde Gesamt-RNA aus unterschiedlichen Geweben der beiden Mutanten SALK 029510 und SAIL 369G04 und einem Wildtyp isoliert, der aus dem gleichen Samenpool der Mutante SALK 029510 stammt. Die einzelnen Gesamt-RNA-Präparationen aus den unterschiedlichen Geweben wurden jeweils in eine cDNA-Synthese eingesetzt. Anschließend wurde die cDNA als Ausgangsmaterial für die Amplifikation des *IPMI LSU*-spezifischen PCR-Produkts mit den Oligonukleotiden At4g13430.GFP.H und At4g13430.GFP.R, die das gesamte Leseraster von *IPMI LSU* flankieren, eingesetzt. Als externer Standard für die relative Quantifizierung wurde in einer separaten Kontroll-PCR die konstitutiv exprimierte β -Tubulin2 mRNA amplifiziert (β -tub2.H und β -tub2.R). Die Menge der amplifizierten PCR-Produkte wurde nach einer Gelelektrophorese an einer Gel-Dokumentationsanlage ausgewertet. Die Quantifizierung mit Hilfe der Software „Bio1D“ (Version 12.06; Vilber Lourmat) erfolgte relativ zur Intensität der β -Tubulin2-PCR-Produkte. Die Ergebnisse der RT-PCR-Analyse sind in der Abbildung 4.12 dargestellt. Die Expression des *IPMI LSU*-Gens ist in der SALK Mutante in allen Geweben schwächer als in der SAIL-Mutante. In drei Wochen alten Rosettenblättern und in jungen Schoten der beiden Mutanten ist der *IPMI LSU*-mRNA-Level reduziert, wobei in der SALK 029510 Mutante die Repression stärker ist als in der SAIL 369G04 Mutante. In den Blüten der SALK-Mutante ist der *IPMI LSU*-mRNA-Level um 23 % reduziert, hingegen ist die Expression in den Blüten der SAIL-Mutante 30 % stärker als im Wildtyp. In den Knospen der SALK-Mutante wird *IPMI LSU* im gleichen Ausmaß wie im Wildtyp exprimiert, in den Knospen der SAIL-Mutante hingegen doppelt so stark. In der Sprossachse der beiden Mutanten ist die Expression von *IPMI LSU* erhöht. Die Ergebnisse der RT-PCR zeigen, dass der Insertionsort in den beiden Mutantenlinien zu einer unterschiedlichen Expression des *IPMI LSU*-Gens in den verschiedenen Geweben führt.

Name	Gen	Mutantenlinien	T-DNA-Insertionsort	Knock-Out	Methode zur Überprüfung des Knock-Outs
ACO1	At4g35830	<i>aco1-1</i> : SALK 026148	5'-utr (96 nt vor ATG)	ja	RT-PCR
ACO2	At2g05710	<i>aco2-1</i> : SALK 014661	Exon 5	ja	RT-PCR
ACO3	At4g26970	<i>aco3-1</i> : SALK 009537	Intron 12	-	
		<i>aco3-2</i> : SALK 054196	Intron 6	-	
		<i>aco3-3</i> : SALK 031352	Intron 3	ja	RT-PCR
		<i>aco3-4</i> : SALK 037286	Intron 15	-	-
IPMI LSU	At4g13430	<i>ipmi lsu-1</i> : SALK 029510	5'-utr (74 nt vor ATG)	nein	RT-PCR; Northern Blot-Analyse
		<i>ipmi lsu-2</i> : SAIL 369G04	5'-utr (70nt vor ATG)	nein	RT-PCR
		<i>ipmi lsu-3</i> : GABI Kat 452D03	5'-utr (11nt vor ATG)	ja	RT-PCR
IPMI SSU1	At2g43090	<i>ipmi ssu1-1</i> : SALK 115589	im Leseraster	embryoletal	
		<i>ipmi ssu1-2</i> : SALK 111666	im Leseraster	embryoletal	
IPMI SSU2	At2g43100	<i>ipmi ssu2-1</i> : SALK 548320	im Leseraster	ja	Northern Blot-Analyse
IPMI SSU3	At3g35890	<i>ipmi ssu3-1</i> : FLAG_149F10	am ATG	ja	RT-PCR

Tabelle 4.32 Überblick über die T-DNA-Insertionsmutanten für die einzelnen Mitglieder der Aconitase-Genfamilie.

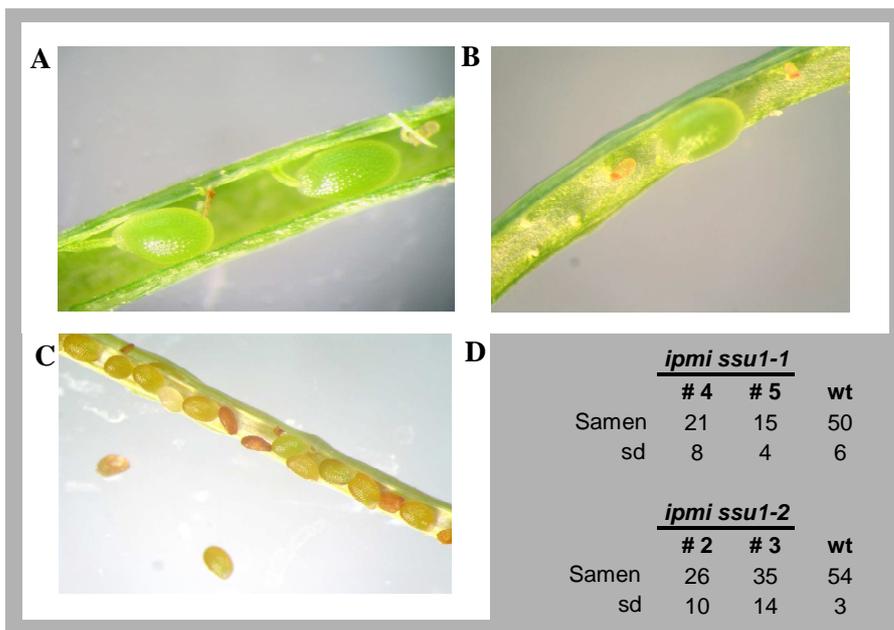


Abbildung 4.11 Schoten der *ipmi ssu1* Mutanten. Die Bilder A und B zeigen Schoten der Mutantenlinie SALK 115889, C zeigt die Schote der Mutantenlinie SALK 111666. D Die Schoten der *ipmi ssu1-1* (Pflanze #4 und #5) und *ipmi ssu1-2* (Pflanze #2 und #3) Mutanten enthalten weniger Samen als der Wildtyp (wt). Abkürzung: sd, Standardabweichung.

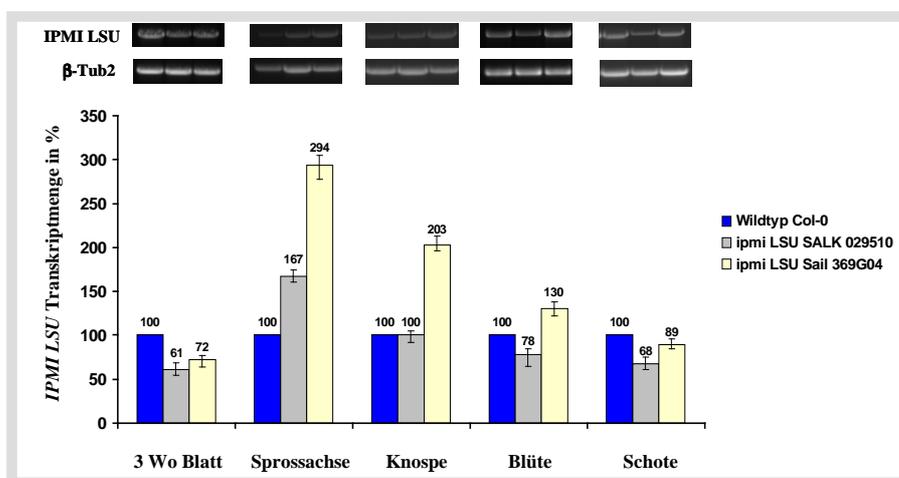


Abbildung 4.12 Ergebnisse der semi-quantitativen RT-PCR-Versuche. Aus verschiedenen Pflanzengeweben wurde Gesamt-RNA isoliert und die Transkriptmenge an *IPMI LSU* bestimmt. β -Tubulin2 (β -Tub2) diente als externer Standard, d.h. die *IPMI LSU*-Transkriptmenge wurde relativ zur β -Tubulin2-Transkriptmenge angegeben. Im oberen Bereich der Abbildung sind die PCR-Produkte dargestellt. Die gemittelten Ergebnisse von 3-5 PCR-Analysen sind in einem Diagramm dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die Abweichungen zum kleinsten bzw. größten Einzelwert an.

Abkürzungen: 3 Wo., 3 Wochen; Blatt, Rosettenblätter.

4.5.3 Aminosäure- und Glucosinolat-Spektren der etablierten T-DNA-Insertionslinien

Die beschriebenen Knock-Out-Mutanten für die Mitglieder der Aconitase-Familie wurden nun in einer Metabolit-Analyse auf ihren Gehalt an freien Aminosäuren und Glucosinolaten untersucht. Die Herstellung der Aminosäure-Extrakte und anschließende Bestimmung des Aminosäuregehalts erfolgte nach den unter Punkt 3.5.1 und 3.5.2 beschriebenen Methoden. Die Aufreinigung und der quantitative Bestimmung der Glucosinolate ist unter dem Punkt 3.6 beschrieben.

Die *aco1-1* Mutante zeigt im Aminosäuregehalt und im Glucosinolatgehalt in Rosettenblättern keine substantiellen Unterschiede zu den Werten des Wildtyps (Tab. 4.33). In den Samen sind die Aminosäuren Glutaminsäure um 14 % und Histidin um 90 % signifikant reduziert. Im Glucosinolat-Spektrum der Samen ist das Glucosinolat 5MSOP und 4MTB, das den Hauptanteil des Glucosinolatgehalts im Samen bildet, signifikant erhöht.

In den Rosettenblättern der *aco2-1* Mutante sind die Aminosäuren Methionin und Valin schwach erhöht (Tab. 4.33). In den Samen ist der Gesamt-Aminosäuregehalt um 26 % erhöht, dies resultiert überwiegend aus dem Anstieg an Phenylalanin, Serin, Tryptophan und Valin. Zudem ist in den Samen das Glucosinolat 4BZO um 18 % erhöht.

In den Rosettenblättern der *aco3-1* Mutanten ist die Konzentration an Threonin und Asparaginsäure leicht reduziert, nur eine Mutante zeigt eine Erhöhung an freiem Threonin und Asparaginsäure (Tab. 4.34). Diese Mutante weist als einzige einen erhöhten Gehalt an 4MTB auf während in den drei anderen Mutanten dieses Glucosinolat reduziert ist. In den Samen wurden keine signifikanten oder substantiellen Änderungen in den untersuchten Metaboliten festgestellt.

Die Aminosäure-Spektren in den Blättern und in den Samen der *ipmi ssu2-1* und *ipmi ssu3-1* Mutante weisen einige signifikante Veränderungen auf (Tab. 4.35). In den Rosettenblättern der *ipmi ssu2-1* Mutante sind die Gehalte der Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure reduziert. Die Gehalte an Alanin, Glutamin, Histidin, Serin und Threonin sind erhöht. In den Samen der *ipmi ssu2-1* Mutante ist der Aminosäuregesamtgehalt um 13 % erhöht. Diese Erhöhung resultiert aus dem Anstieg von Alanin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Isoleucin, Serin, Threonin und Valin in dieser Mutante. Die *ipmi ssu3-1* Mutante weist in den Blättern eine signifikante Erhöhung an Glutaminsäure und Glycin auf. In den Samen dieser Mutante sind Asparaginsäure, Isoleucin, Leucin und Serin im Vergleich zum Wildtyp stärker angereichert. In den Blättern der *ipmi ssu3-1* Mutante ist 7MSOH, in der *ipmi ssu2-1* Mutante ist 7MSOH und 8MSOO erhöht. In den Samen dieser Mutanten ist der

Gehalt an Methionin-abgeleiteten Glucosinolaten jeweils um 32 % erhöht. In der *ipmi ssu3-1* Mutante ist diese verstärkte Akkumulation auf den Anstieg aller gängigen Methionin-abgeleiteten Glucosinolat zurückzuführen. In der *ipmi ssu2-1* Mutante wird die Zunahme des Gesamt-Glucosinolatgehalts in den Samen hauptsächlich durch die Erhöhung des Gehalts an 3MTP bewirkt.

Für das *IPMI LSU*-Gen existieren drei unabhängigen T-DNA-Insertionsmutanten. Bislang wurde nur von den SALK- und SAIL-Mutanten Rosettenblätter und Samen in ausreichender Menge analysiert. Im Falle der GABI Kat-Mutante wurde der Glucosinolatgehalt im Blattmaterial in ausreichender Menge untersucht, der Glucosinolatgehalt in den Samen wurde bisher nur in einer Pflanze untersucht.

Homozygote Pflanzen der Linien SALK 029510 und SAIL 369G04 weisen in den Rosettenblättern und in den Samen kaum substantielle Veränderungen im Aminosäure-Spektrum auf (Tab. 4.36). Beide Mutanten enthalten in den Rosettenblättern mehr Methionin als der Wildtyp. In den Rosettenblättern *ipmi lsu-3* Mutante ist der Gehalt an Arginin, Asparagin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Histidin, Lysin, Methionin, SMM, Threonin und Valin erhöht (Tab. 4.36).

Dagegen gibt es deutlich zueinander ähnliche Veränderungen im Glucosinolatgehalt in den Rosettenblättern der beiden Mutanten als auch in der *ipmi lsu-3* Mutante. Der Gehalt an 3MSOP ist erhöht, hingegen sind die um mindestens eine Methylengruppe verlängerten Glucosinolate 4MSOB, 5MSOP, 7MSOH und 8MSOO reduziert. In den Samen der drei Mutanten ergibt sich ein ähnliches Glucosinolat-Spektrum. Die C3-Glucosinolate sind etwa 8-fach erhöht, die C4- bis C8-Glucosinolate sind deutlich reduziert.

Metabolit	Gen	Mutante	Gen	Mutante
	<i>ACO1</i> At4g35830	<i>aco1-1</i> : SALK 026148	<i>ACO2</i> At2g05710	<i>aco2-1</i> : SALK 014461
AA im Blatt		-		Met: + 12 % Val: + 11 %
AA in Samen		Glu: - 14 % His: - 90 %		Total AA: + 26% Phe: + 43 % Ser: + 70 % Trp: + 40 % Val: + 50 %
GS im Blatt		-		-
GS in Samen		5MSOP: + 54 % 4MTB: + 28 %		4BZO: + 18 %

Tabelle 4.33 Metabolit-Daten der ACO1- (SALK 026148) und ACO2 (SALK 014461)-Knock-Out-Mutante. Es sind jeweils die Aminosäuren bzw. Glucosinolate aufgeführt, die im Vergleich zum Wildtyp signifikant verändert sind. Die vollständigen Spektren sind im Anhang unter den Punkten 8.1.2 und 8.1.3 zu finden. Der Gehalt an Aminosäuren und Glucosinolaten wurde in 3 Wochen alten Rosettenblättern und in Samen bestimmt.

Abkürzungen: AA, Aminosäuren; Total AA, Gesamt-Aminosäuregehalt; GS, Glucosinolate; 4BZO 4-Methylbenzoyloxybutylglucosinolat; 4MTB, 4-Methylthiobutylglucosinolat; 5MSOP, 5-Methylsulfinylpentylglucosinolat.

Metabolit	Gen	Mutantenlinien			
	<i>ACO3</i> At4g26970	<i>aco3-1</i> : SALK 009537	<i>aco3-2</i> : SALK 054196	<i>aco3-3</i> : SALK 031352	<i>aco3-4</i> : SALK 037286
AA im Blatt		Thr: - 25 % Asp: - 25 %	Thr: - 8 % Asp: - 11 %	Thr: + 12 % Asp: + 24 %	Thr: -11 % Asp: - 8 %
AA in Samen		-	Thr: + 30 %	-	-
GS im Blatt		4MTB: - 45 %	4MTB: - 38 %	4MTB: + 60 %	4MTB: - 46 %
GS in Samen		-	-	-	-

Tabelle 4.34 Metabolit-Daten der ACO3-Knock-Out-Mutanten. Der Gehalt an Aminosäuren und Glucosinolaten wurde in 3 Wochen alten Rosettenblättern und in Samen bestimmt. Es sind jeweils die Aminosäuren bzw. Glucosinolate aufgeführt, die im Vergleich zum Wildtyp signifikant verändert sind. Die vollständigen Spektren sind im Anhang unter den Punkten 8.1.4 bis 8.1.7 zu finden.

Abkürzungen: AA, Aminosäuren; GS, Glucosinolate; 4MTB, 4-Methylthiobutylglucosinolat.

Metabolit	Gen	Mutante	Gen	Mutante
	<i>IPMI SSU2</i> At2g43100	<i>ipmi ssu2-1:</i> SALK 548320	<i>IPMI SSU3</i> At3g35890	<i>ipmi ssu3-1:</i> FLAG_149F10
AA im Blatt		Ala: + 31 % Asp: - 7 % Gln: + 21 % Glu: - 23 % His: + 1,3-fach Ser: + 9 % Thr: + 15 %		Glu: + 18 % Gly: + 89 %
AA in Samen		Total AA: + 13 % Ala: + 16 % Asp: + 15 % Glu: + 16 % Ile: + 13 % Ser: + 13 % Thr: + 18 % Val: + 17 %		Asp: + 41 % Ile: + 21 % Leu: + 25 % Ser: + 36 %
GS im Blatt		7MSOH: + 48 % 8MSOO: + 62 %		7MSOH: + 33 %
GS in Samen		Total GS /Total Met GS: + 32 % alle Standard-Met-GS erhöht		Total GS /Total Met GS: + 32 % 3MTP: + 42 %

Tabelle 4.35 Metabolit-Daten der IPMI SSU2 (SALK 048320)- und IPMI SSU3 (Flag_149F10)-Knock-Out-Mutante. Der Gehalt an Aminosäuren und Glucosinolaten wurde in 3 Wochen alten Rosettenblättern und in Samen bestimmt. Es sind jeweils die Aminosäuren bzw. Glucosinolate aufgeführt, die im Vergleich zum Wildtyp signifikant verändert sind. Die vollständigen Spektren sind im Anhang unter den Punkten 8.1.8 und 8.1.9 zu finden.

Abkürzungen: AA, Aminosäuren; Total AA, Aminosäuren gesamt; GS, Glucosinolate; Total GS, Gesamt-Glucosinolatgehalt; Total Met GS, Methionin-abgeleitete Glucosinolate gesamt; 3MTP, 3-Methylthiopropylglucosinolat; 7MSOH, 7-Methylsulfinylheptylglucosinolat; 8MSOO, 8-Methylsulfinyloctylglucosinolat.

Metabolit	Gen	Mutantenlinien		
		<i>ipmi lsu-1:</i> SALK 029510	<i>ipmi lsu-2:</i> SAIL 369G04	<i>ipmi lsu-3:</i> GABI Kat 452D03
AA im Blatt	<i>IPMI LSU</i> At4g13430	Ala: - 10 % Asp: + 13 % Glu: + 9 % Gly: - 35 % Met: + 1,2-fach Ser: + 11 % SMM: 0,19 nmol/mg (im wt nicht detektierbar)	Met: + 50 % Ser: + 10 %	Arg: + 18 % Asn: + 26 % Asp: + 21 % Glu: + 22 % His: + 80 % Lys: + 2,7-fach Met: + 2,2-fach SMM: 0,26 nmol/mg (im wt nicht detektierbar) Thr: + 13 % Val: + 51 %
AA in Samen		Asp: - 29 % Met: - 50 %	Arg: + 68 %	n.b.
GS im Blatt		3MSOP: + 6,6-fach 4MSOB: - 52 % 5MSOP: - 76 % 7MSOH: - 75 % 8MSOO: - 98 %	3MSOP: + 4,4-fach 4MSOB: - 40 % 7MSOH: - 23 % 8MSOO: - 87 %	3MSOP: + 9,1-fach 4MSOB: - 69 % 4MTB: - 74 % 7MSOH: - 96 % 8MSOO: - 100 %
GS in Samen		C3: + 8,5-fach C4: - 34 % C5: - 36 % C7: - 81 % C8: - 98 %	C3: + 8,2-fach C4: + 22 % C5: - 31 % C7: - 61 % C8: - 93 %	C3: + 8,3-fach C4: + 56 % C5: - 100 % C7: - 93 % C8: - 99 %

Tabelle 4.36 Metabolit-Daten der IPMI LSU-Insertionsmutanten. Der Gehalt an Aminosäuren und Glucosinolaten wurde in 3 Wochen alten Rosettenblättern und in Samen bestimmt. Es sind jeweils die Aminosäuren bzw. Glucosinolate aufgeführt, die im Vergleich zum Wildtyp signifikant verändert sind. Die vollständigen Spektren sind im Anhang unter den Punkten 8.1.10 bis 8.1.12 zu finden.

Abkürzungen: AA, Aminosäuren; GS, Glucosinolate; n.b., nicht bestimmt; 3MSOP, 3-Methylsulfinylpropylglucosinolat; 4MSOB, 4-Methylsulfinylbutylglucosinolat; 5MSOP, 5-Methylsulfinylpentylglucosinolat; 7MSOH, 7-Methylsulfinylheptylglucosinolat; 8MSOO, 8-Methylsulfinyloctylglucosinolat.

5. Diskussion

Die Untersuchung der an der Methionin-Kettenverlängerung beteiligten Enzyme zeigte, dass diese Proteine in Genfamilien codiert sind. Diese Genfamilien scheinen Mitglieder zu enthalten, die sowohl am Primär- und/oder Sekundärstoffwechsel beteiligt sind, wobei es individuelle Unterschiede gibt [Kroymann et al., 2001; Textor et al., 2004; Schuster et al., 2006; Binder et al., 2007; Textor et al., 2007].

Die an der Kondensationsreaktion im Kettenverlängerungszyklus beteiligten Methylthioalkylmalat-Synthasen (MAM1 und MAM3) sind Mitglieder der Isopropylmalat Synthase-Familie. Diese Genfamilie umfasst zwei weitere Mitglieder, die Isopropylmalat Synthasen IPMS1 und IPMS2, die sehr wahrscheinlich ausschließlich in der Leucinbiosynthese aktiv sind. Alle Vertreter der Isopropylmalat Synthase-Familie sind somit einzig in den Primär- oder in den Sekundärstoffwechsel involviert.

Die Untersuchungen zu den Genfamilien der Branched-Chain Aminotransferasen und Aconitasen in *Arabidopsis thaliana* zeigten jedoch, dass die Vertreter dieser Familien nicht ausschließlich dem Primär- oder dem Sekundärstoffwechsel zugeordnet werden können. Vielmehr ergaben die Mutanten-Analysen zu AtBCAT3 und -4 und IPMI LSU, IPMI SSU2 und -3, dass diese Proteine sowohl an der Methionin-Kettenverlängerung, als auch an der Biosynthese verschiedener verzweigtkettiger Aminosäuren beteiligt sind.

5.1 AtBCAT4 ist hauptverantwortlich für die initiale Reaktion in der Methionin-Kettenverlängerung

Zu Beginn dieser Arbeit wurde für AtBCAT4 eine Beteiligung an der Glucosinolatbiosynthese angenommen, wobei die genaue Funktion von AtBCAT4 in der Methionin-Kettenverlängerung nicht bekannt war.

Die in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro*-Enzymaktivitätstests zeigten, dass AtBCAT4 vor allem Substrate aus der Methionin-Kettenverlängerung umsetzt (Abb. 4.2 und 4.3). Neben Methionin, dem Ausgangssubstrat des Kettenverlängerungszyklus der Glucosinolatbiosynthese, wird Homomethionin, ein weiterer Metabolit dieses Stoffwechselwegs, umgesetzt. Dieses um eine Methylengruppe verlängerte Methionin-Derivat entsteht nach einmaligem Durchlaufen des Kettenverlängerungszyklus und einer anschließenden Transaminierung. AtBCAT4 zeigt unter den getesteten Substraten die höchste Affinität zu Methionin, was durch den niederen K_m -Wert von 0,93 mM angezeigt wird (Abb.

4.3 A). Die hohe Affinität zu Methionin weist daraufhin, dass AtBCAT4 die initiale Reaktion der Methionin-Kettenverlängerung katalysiert.

Die Resultate aus den Deaminierungstests werden durch die Ergebnisse aus den vorangegangenen Untersuchungen zur Aminierungsaktivität unterstützt. Auch in diesen Experimenten setzt AtBCAT4 mehrere Metabolite aus dem Kettenverlängerungsweg um. So werden Ketomethylthiobutyrat (MTOB) und Ketomethylthiopentanoat (MTOP), das durch einmaliges Durchlaufen des Zyklus entsteht, zur jeweiligen Aminosäure umgesetzt. Zu MTOB zeigt AtBCAT4 eine geringere Affinität. Diese Ergebnisse deuten an, dass AtBCAT4 nicht nur am initialen Schritt, sondern auch an der Transaminierung von MTOB am Ende des Kettenverlängerungszyklus beteiligt sein könnte.

Die Metabolit-Analysen zweier unabhängiger AtBCAT4-Knock-Out-Mutanten sprechen für eine Funktion von AtBCAT4 an der initialen Transaminierungsreaktion. Der Funktionsverlust von AtBCAT4 führt in den Mutanten zu einer Reduktion des Gesamtgehalts an Methionin-abgeleiteten Glucosinolaten um 50 %. Die starke Reduktion fast aller Methionin-abgeleiteten Glucosinolate deutet daraufhin, dass AtBCAT4 die initiale Transaminierung in der Methionin-Kettenverlängerung katalysiert. Durch den Ausfall dieser Transaminierungsreaktion wird Methionin nicht mehr ausreichend zu Ketomethylthiobutyrat (MTOB) deaminiert und der Grundbaustein für alle weiteren Glucosinolate wird limitiert. Zudem ist in den *bcat4-1* und *bcat4-2* Mutanten eine verstärkte Anreicherung von Methionin und dessen Transportform S-Methylmethionin (SMM) zu beobachten [Schuster et al., 2006]. Ein so deutlicher Anstieg im Methioningehalt bei Funktionsverlust des AtBCAT4-Proteins ist nur dann zu erwarten, wenn Methionin das direkte Substrat von AtBCAT4 darstellt. Hinweise für eine Beteiligung von AtBCAT4 an weiteren Transaminierungsreaktionen am Ende der Methionin-Kettenverlängerung liefert bislang nur die *in vitro*-Aminierung von Ketomethylthiopentanoat (MTOB). Aufgrund des Funktionsverlusts von AtBCAT4 würde man erwarten, dass MTOB nicht zu Homomethionin umgesetzt wird. Folglich ist in den *bcat4* Mutanten eine überdurchschnittliche Reduktion der C3-Glucosinolate, die aus diesem Methionin-Derivat gebildet werden, zu erwarten. Dies wurde jedoch nicht beobachtet. In diesem Fall unterstützt das Glucosinolat-Spektrum nicht die *in vitro*-Aktivitätsmessungen. Daher bleibt die Beteiligung dieser Aminotransferase an weiteren Transaminierungen im Kettenverlängerungsweg fraglich.

Die hohe Affinität von AtBCAT4 zu Methionin und MTOB *in vitro* und die starke Reduktion fast aller Methionin-abgeleiteter Glucosinolate in den AtBCAT4-Knock-Out-Mutanten sprechen eindeutig dafür, dass AtBCAT4 die initiale Transaminierung im Methionin-

Kettenverlängerungsweg katalysiert. Über eine Funktion dieser Aminotransferase an weiteren Transaminierungsschritten sind anhand der Ergebnisse keine Schlüsse möglich.

5.2 Kompartimentierung der Methionin-Kettenverlängerung in *A. thaliana*

Die Biosynthese Methionin-abgeleiteter Glucosinolate ist auf mehrere Kompartimente aufgeteilt. Bisher wurde angenommen, dass der erste Abschnitt, die Methionin-Kettenverlängerung ausschließlich in den Plastiden stattfindet und die hierbei gebildeten Methionin-Derivate abschließend am Endoplasmatischen Reticulum/Cytosol-Interface weiter zu Glucosinolaten umgesetzt werden [Mikkelsen et al., 2002; Grubb and Abel, 2006].

Die Ergebnisse aus einer subzellulären Lokalisationsstudie mit einem AtBCAT4:GFP-Fusionsprotein, sowie das in dieser Arbeit gezeigte Zellfraktionierungsexperiment zeigen, dass AtBCAT4 im Cytosol lokalisiert ist (Abb. 4.4) [Knill, 2005; Schuster et al., 2006]. Zudem spricht für eine cytosolische Lokalisation, dass das AtBCAT4-Protein im Gegensatz zu den mitochondrial oder plastidär lokalisierten Mitgliedern der Branched-Chain Aminotransferase-Familie am N-Terminus kein Signalpeptid besitzt, das für den Transport in das jeweilige Organell nötig ist. Auch weist das AtBCAT4-Protein weder im N-terminalen noch im C-terminalen Bereich ein peroxisomales Lokalisierungssignal auf. Eine zusätzliche subzelluläre Lokalisation von AtBCAT4 in den Peroxisomen ist somit ebenfalls mit sehr großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen. Aufgrund der Lokalisation von AtBCAT4 findet die initiale Transaminierung in der Methionin-Kettenverlängerung im Cytosol statt.

Nach wie vor sprechen die Untersuchungen zu den Methylthioalkylmalat-Synthasen (MAM1 und MAM3) für eine plastidäre Lokalisation der von diesen Enzymen katalysierten Reaktionen. So werden in Extrakten angereicherter plastidärer Proteine aus *Eruca sativa* eine MAM-Aktivität nachgewiesen, während in Gesamt-Proteinlysaten diese Aktivität nicht detektiert wurde [Falk et al., 2004]. MAM3 wurde zudem in einem *in situ*-Hybridisierungsexperiment mit einem MAM3-spezifischen Antikörper in den Chloroplasten von *Arabidopsis thaliana* detektiert [Textor et al., 2007]. Somit scheint die Kondensationsreaktion im Methionin-Kettenverlängerungszyklus in den Plastiden stattzufinden.

Der nächste Schritt im Methionin-Kettenverlängerungszyklus ist eine Isomerisierungsreaktion, die vermutlich von den Isopropylmalat Isomerasen IPMI LSU, IPMI SSU2 und IPMI SSU3 katalysiert wird. Die experimentellen Untersuchungen und die *in silico* Daten zu diesen Genen weisen daraufhin, dass diese Reaktion ebenfalls in den Chloroplasten

abläuft (Tab. 4.31 und Abb. 4.10). Somit erfolgen mindestens zwei von drei Reaktionsschritten des Methionin-Kettenverlängerungszyklus in den Chloroplasten. Die nach einmaligem oder mehrfachem Durchlaufen des Verlängerungszyklus entstehende Ketosäure wird in einer Transaminierungsreaktion, die entweder in den Plastiden oder aber im Cytosol stattfindet, zum entsprechenden Methionin-Derivat aminiert. Ein Kandidat für die Transaminierung in den Plastiden ist AtBCAT3, dessen plastidäre Lokalisation in früheren Untersuchungen nachgewiesen wurde [Diebold et al., 2002]. AtBCAT3 scheint die Umsetzung von MTOP und MTOHX zu den entsprechenden Methionin-Derivaten zu katalysieren. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse aus den *in vitro* Enzymtests und aus den *in vivo* Metabolit-Analysen der *bcat3-1* Mutante unterstützt [Schuster et al., 2006] (Tab. 4.8 und 4.9). Da die Affinität von AtBCAT3 *in vitro* zu Ketosäuren mit steigender Kettenlänge abnimmt, werden jedoch vermutlich die längerkettigen Substrate von einer anderen Aminotransferase, möglicherweise einem weiteren plastidären Mitglied der Branched-Chain Aminotransferase-Familie umgesetzt. Vorstellbar ist aber auch, dass die Transaminierung des verlängerten MTOB nach einem Export im Cytosol erfolgt. Für eine mögliche oder teilweise Transaminierung der Ketosäuren im Cytosol sprechen zudem Fütterungsversuche mit $[N^{15}]$ -markiertem Methionin. Hierbei wurde gefunden, dass Methionin als Aminogruppendonor dient und die Aminogruppe zur Verlängerung der Ketosäure verwendet wird [Graser et al., 2000]. Die dabei beobachtete hohe Retention der Aminogruppe deutet an, dass beide Transaminierungsreaktionen in einem Kompartiment stattfinden. Da es *in vivo* keine Hinweise für die Beteiligung von AtBCAT4 an diesen Transaminierungsschritten gibt, scheint eine weitere cytosolische Aminotransferase diese Funktion zu übernehmen.

Diese Untersuchungen zeigen, dass die Methionin-Kettenverlängerung in unterschiedlichen Kompartimenten stattfindet. Während die initiale Transaminierungsreaktion im Cytosol erfolgt, läuft der Kettenverlängerungszyklus in den Plastiden ab. Ein Kandidat für die Transaminierung von MTOP und MTOHX am Ende der Methionin-Verlängerung ist das plastidäre AtBCAT3. Auf die Funktion dieser Aminotransferase in der Methionin-Kettenverlängerung wird unter 5.4 näher eingegangen. Somit erfolgt dieser Schritt vermutlich ebenfalls separiert von der initialen Transaminierungsreaktion in den Plastiden. Da die Affinität von AtBCAT3 gegenüber längerkettiger Substrate geringer ist, wäre es zudem denkbar, dass eine weitere Aminotransferase an dieser Reaktion beteiligt ist.

5.3 AtBCAT3 katalysiert sehr wahrscheinlich die Bildung von Methionin-Derivaten aus verlängerten Ketosäuren in der Methionin-Kettenverlängerung

In silico Recherchen zur Genexpression zeigten, dass AtBCAT3 als einziges Mitglied der Genfamilie mit AtBCAT4 und MAM1 co-exprimiert ist (<http://www.arabidopsis.org/info/expression/ATGenExpress.jsp>). Dies deutete bereits daraufhin, dass ein weiteres Mitglied der Branched-Chain Aminotransferase-Familie an der Biosynthese Methionin-abgeleiteter Glucosinolate beteiligt ist. Diese Funktion der Aminotransferase wird zudem durch erste *in vitro*-Aminierungsexperimente gestützt, in denen AtBCAT3 ebenfalls Substrate aus dem Kettenverlängerungszyklus der Glucosinolatbiosynthese umsetzt [Knill, 2005; Knill et al., 2008].

Das Glucosinolat-Spektrum der in dieser Arbeit charakterisierten *bcat3-1* Mutante lieferte nun eindeutige Hinweise, an welchen Transaminierungsreaktionen AtBCAT3 in der Methionin-Kettenverlängerung beteiligt ist. AtBCAT3 scheint die um eine oder um zwei Methylengruppen verlängerte Ketosäure, Ketomethylthiopentanoat (MTOP) und Ketomethylthiohexanoat (MTOHX) zum jeweiligen Methionin-Derivat zu reaminieren, so dass diese Substrate beim Ausfall von AtBCAT3 im Kettenverlängerungszyklus verbleiben und weiter verlängert werden. Dafür spricht, dass die Glucosinolate, die sich von dem um drei (5MSOP, 5MTP) bzw. um fünf (7MSOP) Methylengruppen verlängerten Methionin-Derivaten ableiten, sowohl in den Samen als auch in den Blättern der Mutante deutlich stärker angehäuft werden (Tab. 4.8 und 4.9). Die kurzkettigen Glucosinolate, die sich von Homomethionin (3MSOP) und dem um zwei Methylengruppen verlängerten Methionin-Derivat (4OHB, 4BZO) ableiten, sind hingegen in der Mutante leicht reduziert (Tab. 4.8 und 4.9). Diese reduzierten Glucosinolat-Spezies werden aus den Methionin-Derivaten gebildet, die in der Transaminierung der verlängerten Ketosäuren MTOP und MTOHX in der Methionin-Kettenverlängerung entstehen. Dieser *in vivo* beobachtete Effekt bestätigt die Ergebnisse aus den *in vitro*-Substrattests, in denen AtBCAT3 diese Ketosäuren umsetzte [Knill, 2005; Knill et al., 2008]. Hierbei scheint die Affinität von AtBCAT3 zum Substrat mit zunehmender Kettenlänge der Ketosäure abzunehmen. Weitere Aminotransferasen, möglicherweise aus der Familie der Branched-Chain-Aminotransferasen könnten ebenfalls diese Reaminierung längerer Ketosäuren in der Methionin-Kettenverlängerung übernehmen.

5.4 Der Ausfall von AtBCAT4 scheint teilweise durch AtBCAT3 kompensiert zu werden

In den beiden unabhängigen AtBCAT4-Knock-Out-Mutanten, *bcat4-1* und *bcat4-2* ist der Gesamtgehalt an Methionin-abgeleiteten Glucosinolaten um 50 % reduziert, während in der *bcat3-1/bcat4-2* Mutante der Gehalt dieser Glucosinolat-Spezies in den Rosettenblättern 44 % und in den Samen 28 % verglichen mit dem Wildtyp beträgt [Knill et al., 2008] (Tab. 4.12 und 4.13). In der *bcat3-1/bcat4-2* Doppel-Mutante führt also der zusätzliche Funktionsverlust von AtBCAT3 zu einer weiteren Abnahme im Gehalt Methionin-abgeleiteter Glucosinolate. In der Doppel-Mutante wird offensichtlich noch weniger Methionin zu MTOB deaminiert, das den Grundbaustein der Methionin-abgeleiteten Glucosinolate darstellt. Folglich werden weniger dieser Sekundärmetabolite synthetisiert. Diese verstärkte Reduktion deutet daraufhin, dass AtBCAT3 auch an der initialen Transaminierung von Methionin beteiligt ist. Dies erklärt vermutlich auch, warum in den AtBCAT4-Knock-Out-Mutanten Methionin-abgeleitete Glucosinolate gebildet werden können. Das plastidäre AtBCAT3 scheint somit den Funktionsverlust des cytosolischen AtBCAT4-Proteins in einem gewissen Ausmaß zu kompensieren. Da neben der Methioninbiosynthese im Cytosol, noch ein weiterer Syntheseweg in den Chloroplasten existiert, kann das plastidär lokalisierte AtBCAT3 in einem gewissen Ausmaß MTOB für die Methionin-Kettenverlängerung zur Verfügung stellen [Wallsgrove et al., 1983; Ravanel et al., 1998; Hesse et al., 2004]. Umgekehrt zeigt die Metabolit-Analyse der *bcat3-1* Mutante jedoch keine Reduktion des Gesamtgehalts an Methionin-abgeleiteten Glucosinolaten (Tab. 4.7 – 4.9). Die cytosolische Transaminierung von Methionin scheint somit die wichtigste Quelle zur Bereitstellung von MTOB für die Biosynthese Methionin-abgeleiteter Glucosinolate zu sein.

Zudem scheint es weitere Möglichkeiten zu geben, den Ausfall in der Transaminierung von Methionin zu kompensieren, da in der *bcat3-1/bcat4-2* Doppel-Mutante weiterhin Methionin-abgeleitete Glucosinolate gebildet werden. Die Transaminierung von Methionin zu MTOB könnte beispielsweise von einer anderen Aminotransferase katalysiert werden, oder aber MTOB oder die kettenverlängerten Methionin-Derivate werden aus anderen Stoffwechselwegen rekrutiert. So entsteht MTOB im Methionin-Recycling-Pfad, Yang-Zyklus, in dem Methionin über 5^ˆ-Methylthioadenosin (MTA), ein Nebenprodukt der Ethylen-Synthese, zu MTOB umgesetzt wird. Im letzten Schritt dieses Stoffwechselwegs wird normalerweise MTOB zu Methionin transaminiert. Diese Transaminierung bleibt jedoch vermutlich in der *bcat3-1/bcat4-2* Mutante aus, da die Konzentration des Produkts Methionin sehr viel höher ist als die des Edukts MTOB. Dieses MTOB kann dann für die

Glucosinolatbiosynthese verwendet werden, so dass trotz Ausfall von AtBCAT4 und AtBCAT3 Methionin-abgeleitete Glucosinolate gebildet werden können. Um zu untersuchen, ob das MTOB aus dem Yang-Zyklus stammt, wäre es sinnvoll eine *bcat4* Mutante mit einer Mutante zu kreuzen, in der der Yang-Zyklus nicht funktioniert. Werden in dieser Doppel-Mutante keine Methionin-abgeleiteten Glucosinolate mehr synthetisiert, scheint für die Biosynthese dieser Glucosinolate in den *bcat4* Mutanten MTOB aus dem Yang-Zyklus verwendet zu werden.

5.5 Die Biosynthese von Valin wird sehr wahrscheinlich durch AtBCAT3 unterstützt

AtBCAT3 scheint neben der Funktion im Kettenverlängerungszyklus, auch an der Biosynthese verzweigtkettiger Aminosäuren beteiligt zu sein. Der reduzierte Valingehalt in der *bcat3-1* Mutante weist deutlich daraufhin, dass AtBCAT3 in die Biosynthese verzweigtkettiger Aminosäuren involviert ist (Tab. 4.7). Wenn man die Biosynthesewege der verzweigtkettigen Aminosäuren betrachtet, so würde man bei einer unmittelbaren Beteiligung an der Valinbiosynthese in der Mutante eine Zunahme an Leucin erwarten. Ketosäuren aus der nicht vollendeten Valinbiosynthese würden zusätzlich für die Leucinbiosynthese zur Verfügung stehen. In der Mutante wurde jedoch kein erhöhter Leucingehalt detektiert, sondern Leucin-abgeleitete Glucosinolate gefunden, die im Wildtyp nicht detektierbar sind. Diese Beobachtung legt nahe, dass in der AtBCAT3-Knock-Out-Mutante vermutlich insgesamt mehr Leucin gebildet wird, dieses jedoch zu Leucin-abgeleiteten Glucosinolaten umgesetzt wird, um die Homöostasis der verzweigtkettigen Aminosäuren zu erhalten bzw. wiederherzustellen. Dass dies zutrifft, zeigen auch die Ergebnisse der Fütterungsexperimente, in denen nach mittel- und langfristiger Verabreichung von Leucin im Wildtyp-Pflanzen und in der *bcat3-1* Mutante Leucin-abgeleitete Glucosinolate detektiert werden.

Die Ergebnisse aus einem Substratvergleichstest mit rekombinantem AtBCAT3-Protein bestätigen zudem, dass AtBCAT3 ebenfalls die Ketosäuren der verzweigtkettigen Aminosäuren umsetzt [Knill, 2005; Knill et al., 2008]. Die dabei gemessenen Aktivitäten zeigen, dass AtBCAT3 eine höhere Affinität zu den Substraten der Biosynthese verzweigtkettiger Aminosäuren aufweist als zu den Substraten der Glucosinolatbiosynthese. Hierbei ist interessant, dass AtBCAT3 eine geringere Affinität zu Ketoisovalerat (KIV) aufweist als die Isopropylmalat Synthasen IPMS1 und IPMS2. Diese katalysieren die Kondensation von KIV in der Leucinbiosynthese und konkurrieren somit mit AtBCAT3 um KIV. Aufgrund der höheren Affinität von IPMS1 und IPMS2 zu KIV ist gewährleistet, dass

KIV ebenfalls in die Leucinbiosynthese eingeht [K_m : 0,3 und 0,28 mM; de Kraker et al., 2007].

Zusammengefasst scheint AtBCAT3 neben der Beteiligung an der sekundären Glucosinolatbiosynthese, sehr wahrscheinlich eine Funktion im primären Aminosäuremetabolismus zu haben, wie die Ergebnisse aus den *in vitro*-Substrattests und der Metabolit-Analyse der *bcat3-1* Mutante zeigen.

5.6 Funktionelle Bedeutung der Leucin-abgeleiteten Glucosinolate in *Arabidopsis*

thaliana

Wie bereits im vorherigen Abschnitt angedacht, werden die Leucin-abgeleiteten Glucosinolate möglicherweise gebildet, um einen Überschuss an Leucin zu verhindern. Um diese Annahme näher zu untersuchen, wurde in Fütterungsexperimenten verzweigtkettige Aminosäuren mit dem Gießwasser verabreicht. Diese Experimente zeigen, dass bei mittel- und langfristiger Gabe von Leucin Leucin-abgeleitete Glucosinolate gebildet werden (Tab. 4.19 und 4.20). So findet man die Leucin-abgeleiteten Glucosinolate, 4MP und 5MH (4-Methylpentyl-GS und 5-Methylhexyl-GS) in den Rosettenblättern der Wildtyp-Pflanzen, in denen diese Glucosinolate normalerweise nicht detektierbar sind (Tab. 4.22). In den Rosettenblättern der *bcat3-1* Mutante führt die Gabe von Leucin zu erhöhten Mengen an 4MP und 5MH (Tab. 4.23). Die langfristige Verabreichung verzweigtkettiger Aminosäuren führt ebenfalls zur Bildung Leucin-abgeleiteter Glucosinolate in den Samen der *bcat3-1* Mutante und der Wildtyp-Pflanzen (Tab. 4.27 und 4.28). Die Gabe von Isoleucin und Valin bewirkt ebenfalls, jedoch in einem geringeren Ausmaß eine vermehrte Anhäufung der Leucin-abgeleiteten Glucosinolate. Die Detektion von Leucin-abgeleiteten Glucosinolaten nach der Verabreichung von Valin und Isoleucin scheint in diesem Zusammenhang auf eine verstärkte Leucinbiosynthese zurückzuführen zu sein.

Die Umwandlung des freien Leucins in Leucin-abgeleitete Glucosinolate ermöglicht der Pflanze den Überschuss an dieser Aminosäuren zu vermeiden. Es ist aus früheren Experimenten bekannt, dass erhöhte Konzentrationen an Leucin eine wachstumshemmende Wirkung auf *Arabidopsis*-Pflanzen haben [Däschner, 2001]. Offensichtlich handelt es sich bei der Bildung dieser Glucosinolat-Spezies um einen Mechanismus, durch den die Pflanze freies Leucin in eine „unschädliche“ Form umwandelt, da die *bcat3-1* Mutante ein geringfügig verlangsamtes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp zeigt. Dieser wachstumshemmende

Effekt könnte ebenfalls von den gebildeten Leucin-abgeleiteten Glucosinolate verursacht werden.

Zudem zeigen die durchgeführten Versuche, dass dieser Mechanismus erst bei längerer Gabe von Leucin zum Tragen kommt. Die einmalige Verabreichung verzweigtkettiger Aminosäuren führt zu einer erhöhten Akkumulation der jeweils verabreichten Aminosäure im Wildtyp und in der *bcat3-1* Mutante (Tab. 4.14 und 4.15). Die Bildung von Leucin-abgeleiteten Glucosinolaten wurde nicht beobachtet (Tab. 4.16 und 4.17). Die in der Literatur beschriebene Feedback-Inhibierung der Acetohydroxyacid Synthase (AHAS) und der Isopropylmalat Synthase (IPMS) scheint durch die kurzfristige Gabe dieser Aminosäuren ausgelöst zu werden. Durch die Hemmung dieser Enzyme wird die Biosynthese von Leucin verlangsamt bzw. verhindert [Singh, 1999]. Da das Enzym AHAS ebenfalls an der Valin- und Isoleucinsynthese beteiligt ist, hemmt die durch einen Überschuss an Leucin ausgelöste Inhibition von AHAS auch die Synthese dieser Aminosäuren [Hagelstein and Schultz, 1993; Singh, 1999; Binder et al., 2007]. Dieser Feedback Effekt wird nach der Leucin-Verabreichung, sowie in der *bcat3-1* Mutante beobachtet. Die Leucin-Gabe bewirkt neben der stärkeren Anhäufung dieser Aminosäure, zudem eine Abnahme des Valingehalts (Tab. 4.14 und 4.15).

Würde die Feedback-Inhibition weiter anhalten aufgrund eines Überschuss an Leucin durch fortfolgende Verabreichung dieser Aminosäure oder durch den Funktionsverlust von AtBCAT3, würde man einen langfristigen Mangel an Valin und Isoleucin erwarten. Die Fütterungsexperimente weisen daraufhin, dass neben der bekannten Feedback-Inhibition die Bildung der Leucin-abgeleiteten Glucosinolate für die Erhaltung der Aminosäure-Homöostasis genutzt wird. Während die Feedback-Inhibition ein schnell einsetzender Mechanismus ist, scheint die Bildung der Leucin-abgeleiteten Glucosinolate erst bei einem längeranhaltenden Überangebot an Leucin zu erfolgen.

5.7 Die Biosynthese Leucin-abgeleiteter Glucosinolate

Das Auftreten der Leucin-abgeleiteten Glucosinolate warf nun die Frage auf, wie diese Sekundärmetabolite synthetisiert werden. Die detektierten Leucin-abgeleiteten Glucosinolate, 4-Methylthiopentylglucosinolat (4MP) und 5-Methylthiohexylglucosinolat (5MH) leiten sich von dem um zwei bzw. um drei Methylengruppen verlängerten Leucin-Derivat ab.

Der erste Abschnitt in der Biosynthese Leucin-abgeleiteter Glucosinolate, die Kettenverlängerung von Leucin, könnte grundsätzlich durch die Enzyme der Methionin-

Kettenverlängerung und/oder der Leucinbiosynthese erfolgen. Beide Biosynthesewege weisen die gleiche Reaktionsabfolge auf, die zur Verlängerung der eingeschleusten Ketosäure führt. Zudem werden die einzelnen Reaktionen mit Ausnahme der Kondensationsreaktion von Enzymen katalysiert, die sowohl an der Methionin-Kettenverlängerung, als auch der Leucinbiosynthese beteiligt sind. Für eine Leucin-Verlängerung durch die Enzyme der Methionin-Kettenverlängerung spricht, dass die entsprechenden MAM-Enzyme längerkettige Substrate umsetzen [Textor et al., 2004; Textor et al., 2007]. Die der Leucinbiosynthese zugeordneten Mitglieder dieser Genfamilie, die Isopropylmalat Synthasen (IPMS) akzeptieren längerkettige Substrate jedoch nicht, wie bereits *in vitro*-Substrattests mit IPMS1 und IPMS2 zeigten [de Kraker et al., 2007]. Zudem spricht für die Beteiligung der MAM-Enzyme an der Kettenverlängerung von Leucin, dass das Verabreichen von Methionin in den Fütterungsversuchen mit der *bcat3-1/bcat4-2* Mutante zu einem reduzierten Gehalt an Leucin-abgeleiteten Glucosinolaten führt, während alle Methionin-abgeleiteten Glucosinolate stark akkumuliert werden (Tab. 4.24). Ist die Methionin-Kettenverlängerung für die Leucin-Verlängerung zuständig, so wird der Überschuss an Methionin bevorzugt zu den entsprechenden Glucosinolaten umgesetzt und die Bildung der Leucin-abgeleiteten Glucosinolate erfolgt weniger effizient. Zudem scheint aufgrund der Methionin-Gabe der Methioningehalt so erhöht zu sein, dass Aminotransferasen mit einer sehr geringen Affinität zu Methionin und den verlängerten Ketosäuren die Transaminierungsreaktionen in der Methionin-Kettenverlängerung katalysieren, was folglich zu einer Zunahme an Methionin-abgeleiteten Glucosinolaten in der *bcat3-1/bcat4-2* Doppel-Mutante führt, obwohl AtBCAT4 und AtBCAT3 ausgefallen sind.

Der beobachtete reduzierte Gehalt an Leucin-abgeleiteten Glucosinolaten in der Doppel-Mutante könnte jedoch auch dadurch zustande kommen, dass die Methionin- und Leucin-Derivate zu einem späteren Zeitpunkt in der Glucosinolatbiosynthese am Endoplasmatischen Reticulum miteinander konkurrieren. Generell ist noch wenig darüber bekannt, ob die weitere Umsetzung der Leucin-Derivate über die bislang bekannten Schritte der Biosynthese Methionin-abeleiteter Glucosinolate erfolgen.

Die Untersuchungen zeigen, dass in Plastiden zwei Stoffwechselwege existieren, die potentiell geeignet sind die Leucin-Verlängerung durchzuführen. Da im Gegensatz zur Kondensationsreaktion die Isomerisierung und Transaminierung von Enzymen katalysiert wird, die sowohl eine Funktion in der Leucinbiosynthese, als auch in der Methionin-Kettenverlängerung haben, ist es fraglich, ob zwischen beiden Stoffwechselwegen immer eindeutig unterschieden werden kann. Vielmehr muss somit für die Leucin-Verlängerung

angenommen werden, dass Mitglieder beider Stoffwechselwege beteiligt sind und allein das Mengenverhältnis der unterschiedlichen Substrate über die bevorzugte Biosynthese eines Metabolits entscheidet.

5.8 Leucin als metabolisches Signal in *A. thaliana*

In den Fütterungsversuchen wurde beobachtet, dass in Wildtyp-Pflanzen bei einem kurzfristigen Überangebot an Leucin durch eine Feedback Inhibition der Acetohydroxyacid Synthase (AHAS) und der Isopropylmalat Synthase (IPMS) die Biosynthese von Leucin verlangsamt bzw. verhindert wird (siehe Punkt 5.6) (Singh et al., 1999). Die mittelfristige und längerfristige Gabe von Leucin führt zur Bildung von Leucin-abgeleiteten Glucosinolaten, wodurch die Homöostasis der Aminosäure erhalten bleibt. Die verstärkte Gabe von Leucin (+ 25 %) in dem Langzeit-Gießversuch mit der *bcat4-2* Mutante und Wildtyp-Pflanzen zeigt, dass dann eine Abnahme der Glucosinolate und Aminosäuren zu beobachten ist (Tab. 4.29 und 4.30; Wildtyp-Daten nicht gezeigt). Das längerfristige Überangebot an Leucin scheint einen negativen Einfluss auf den Stoffwechsel der Pflanzen zu haben. In diesem Versuch waren zwar keine signifikanten Wachstumsverzögerungen zu beobachten, doch ist aus früheren Studien bekannt, dass ein deutliches Überangebot an Leucin einen wachstumshemmenden Effekt hat [Däschner, 2001]. Offensichtlich scheint hier der Ablauf des Stoffwechsels gestört zu sein.

Im Menschen wirkt Leucin selbst als metabolisches Signal, das den mTOR (*mammalian target of rapamycin*) Signaltransduktionsweg aktiviert [Kimball et al., 2006]. Dieser Signalweg reguliert in Abhängigkeit von Nährstoffen, Hormonen und Stress-Signalen die Biogenese der Ribosomen, die Translation und die Transkription der Gene, die an der Translationsmaschinerie beteiligt sind [Dennis et al., 1999; Cutler et al., 2001]. Die genaue Wirkungsweise von Leucin in der Aktivierung dieses Signalwegs ist bisher ungeklärt. Es wurde jedoch gezeigt, dass die Erhöhung des Leucingehalts zu einer Phosphorylierung und somit Aktivierung der ribosomalen Kinase, S6K1 führt [Lynch et al., 2003]. Diese Kinase ist ein Substrat von mTOR und reguliert u. a. Faktoren der Proteinsynthese-Initiation. In *Arabidopsis* wurden Homologe für TOR (Thr/Ser Kinase) und dessen Interaktionspartner RAPTOR (*regulatory-associated protein of TOR*) identifiziert, der die TOR Kinase aktiviert [Menand et al., 2002; Deprost et al., 2005; Anderson et al., 2005]. TOR und RAPTOR spielen vermutlich eine Rolle in der pflanzlichen Embryonalentwicklung und/oder im meristematischen Wachstum [Anderson et al. 2005; Deprost et al. 2005; Menand et al., 2002].

Zudem wurden zwei S6K-Homologe (S6K1 und S6K2) in *Arabidopsis* gefunden [Mizoguchi et al., 1995]. S6K1 und S6K2 phosphorylieren, wie ihre Homologen im Menschen, das ribosomale S6 Protein (RPS6) und interagieren mit RAPTOR [Zhang et al., 1994; Turck et al., 1998; Mahfouz et al., 2006]. Das im Nukleolus lokalisierte S6K2 beeinflusst dort vermutlich die Interaktion von RPS6 und der Histon-Deacetylase (HD2B), was möglicherweise eine Auswirkung auf die Ribosomenbiogenese hat [Mahfouz et al., 2006].

Aufgrund dieser Untersuchungen ist es vorstellbar, dass Leucin auch in höheren Pflanzen als Signalstoff wirkt. Durch die weitere Verabreichung von Leucin in dem langfristigen Gießversuch könnte dann der TOR-Signaltransduktionsweg inaktiviert worden sein. Die Inaktivierung von mTOR führt zu einer Inhibierung der Proteinbiosynthese, was folglich das Wachstum und den Metabolismus negativ beeinflusst. Ebenfalls ist vorstellbar, dass Leucin in Pflanzen anders wirkt als im Menschen. Detaillierte Analysen zum Phosphorylierungszustand von S6K1 und S6K2 aus *Arabidopsis* nach Fütterung von verschiedenen Konzentrationen an Leucin könnten hilfreich sein um diese These weiter zu untersuchen.

5.9 Die Isopropylmalat Isomerasen der Aconitase-Genfamilie beinhaltet Mitglieder, die am Primär- und Sekundärstoffwechsel beteiligt sind

Auf der Suche nach Isopropylmalat Isomerasen, die die Isomerisierungsreaktion im Methionin-Kettenverlängerungszyklus und/oder in der Leucinbiosynthese in *Arabidopsis thaliana* katalysieren, wurden 7 potentielle Mitglieder der Aconitase-Familie identifiziert. Die Familie umfasst drei Aconitasen (siehe 5.10) und vermutlich vier Isopropylmalat-Isomeraseuntereinheiten (Tab. 4.31). Bei den Isopropylmalat Isomerasen unterscheidet man in eine große Untereinheit (IPMI LSU) und drei kleine Untereinheiten (IPMI SSU1-3). Da in Bakterien die Isopropylmalat Isomerasen Heterodimere darstellen, wäre es denkbar, dass sich die funktionelle Isopropylmalat-Isomerase in *Arabidopsis thaliana* ebenfalls aus einer großen und einer kleinen Untereinheit zusammensetzt [Prodromou et al., 1992]. Die große Untereinheit könnte mit jeder der drei kleinen Untereinheiten einen Komplex bilden, folglich sind drei verschiedene Isopropylmalat Isomerasen in *Arabidopsis thaliana* vorstellbar.

Die Metabolit-Analysen von drei unabhängigen *ipmi lsu* Mutanten weisen daraufhin, dass IPMI LSU an der Isomerisierungsreaktion im Methionin-Kettenverlängerungszyklus beteiligt ist, da alle längerkettigen Glucosinolate reduziert sind (Tab. 4.36). Die Reduktion der C4- und längerkettigen Glucosinolate im Spektrum der *ipmi lsu* Mutanten deutet übereinstimmend daraufhin, dass die IPMI LSU die Isomerasereaktion ab dem zweiten Durchgang der

Kettenverlängerung katalysiert, in denen die Verlängerung von Homomethionin um weitere Methylengruppen stattfindet. Die von diesen Methionin-Derivaten abgeleiteten Glucosinolate sind folglich bei Funktionsverlust von IPMI LSU in den Mutanten reduziert. Die Isomerisierungsreaktion im ersten Durchgang der Verlängerung von Methionin scheint jedoch von einem anderen Enzym katalysiert zu werden, da die C3-Glucosinolate, die sich von Homomethionin ableiten, in den *ipmi lsu* Mutanten sehr effizient gebildet werden können.

IPMI LSU scheint außerdem eine Rolle in der Leucinbiosynthese zu spielen, da in der *ipmi lsu-3* Mutante ein signifikante Zunahme im Valingehalt detektiert wurde (Tab. 4.36). Der vollständige Ausfall von IPMI LSU scheint zu einer verminderten Biosynthese von Leucin zu führen, so dass KIV vermehrt zu Valin umgesetzt wird. Zudem spricht für die Funktion von IPMI LSU in der Leucinbiosynthese, dass in der *ipmi lsu-3* Mutante ein erhöhter Gehalt an 2-Isopropylmalat, dem Ausgangssubstrat der Isomerisierungsreaktion in der Leucinbiosynthese detektiert wurde (unveröffentlichte Daten). Aufgrund des Funktionsverlusts von IPMI LSU würde man eine Reduktion im Leucingehalt erwarten, dieser ist in der *ipmi lsu-3* Mutante jedoch unverändert. Dies deutet daraufhin, dass ein weiteres Enzym an der Leucinbiosynthese beteiligt ist.

Lediglich für eine Linie (GABI Kat 452D03) der IPMI LSU T-DNA-Insertionsmutanten wurde der Knock-Out des *IPMI LSU*-Gens nachgewiesen. Alle drei *ipmi lsu* Mutanten weisen in den Rosettenblättern und in den Samen ein sehr ähnliches Glucosinolat-Spektrum auf, hingegen wurde der erhöhte Valingehalt in den Blättern nur in der Knock-Out-Mutante detektiert (Tab. 4.36). In den Rosettenblättern der *ipmi lsu-1* und *ipmi lsu-2* Mutante ist die *IPMI LSU*-Transkriptmenge um 40 bzw. 30 % reduziert (Abb. 4.12). Dies deutet daraufhin, dass die restliche Isomerase-Aktivität in den beiden Mutanten zur Aufrechterhaltung der Leucinbiosynthese verwendet wird.

Die Isopropylmalat-Isomerase IPMI SSU1 scheint maßgeblich an der Leucinbiosynthese beteiligt zu sein, da der Knock-Out des *IPMI SSU1*-Gens embryolethal ist (Abb. 4.11). Durch den Funktionsverlust von IPMI SSU1 scheint die essentielle Aminosäure Leucin in der Mutante nicht synthetisiert werden zu können, was für die Pflanze letal ist.

IPMI SSU2 und IPMI SSU3 sind Kandidaten für die Isomerisierungsreaktion im Kettenverlängerungszyklus, da diese Gene wie alle an der Biosynthese Methionin-abgeleiteter Glucosinolate beteiligten Gene bei Schwefelmangel reprimiert werden (Tab. 4.31). Bei Funktionsverlust von IPMI SSU2 bzw. IPMI SSU3 würde man also eine Reduktion der C3-Glucosinolate erwarten. Dies wurde in der *ipmi ssu2-1* und in der *ipmi ssu3-1* Mutante nicht beobachtet, was aber nicht automatisch gegen eine Beteiligung am Methionin-

Kettenverlängerungszyklus spricht (Tab. 4.35). Es ist möglich, dass IPMI SSU2 und IPMI SSU3 gegenseitig den Funktionsverlust des anderen Gens kompensieren können, da die Gene der beiden kleinen Untereinheiten der Isopropylmalat-Isomerase in allen Geweben und Entwicklungsstadien co-exprimiert sind (<http://www.arabidopsis.org/info/expression/ATGenExpress.jsp>). Die Herstellung einer Doppel-Mutante durch Kreuzung der *ipmi ssu2-1* und *ipmi ssu3-1* Mutante und anschließende Metabolit-Analyse könnte weitere Anhaltspunkte zur Funktion dieser beiden Untereinheiten im Methionin-Kettenverlängerungszyklus liefern.

Die Metabolit-Analysen der IPMI SSU2- und IPMI SSU3-Knock-Out-Mutante zeigten zudem Veränderungen in dem Gehalt verschiedener proteinogener Aminosäuren. So ist beispielsweise Alanin in der *ipmi ssu2* Mutante erhöht. Die Verknüpfung der verschiedenen Biosynthesewege dieser Aminosäuren ist zwar sehr komplex, doch deuten die Ergebnisse bereits an, dass IPMI SSU2 und IPMI SSU3 möglicherweise ebenfalls an der Leucinbiosynthese beteiligt sind. Durch eine weniger effiziente Leucinbiosynthese wird dauerhaft KIV verstärkt in der Valinbiosynthese anfallen. Wie aus der Literatur bekannt, führt die vermehrte Anhäufung von Valin zu einer Feedback-Inhibition an der Stelle der Acetolactat Synthase (AHAS), so dass Pyruvat stärker akkumuliert wird [Singh, 1999]. Pyruvat steht dann vermehrt für die Alaninbiosynthese zur Verfügung (siehe 8.3 Anhang). Eine signifikant stärkere Anhäufung von Valin wurde nur in der *ipmi ssu2-1* Mutante nachgewiesen. Dies steht jedoch nicht im Widerspruch zu einer Beteiligung an der Leucinbiosynthese, da übermäßig akkumuliertes Valin eine Feedback-Inhibition auslöst, durch die das an der Valinbiosynthese beteiligte AHAS gehemmt und folglich weniger Valin gebildet wird. Viel eher muss davon ausgegangen werden, dass die auflaufenden Kohlenstoffgerüste in andere Aminosäurestoffwechselwege einfließen. Dafür spricht auch die beobachteten diversen Veränderungen im Aminosäuregehalt dieser Mutanten (Tab. 4.35).

Trotz der Funktion von IPMI SSU2 und IPMI SSU3 in der Leucinbiosynthese, scheinen sie den Ausfall von IPMI SSU1 nicht komplementieren zu können, da die *ipmi ssu1-1* Mutante embryoletal ist. Laut AtGenexpress Daten ist *IPMI SSU1* in allen Geweben und Entwicklungsstadien mit Ausnahme der Pollen stark exprimiert (<http://www.arabidopsis.org/info/expression/ATGenExpress.jsp>). Die Expressionsstärke von *IPMI SSU2* und *IPMI SSU3* hingegen ist generell geringer als die von *IPMI SSU1*. Zudem sind IPMI SSU2 und IPMI SSU3 kaum in den Blüten, in der Sprossachse und den Samen exprimiert. Die unterschiedliche Expression dieser Isopropylmalat Isomerasen ist vermutlich die Ursache dafür, dass diese den Funktionsverlust von IPMI SSU1 nicht komplementieren

können. Zudem ist bislang nicht bekannt, ob die verschiedenen IPMI-Untereinheiten wie in Bakterien einen Komplex bilden, der erst dann seine volle Funktionalität entwickelt. In einem Immunopräzipitationsexperiment mit spezifischen Antikörpern gegen die verschiedenen Untereinheiten der IPMI wäre es möglich diese Untereinheiten aus Pflanzenextrakten zu isolieren und mögliche Interaktionspartner zu identifizieren. Metabolit-Analysen der durch Kreuzung hergestellten Mutanten, in denen unterschiedliche IPMI-Gene ausgeschaltet sind, könnten zudem weiteren Aufschluss über ein mögliches Zusammenspiel der einzelnen Untereinheiten liefern.

Die Ergebnisse zeigen, dass alle Isopropylmalat-Isomerase Untereinheiten potentiell an der Leucinbiosynthese und an der Biosynthese der Methionin-abgeleiteten Glucosinolate beteiligt sein könnten. Dies wird zudem durch die potentiell bzw. nachgewiesene plastidäre Lokalisation der IPMIs unterstützt, da beiden Stoffwechselwege in den Chloroplasten stattfinden (Tab. 4.31 und Abb. 4.10).

5.10 Die Aconitasen in *Arabidopsis thaliana* katalysieren sehr wahrscheinlich die Isomerisierungsreaktion im Citrat-Zyklus

Bei der Charakterisierung der Aconitase-Familie wurden neben den IPMI-Genen die drei Aconitasen, ACO1, -2 und -3 identifiziert (Tab. 4.31). Die Ergebnisse der Metabolit-Analysen der *aco* Mutanten deuten auf eine Funktion dieser Aconitasen im Citrat-Zyklus hin. ACO1, -2 und -3 wurden bereits im mitochondrialen Proteom nachgewiesen [Kruft et al., 2001; Millar et al., 2001; Heazlewood et al., 2004]. So sind diese Enzyme in dem Organell lokalisiert, in dem auch der Citrat-Zyklus stattfindet.

In der *aco1-1* Mutante sind die Gehalte an Glutaminsäure und Histidin reduziert (Tab 4.33). Glutaminsäure wird aus α -Ketoglutarat, das im Citrat-Zyklus entsteht, gebildet. So wird aufgrund des Funktionsverlusts von ACO1 vermutlich weniger α -Ketoglutarat gebildet, was für eine Beteiligung dieser Aconitase an der Isomerisation im Citrat-Zyklus spricht (siehe 8.3 Anhang). Zudem wird in höheren Pflanzen aus Glutaminsäure Glutamin gebildet. Über eine Änderung dieser Aminosäure in der Mutante kann keine Aussage gemacht werden, da zwischen den einzelnen Pflanzen sehr starke Abweichungen in den Gehalten auftraten. Histidin, das aus Glutamin entsteht, ist in der Mutante ebenfalls reduziert.

In der *aco2-1* Mutante wurden erhöhte Gehalte für Valin, Serin, Tryptophan und Phenylalanin gemessen (Tab. 4.33). Dem Citrat-Zyklus ist die Glykolyse vorgeschaltet. In dieser wird Glucose in mehreren Schritten zu Pyruvat umgesetzt. Pyruvat wird anschließend in den

Mitochondrien zu Acetyl-CoA umgewandelt, das im Citrat-Zyklus abgebaut wird. Die akkumulierten Aminosäuren in der *aco2-1* Mutante leiten sich von Pyruvat (Valin) oder von den Zwischenprodukten in der Glycolyse ab. Die Erhöhung dieser Aminosäuren in der *aco2-1* Mutante deuten daraufhin, dass bei Ausfall von ACO2 Pyruvat bzw. Zwischenprodukte aus der Glykolyse anfallen, da Pyruvat im Citrat-Zyklus nicht weiter abgebaut werden kann (siehe 8.3 Anhang).

Drei von vier etablierten *aco3* Mutanten weisen einen reduzierten Gehalt an Threonin und Asparaginsäure auf (Tab. 4.34). Durch den Funktionsverlust von ACO3 in den Mutanten scheint weniger Oxalacetat, das zu Aspartat umgesetzt wird, im Citrat-Zyklus gebildet zu werden (siehe 8.3 Anhang). Da Aspartat für die Threoninsynthese notwendig ist, führt die reduzierte Menge an Asparaginsäure in der Mutante dazu, dass weniger Threonin gebildet wird. Dies deutet auf eine Funktion von ACO3 im Citrat-Zyklus hin.

Die Metabolit-Daten der einzelnen Aconitase Mutanten weisen sehr stark auf eine Beteiligung dieser Proteine am Citrat-Zyklus hin, jedoch unterscheiden sich die Mutanten in ihren Aminosäure-Phänotypen. Den stärksten Effekt zeigt die *aco2-1* Mutante, da in dieser bereits Metabolite stark angereichert sind, die dem Citrat-Zyklus vorgeschaltet sind. Eine Erklärung hierfür ist, dass durch den Knock-Out von ACO2 eine Abnahme der Aconitase-Aktivität um 70 % nachgewiesen wurde [Moeder et al., 2007]. Der Funktionsverlust von ACO1 und ACO3 hingegen führte lediglich zu einem Aktivitätsverlust von 20 %. Dies weist daraufhin, dass ACO2 maßgeblich an der Isomerisierungsreaktion im Citrat-Zyklus beteiligt ist. Da die Aconitasen 2 und 3 mit Ausnahme der Samen in allen Geweben und in allen Entwicklungsstadien co-exprimiert sind, ACO3 aber eine geringere Aconitase-Aktivität besitzt, wäre es denkbar, dass ACO3 eine andere Funktion in den Pflanzen hat. So wurde nachgewiesen, dass die *aco* Mutanten geringere Transkriptmengen der Cu/Zn-Superoxid-Dismutase enthalten und toleranter gegenüber oxidativen Stress sind [Moeder et al., 2007].

Zusammengefasst deuten die Ergebnisse aus den Mutanten-Analysen auf eine Beteiligung der drei untersuchten Aconitasen am Citrat-Zyklus in *Arabidopsis thaliana* hin. Zudem scheint die geringere Aconitase-Aktivität von ACO1 und ACO3 daraufhin zu weisen, dass diese Aconitasen weitere Funktionen in *Arabidopsis thaliana* haben.

5.11 Biotechnologische Bedeutung der Branched-Chain Aminotransferasen und Isopropylmalat Isomerasen

Die Ergebnisse aus dieser Arbeit zeigen, dass der Funktionsverlust von Branched-Chain Aminotransferasen und Isopropylmalat Isomerasen zur Reduktion oder aber auch zur stärkeren Akkumulation bestimmter Glucosinolate und Aminosäuren führt. Somit scheint es möglich, durch Änderung der Expression dieser Enzyme eine gezielte Anhäufung bestimmter Glucosinolate und Aminosäuren zu erreichen.

Die Anreicherung bestimmter Metabolite in Nutzpflanzen kann man sich bei der Herstellung von Nahrungs- und Futtermittel mit verbessertem Nährwert zu Nutzen machen. Hinsichtlich ernährungsphysiologischer Aspekte ist es wünschenswert die essentiellen Aminosäuren Methionin, Valin, Leucin und Isoleucin verstärkt zu akkumulieren. Diese Aminosäuren können von Menschen nicht selbst synthetisiert werden und müssen ausschließlich über die Nahrung aufgenommen werden. Durch das Ausschalten von AtBCAT4 und AtBCAT3 wird in *Arabidopsis*-Blättern eine 30-fache Erhöhung des Methioningehalts erreicht. In den Samen der *bcat3-1/bcat4-2* Mutante verursacht der Ausfall dieser Aminotransferasen eine Anreicherung der verzweigtkettigen Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin. Mitglieder der Branched-Chain Aminotransferasen könnten daher bei der Herstellung von Nutzpflanzen mit erhöhten Gehalten an Methionin, Valin, Leucin und Isoleucin von biotechnologischer Bedeutung sein. Die aus den Nutzpflanzen aufgereinigten Aminosäuren könnten als Nahrungsergänzungsmittel verwendet werden. Die Aufnahme der Aminosäuren durch den Verzehr der Pflanzen beugt beispielsweise einem Aminosäure-Mangel bei Vegetariern vor.

Ebenfalls von großem Interesse ist die verstärkte Akkumulation bestimmter Glucosinolate, da die Hydrolyseprodukte dieser Sekundärmetabolite von medizinischer Relevanz sind. Sulforaphan, das Isothiocyanat-Derivat, das bei der Hydrolyse von 4-Methylsulfinylbutylglucosinolat (4MSOB) ableitet, ist bereits Gegenstand vieler Studien. Sulforaphan und andere Isothiocyanate verhindern das Tumorwachstum durch Inhibition des Zellzyklus und Induktion der Apoptose [Keum et al., 2004; Lund, E., 2003]. Zudem scheint sich Sulforaphan zur Behandlung von Gastritis und Magenkrebs zu eignen [Fahey et al., 2002]. Der Ausfall von AtBCAT4, AtBCAT3 bzw. Isopropylmalat-Isomerase IPMI LSU bewirkt einen reduzierten Gehalt an 4MSOB. Eine Überexpression der einzelnen Gene könnte folglich dazu eingesetzt werden, um dieses Glucosinolat anzureichern. Hierzu müssten die AtBCAT4-, AtBCAT3- und IPMI LSU-orthologen Proteine in einer Nutzpflanze, wie zum Beispiel Kohl oder Raps identifiziert werden. Eine Schwierigkeit hierbei liegt darin, dass die

Genome der meisten Nutzpflanzen bisher nicht vollständig sequenziert sind. Diese Nutzpflanzen werden in großen Mengen angezogen und könnten eine große Ausbeute an dem gewünschten Glucosinolat bzw. dessen Abbauprodukt liefern. Es ist möglich, dieses Hydrolyseprodukt mittels einer geeigneten Aufreinigungsmethode zu isolieren, so dass es als Wirkstoff in einem Medikament eingesetzt werden kann.

Die starke Akkumulation von Glucosinolaten ist zudem erstrebenswert aufgrund ihrer Eigenschaft als Fraßschutz gegen Herbivore. In einem Fraßversuch mit *Spodoptera*-Raupen wurde gezeigt, dass die Reduktion aller Methionin-abgeleiteter Glucosinolate um 50 % in den *bcat4* Mutanten dazu führt, dass diese Mutanten stärker befallen wurden als die Wildtyp-Pflanzen (Abb. 4.5 A und B). Durch Überexpression bzw. Ausschalten von AtBCAT4- und AtBCAT3-orthologen Proteinen in Nutzpflanzen der Familie der Brassicaceen ist es möglich die Zusammensetzung des Glucosinolat-Spektrums zu beeinflussen. Je nach Schädling könnten so bestimmte Glucosinolat-Spezies stärker angehäuft werden, deren Hydrolyseprodukte für den Schädling abschreckend oder toxisch sind.

6. Zusammenfassungen

6.1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion der Branched-Chain Aminotransferase 4 aus *Arabidopsis thaliana* näher untersucht. Zu Beginn dieser Arbeit existierten bereits Hinweise dafür, dass AtBCAT4 an der Biosynthese Methionin-abgeleiteter Glucosinolate beteiligt ist. Nun durchgeführte *in vitro*-Substratvergleichstest mit rekombinantem AtBCAT4 ergaben, dass Methionin das Hauptsubstrat dieser Aminotransferase darstellt. Dies wird durch den niedrigen K_m -Wert in der Deaminierungskinetik mit Methionin bestätigt. Methionin wird in der Methionin-Kettenverlängerung, dem ersten Abschnitt der Biosynthese dieser aliphatischen Glucosinolate, in einer initialen Transaminierung zu Ketomethylthiobutyrat umgesetzt. Die hohe Affinität von AtBCAT4 zu Methionin weist daraufhin, dass AtBCAT4 an dieser initialen Transaminierungsreaktion in der Methionin-Kettenverlängerung beteiligt ist. Diese Beobachtung geht einher mit der deutlichen Reduzierung Methionin-abgeleiteter Glucosinolate um 50 % in den beiden AtBCAT4-Knock-Out-Mutanten.

Zudem wurde in einem Zellfraktionierungsexperiment mit anschließender Immunodetektion nachgewiesen, dass AtBCAT4 im Cytosol lokalisiert ist. AtBCAT4 katalysiert vermutlich die initiale Transaminierung in der Methionin-Kettenverlängerung der Glucosinolatbiosynthese im Cytosol. Die zweite Reaktion in diesem Zyklus wird von den Methylthioalkylmalat-Synthasen, MAM1 und MAM3 katalysiert. Die MAM-Enzyme, wie auch die potentiellen Kandidaten für die weiteren Schritte im Kettenverlängerungszyklus sind in den Plastiden lokalisiert. Aus den unterschiedlichen subzellulären Lokalisationen der beteiligten Enzyme ergibt sich, dass die Methionin-Kettenverlängerung in unterschiedlichen Kompartimenten stattfindet.

Ein weitere Aufgabe dieser Dissertation bestand in der Aufklärung der Bedeutung und Funktion der Branched-Chain Aminotransferase 3. *In vitro*-Aminierungskinetiken zeigten, dass AtBCAT3 sowohl Substrate aus der Biosynthese verzweigtkettiger Aminosäuren als auch Ketomethylthiobutyrat (MTOB), den Grundbaustein der Methionin-abgeleiteten Glucosinolate umsetzt. Die hohe Affinität zu den Ketosäuren der verzweigtkettigen Aminosäuren und der reduzierte Valingehalt in der *bcat3-1* Mutante sprechen für eine Beteiligung von AtBCAT3 an der Biosynthese von Valin. Diese Aminotransferase hat sehr wahrscheinlich eine zusätzliche Funktion in der Glucosinolatbiosynthese, da die C4- und längerkettigen Glucosinolate in der *bcat3-1* Mutante reduziert sind. Die Beteiligung von

AtBCAT3 an der Glucosinolatbiosynthese wird außerdem durch die verstärkte Reduktion der Methionin-abgeleiteten Glucosinolate in der *bcat3-1/bcat4-2* Doppel-Mutante im Vergleich zu den *bcat4* Einzel-Mutanten unterstützt.

In der *bcat3-1* Mutante wurden zudem Leucin-abgeleitete Glucosinolate gefunden, die in Wildtyp-Pflanzen nicht nachweisbar sind. In Gießversuchen wurde gezeigt, dass ein mittel- und längerfristiger Überschuss an Leucin zur Bildung dieser seltenen Glucosinolat-Spezies auch in Wildtyp-Pflanzen führt. Möglicherweise dient die Bildung dieser Leucin-abgeleiteten Glucosinolate zur Aufrechterhaltung der Leucin-Homöostasis in *Arabidopsis thaliana*.

In einem weiteren Projekt wurden sieben potentielle Mitglieder der Aconitase-Familie in *Arabidopsis thaliana* identifiziert. Zur Familie der Aconitasen gehören vermutlich auch die vier Untereinheiten der Isopropylmalat-Isomerase. Anhand von Metabolit-Analysen entsprechender T-DNA-Insertionsmutanten der untersuchten Gene, scheint die große (IPMI LSU) und zwei kleine (IPMI SSU2 und IPMI SSU3) Untereinheiten sowohl in der Leucinbiosynthese als auch in der Biosynthese Methionin-abgeleiteter Glucosinolate eine Funktion zu haben. Die Embryoletalität der *ipmi ssu1-1* Mutante deutet daraufhin, dass IPMI SSU1 maßgeblich an der Leucinbiosynthese beteiligt ist. Die drei Aconitasen ACO1, -2 und -3 scheinen an einem anderen Stoffwechselweg beteiligt zu sein.

6.2 Summary

The main topic of this thesis was to investigate in detail the function of different branched-chain aminotransferases (AtBCATs) in *A. thaliana*. These characterizations should help to understand the relevance of AtBCATs both in primary and secondary metabolism. *In vitro* enzyme activity tests showed highest affinity of AtBCAT4 to methionine from which the respective glucosinolates are derived. In addition, detailed metabolite profiling with corresponding AtBCAT4 knock out mutants revealed a significant decrease of almost all methionine-derived glucosinolate species, and therefore a 50 % reduction in total amount of methionine-derived glucosinolates. These results indicate that AtBCAT4 is active in the initial transamination reaction at the very beginning of the methionine-derived glucosinolate biosynthesis. Cell fractionation experiments revealed a cytosolic localization for AtBCAT4, it seems to be obvious that the different steps of the methionine chain elongation are located in different compartments. While the methionine chain elongation cycle is located in plastids (condensation, isomerization, oxidative decarboxylation), the initial transamination reaction seems to be separated in the cytosol.

AtBCAT3, a plastid member of the AtBCAT family, seems to have a dual function both in primary and secondary metabolism. In enzyme activity tests AtBCAT3 accepts substrates of the branched-chain amino acid (BCAA) metabolism, as well as ketomethylthiobutyrate (MTOB) from which the methionine-derived glucosinolates are synthesized. A detailed metabolite profiling of a BCAT3 knock out mutant showed a reduction of valine and distinct changes in composition of methionine-derived glucosinolates. These results indicate that AtBCAT3 is involved in both valine biosynthesis and the chain elongation of methionine-derived glucosinolates.

Feeding experiments with different AtBCAT single and double knock out mutants lead to the detection of leucine-derived glucosinolates under specific conditions. While short after a once BCAA administration these amino acids were increased, accumulation of leucine-derived glucosinolates was only observed after long-term feeding. This suggests that the biosynthesis of leucine-derived glucosinolates can contribute to leucine homeostasis in plants.

A further important part of this thesis was to identify potential candidates for the isomerization reactions involved in the chain elongation cycle of glucosinolate biosynthesis and/or in the leucine biosynthesis. These analyses lead to the identification of an aconitase gene family in *A. thaliana* which comprises seven members. Based on amino acid sequence similarity one potential large subunit (IPMI LSU) and three small subunits (IPMI SSU1-3) of

the isopropylmalate isomerase, as well as three aconitase (ACO1-3) genes were found in the *Arabidopsis thaliana* genome. A metabolite profiling of corresponding T-DNA insertion lines indicate that IPMI LSU, IPMI SSU2 and IPMI SSU3 are most likely involved in both glucosinolate and leucine biosynthesis. Since the knock out of IPMI SSU1 is embryolethal, this gene seems to have a essential role in leucine biosynthesis. The other members of the aconitase family, ACO1, -2 and -3, seem to be active in other pathways.

7. Literaturverzeichnis

- Anderson, G.H., Veit, B., and Hanson, M.R.** (2005) The Arabidopsis AtRaptor genes are essential for post-embryonic plant growth. *BMC Biol.* 3:12
- Aseeva, E., Ossenbühl, F., Eichacker, L.A., Wanner, G., Soll, J., and Vothknecht, U.C.** (2004). Complex formation of Vipp1 depends on its alpha-helical PspA-like domain. *J. Biol. Chem.* 279: 35535–35541
- Binder, S., Knill, T., and Schuster, J.** (2007) Branched-chain amino acid metabolism in plants. *Physiol. Plant.*, 129: 68-78
- Bradbury, A.J., Gruer, M.J., Rudd, K.E., and Guest, J.R.** (1996) The second aconitase (AcnB) of *Escherichia coli*. *Microbiology* 142: 389-400
- Brown, P.D., Tokuhisa, J.G., Reichelt, M., and Gershenzon, J.** (2003). Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of Arabidopsis thaliana. *Phytochemistry* 62: 471–481
- Curien, G., Ravanel, S., Robert, M. and Dumas, R.** (2005) Identification of six novel allosteric effectors of Arabidopsis thaliana aspartate kinase–homoserine dehydrogenase isoforms. Physiological context sets the specificity. *J. Biol. Chem.* 280: 41178–41183
- Cutler, N.S., Pan, X., Heitman, J., and Cardenas, M.E.** (2001) The TOR signal transduction cascade controls cellular differentiation in response to nutrients. *Mol. Biol. Cell* 12:4103-4113
- Däschner, K.** (2001) Die Isovaleryl-CoA Dehydrogenase (IVD): detaillierte Charakterisierung eines Enzyms des Leucinabbaus in den Mitochondrien höherer Pflanzen. Dissertation, Universität Ulm
- de Kraker, J.W., Luck, K., Textor, S., Tokuhisa, J.G., and Gershenzon, J.** (2007) Two Arabidopsis genes (IPMS1 and IPMS2) encode isopropylmalate synthase, the branchpoint step in the biosynthesis of leucine. *Plant Physiol.* 143: 970–986
- Dennis, P.B., Fumagalli, S., and Thomas, G.** (1999) Target of rapamycin (TOR): Balancing the opposing forces of protein synthesis and degradation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9: 49-54
- Deprost, D., Truong, H.N., Robaglia, C., and Meyer, C.** (2005) An Arabidopsis homolog of RAPTOR/KOG1 is essential for early embryo development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 326: 844-850
- Diebold, R., Schuster, J., Däschner, K., and Binder, S.** (2002) The Branched-Chain Amino Acid Transaminase Gene Family in Arabidopsis Encodes Plastid and Mitochondrial Proteins. *Plant Physiol.* 129: 540-550
- Fahey, J.W., Haristoy, X., Dolan, P.M., Kensler, T.W., and Scholtus, I.** (2002) Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:7610–15
- Falk, K.L., Vogel, C., Textor, S., Bartram, S., Hick, A., Pickett, J.A., and Gershenzon, J.** (2004). Glucosinolate biosynthesis: Demonstration and characterization of the condensing enzyme of the chain elongation cycle in *Eruca sativa*. *Phytochemistry* 65: 1073–1084
- Fouet, A., Jin, S.-F., Raffel, G., and Sonenshein, A.L.** (1990) Multiple regulatory sites in the *Bacillus subtilis* citB promoter region. *J. Bacteriol.* 172: 5408-5415
- Graser, G., Schneider, B., Oldham, N.J., and Gershenzon, J.** (2000) The methionine chain elongation pathway in the biosynthesis of glucosinolates in *Eruca sativa* (Brassicaceae). *Arch. Biochem. Biophys.* 378: 411–419
- Grubb, C.D., and Abel, S.** (2006). Glucosinolate metabolism and its control. *Trends Plant Sci.* 11: 89–100
- Hagelstein, P., Sieve, B., Klein, M., Jans, H., and Schultz, G.** (1997) Leucin synthesis in chloroplasts: Leucine/isoleucine aminotransferase and valine aminotransferase are different enzymes in spinach chloroplasts. *J. Plant Physiol.* 150: 23-30

- Heazlewood, J.L., Tonti-Filippini, J.S., Gout, A.M., Day, D.A., Whelan, J., and Millar, A.H.** (2004) Experimental analysis of the Arabidopsis mitochondrial proteome highlights signaling and regulatory components, provides assessment of targeting prediction programs, and indicates plant-specific mitochondrial proteins. *Plant Cell* 16: 241-256
- Hesse, H., Kreft, O., Maimann, S., Zeh, M., and Hoefgen R.** (2004) Current understanding of the regulation of methionine biosynthesis in plants. *J. Exp. Bot.* 55(404): 1799-1808
- Jones, N.J., and Gilligan, J.P.** (1983) *o*-Phthaldialdehyde Precolumn Derivatization And Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography of Polypeptide Hydrolysates and Physiological Fluids. *J. Chromatogr.* 266: 471-482
- Keck, A.S., and Finley, J.W.** (2004) Cruciferous vegetables: cancer protective mechanisms of glucosinolate hydrolysis products and selenium. *Integrative Cancer Therapies* 3(1): 5-12
- Keum, Y.S., Jeong, W.S., and Kong, A.N.T.** (2004). Chemoprevention by isothiocyanates and their underlying molecular signaling mechanisms. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 555:191–202
- Kim, J.S., and Raines, R.T.** (1993) Ribonuclease S-peptide as a carrier in fusion proteins. *Prot. Sci.* 2: 348-356
- Klein, M., Binder, S., and Brennicke, A.** (1998). Purification of mitochondria from Arabidopsis. *Methods Mol. Biol.* 82: 49–53
- Knill, T.** (2005) Enzymaktivitäten der Branched-Chain Aminotransferasen 3 und 4 (AtBCAT-3 und AtBCAT-4) in *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit, Universität Ulm
- Knill, T., Schuster, J., Reichelt, M., Gershenzon, J., and Binder, S.** (2008) Arabidopsis Branched-Chain Aminotransferase 3 Functions in Both Amino Acid and Glucosinolate Biosynthesis. *Plant Physiol.* 146: 1028-1039
- Koroleva O. A., Davies A., et al.** (2000) Identification of a new glucosinolate-rich cell type in *Arabidopsis* flower stalk. *Plant Physiol.* 124(2): 599-608
- Kroymann, J., Textor, S., Tokuhisa, J.G., Falk, L.K., Bartram, S., Gershenzon, J., and Mitchell-Olds T.** (2001) A gene controlling variation in *Arabidopsis* glucosinolate composition is part of the methionine chain elongation pathway. *Plant Physiol.* 127(3): 1077-1088
- Kruft, V., Eubel, H., Jansch, L., Werhahn, W., and Braun, H.P.** (2001) Proteomic approach to identify novel mitochondrial proteins in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 127: 1694-1710
- Lee, Y.T., and Duggleby, R.G.** (2002) Regulatory interactions in Arabidopsis thaliana acetohydroxyacid synthase. *FEBS Lett.* 512: 180-184
- Lund, E.** (2003) Non-nutritive bioactive constituents of plants: dietary sources and health benefits of glucosinolates. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 73: 135–43
- Lynch, C.J., Halle, B., Fujii, H., Vary, T.C., Wallin, R., Damuni, Z., and Hutson, S.M.** (2003) Potential role of leucine metabolism in the leucine-signaling pathway involving mTOR. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285: E854–E863
- Mahfouz, M.M., Kim, S., Delauney, A.J., and Verma, D.P.S.** (2006) Arabidopsis TARGET OF RAPAMYCIN interacts with RAPTOR, which regulates the activity of S6 kinase in response to osmotic signals. *Plant Cell* 18: 477-490
- Menand, B., Desnos, T., Nussaume, L., Berger, F., Bouchez, D., Meyer, C., and Robaglia, C.** (2002) Expression and disruption of the Arabidopsis TOR (target of rapamycin) gene. *PNAS* 99 (9):6422-6427
- Mehta, P.K., and Christen, P.** (2000) The molecular evolution of pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 74: 129-184

- Mikkelsen, M.D., Petersen, B.L., Olsen, C.E., and Halkier, B.A. (2002).** Biosynthesis and metabolic engineering of glucosinolates. *Amino Acids* 22: 279–295
- Millar, A.H., Sweetlove, L.J., Giege, P., Leaver, C.J. (2001)** Analysis of the *Arabidopsis* mitochondrial proteome. *Plant Physiol.* 127: 1711-1727
- Mizoguchi, T., Hayashida, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Kamada, H., and Shinozaki, K. (1995).** Two genes that encode ribosomal protein S6 kinase homologs are induced by cold or salinity stress in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 358: 199–204
- Moeder, W., del Pozo, O., Navarre, D.A., Martin, G.B., and Klessig, D.F. (2007)** Aconitase plays a role in regulating resistance to oxidative stress and cell death in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Mol. Biol.* 63: 273-287
- Prodromou, C., Artymiuk, P.J., and Guest, J.R. (1992)** The aconitase of *Escherichia coli*. Nucleotide sequence of the aconitase gene and amino acid sequence similarity with mitochondrial aconitases, the iron-responsive-element-binding protein and isopropylmalate isomerases. *Eur. J. Biochem.* 204: 599-609
- Ravanel S., Gakiere B., Job D., and Douce R. (1998)** The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7805-7812
- Roth, M. (1971).** Fluorescence reaction for amino acids. *Anal. Chem.* 43: 880–882
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989).** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press)
- Sarwar, G., and Botting, H.G. (1993).** Evaluation of liquid chromatographic analysis of nutritionally important amino acids in food and physiological samples. *J. Chromatogr.* 615: 1–22
- Schadewaldt, P., and Adelmeyer, F. (1996)** Coupled enzyme assay for estimation of branched chain L-amino acid aminotransferase activity with 2-oxo acid substrates. *Anal. Biochem.* 238: 65-71
- Schnarrenberger, C., and Martin, W. (2002)** Evolution of the enzymes of the citric acid cycle and the glyoxylate cycle of higher plants. *Eur. J. Biochem.* 269: 868-883
- Schuster, J., and Binder, S. (2005)** The mitochondrial branched-chain aminotransferase (AtBCAT-1) is capable to initiate degradation of leucine, isoleucine and valine and in almost all tissues in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 57: 241-254
- Schuster, J., Knill, T., Reichelt, M., Gershenzon, J., and Binder, S. (2006)** BRANCHED-CHAIN AMINOTRANSFERASE4 is part of the chain elongation pathway in the biosynthesis of methionine-derived glucosinolates in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 2664-2679
- Smith, T. K., Mithen, R., and Johnson, I.T. (2003)** Effects of Brassica vegetable juice on the induction of apoptosis and aberrant crypt foci in rat colonic mucosal crypts in vivo. *Carcinogenesis* 24(3): 491-495
- Singh, B.K. (1999)** Biosynthesis of Valine, Leucine, and Isoleucine. In *Plant Amino Acids: biochemistry and biotechnology* (Singh B.K. ed.) pp. 227-47, Marcel Dekker, New York
- Singh, B.K., and Shaner, D.L. (1995)** Biosynthesis of Branched Chain Amino Acids: From Test Tube to Field. *Plant Cell* 7: 935-944
- Textor, S., Bartram, S., Kroymann, J., Falk, K.L., Hick, A., Pickett, J.A., and Gershenzon J. (2004)** Biosynthesis of methionine-derived glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*: recombinant expression and characterization of methylthioalkylmalate synthase, the condensing enzyme of the chain-elongation cycle. *Planta* 218(6): 1026-1035
- Textor, S., de Kraker, J.-W., Hause, B., Gershenzon, J., and Tokuhisa, J.G. (2007)** MAM3 Catalyzes the Formation of All Aliphatic Glucosinolate Chain Lengths in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 144: 60-71

Turck, F., Kozma, S.C., Thomas, G., and Nagy, F. (1998). A heatsensitive *Arabidopsis thaliana* kinase substitutes for human p70s6k function in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 18: 2038–2044

Wallsgrave, R.M., Lea, P.J. and Miflin, B.J. (1983) Intracellular localisation of aspartate kinase and the enzymes of threonine and methionine biosynthesis in green leaves. *Plant Physiol.* 71: 780-784

Wittenbach, V.A., and Abell, L.M. (1999) Inhibitors of Valine, Leucine, and Isoleucine Biosynthesis. In *Plant Amino Acids: biochemistry and biotechnology* (Singh B.K. ed.) pp. 385-416, Marcel Dekker, New York

Wittstock, U. and Halkier, B.A. (2002). Glucosinolate research in the *Arabidopsis* era. *Trends Plant Sci.* 7(6): 263-270

Zhang, S.H., Broome, M.A., Lawton, M.A., Hunter, T., and Lamb, C.J. (1994). atpk1, a novel ribosomal protein kinase gene from *Arabidopsis*. II. Functional and biochemical analysis of the encoded protein. *J. Biol. Chem.* 269: 17593–17599

8. Anhang

8.1 Metabolitdaten

Abkürzungen:

Total, Glucosinolate gesamt

Total Met GS, von Methionin abgeleitete Glucosinolate gesamt.

Methionin-abgeleitete Glucosinolate:

3OHP, 3-Hydroxypropylglucosinolat
3MTP, 3-Methylthiopropylglucosinolat
3BZO, 3-Benzoylpropylglucosinolat
3MSOP, 3-Methylsulfinylpropylglucosinolat
4OHB, 4-Hydroxybutylglucosinolat
4MTB, 4-Methylthiobutylglucosinolat
4BZO, 4-Benzoylbutylglucosinolat
4MSOB, 4-Methylsulfinylbutylglucosinolat
5MTP, 5-Methylthiopentylglucosinolat
5BZO, 5-Benzoylpentylglucosinolat
5MSOP, 5-Methylsulfinylpentylglucosinolat;
6MSOH, 6-Methylsulfinylhexylglucosinolat;
7MTH, 7-Methylthioheptylglucosinolat
7MSOH, 7-Methylsulfinylheptylglucosinolat
8MTO, 8-Methylthiooctylglucosinolat
8MSOO, 8-Methylsulfinyloctylglucosinolat

Leucin-abgeleitete Glucosinolate

4MP, 4-Methylpentylglucosinolat
5MH, 5-Methylhexylglucosinolat

indolische Glucosinolate

I3M, Indol-3-ylmethylglucosinolat
1MOI3M, 1-Methoxyindol-3-ylmethylglucosinolat
4MOI3M, 4-Methoxyindol-3-ylmethylglucosinolat
4OHI3M, 4-Hydroxyindol-3-ylglucosinolat

8.1.1 Aminosäureprofil in den Samen der *bcat3-1* Mutante

Aminosäure	Aminosäuregehalt in Samen [nmol/mg Samen]		
	<i>bcat3-1</i>	<i>Arabidopsis</i> Col-0	t-Test
Total	14,99 ± 0,86	14,85 ± 1,21	0,78000
Ala	0,81 ± 0,06	0,77 ± 0,08	0,36775
Arg	0,86 ± 0,08	0,81 ± 0,08	0,17601
Asn	1,81 ± 0,12	1,83 ± 0,20	0,81764
Asp	1,87 ± 0,11	1,74 ± 0,12	0,03717
Gln	0,27 ± 0,07	0,27 ± 0,11	0,97389
Glu	3,62 ± 0,26	3,51 ± 0,27	0,37059
Gly	0,52 ± 0,08	0,55 ± 0,09	0,37464
His	0,19 ± 0,02	0,18 ± 0,03	0,38824
Ile	0,39 ± 0,03	0,39 ± 0,04	0,81712
Leu	0,78 ± 0,06	0,77 ± 0,06	0,76305
Lys	0,57 ± 0,04	0,61 ± 0,06	0,12222
Met	0,17 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,13106
Phe	0,63 ± 0,04	0,62 ± 0,05	0,63839
Ser	0,83 ± 0,06	0,84 ± 0,08	0,82169
SMM	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00000
Thr	0,45 ± 0,03	0,46 ± 0,05	0,64716
Trp	0,50 ± 0,07	0,58 ± 0,08	0,03914
Tyr	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,67174
Val	0,61 ± 0,05	0,61 ± 0,06	0,98879

Tabelle 8.1 Aminosäuregehalt im Wildtyp (Col-0) aus der GABI Kat-Kollektion und der AtBCAT3-Mutante (*bcat3-1*). Der Aminosäuregehalt ist signifikant unterschiedlich zwischen Wildtyp und Mutante, wenn im t-Test $P < 0,01$. Abkürzungen: Total, Aminosäuregehalt gesamt.

8.1.2 Aminosäure- und Glucosinolat-Spektren der *aco1-1* Mutante

Aminosäure	Aminosäuregehalt in Rosettenblättern [nmol/mg Blattmaterial]		
	<i>aco1-1</i>	<i>Arabidopsis</i> Col-0	t-Test
Total	122,50 ± 7,11	124,46 ± 4,30	0,57626
Ala	8,24 ± 0,59	8,84 ± 0,48	0,08330
Arg	0,60 ± 0,00	0,60 ± 0,00	
Asn	4,70 ± 0,32	4,76 ± 0,35	0,76310
Asp	20,48 ± 1,16	19,04 ± 1,12	0,05399
Gln	38,66 ± 2,69	41,88 ± 1,90	0,03753
Glu	34,24 ± 2,83	32,96 ± 1,45	0,34658
Gly	1,24 ± 0,10	1,52 ± 0,24	0,02292
His	0,08 ± 0,06	0,04 ± 0,06	0,28969
Ile	0,36 ± 0,00	0,36 ± 0,00	
Leu	0,60 ± 0,00	0,60 ± 0,00	
Lys	0,34 ± 0,05	1,02 ± 1,62	0,32735
Met	0,24 ± 0,00	0,22 ± 0,05	0,34089
Phe	0,34 ± 0,05	0,36 ± 0,00	0,34089
Ser	7,32 ± 0,31	7,26 ± 0,20	0,69945
SMM	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	
Thr	4,06 ± 0,14	3,94 ± 0,12	0,13989
Trp	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	
Tyr	0,12 ± 0,00	0,12 ± 0,00	
Val	0,88 ± 0,06	0,94 ± 0,05	0,09244

Tabelle 8.2 Aminosäuregehalt im Wildtyp (Col-0) aus der SALK-Kollektion und der *aco1-1* Mutante. Der Aminosäuregehalt ist signifikant unterschiedlich zwischen Wildtyp und Mutante, wenn im t-Test $P < 0,01$. Abkürzungen: Total, Aminosäuregehalt gesamt.

Aminosäure	Aminosäuregehalt in Samen [nmol/mg Samen]		
	<i>aco1-1</i>	<i>Arabidopsis Col-0</i>	t-Test
Total	12,48 ± 1,12	11,65 ± 0,86	0,44115
Ala	0,41 ± 0,10	0,29 ± 0,03	0,02213
Arg	0,31 ± 0,28	0,07 ± 0,01	0,12442
Asn	2,18 ± 0,21	1,91 ± 0,10	0,03608
Asp	1,42 ± 0,06	1,53 ± 0,12	0,03777
Gln	0,60 ± 0,38	0,69 ± 0,26	0,42975
Glu	4,89 ± 0,28	4,30 ± 0,26	0,00994
Gly	0,47 ± 0,21	0,55 ± 0,09	0,21844
His	0,07 ± 0,00	0,72 ± 0,29	0,00060
Ile	0,16 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0,10269
Leu	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,31590
Met	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,00103
Phe	0,30 ± 0,02	0,26 ± 0,02	0,01370
Ser	0,47 ± 0,13	0,26 ± 0,14	0,01190
Thr	0,30 ± 0,02	0,27 ± 0,04	0,49961
Trp	0,19 ± 0,03	0,17 ± 0,03	0,34830
Tyr	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,05965
Val	0,29 ± 0,02	0,26 ± 0,02	0,16924

Tabelle 8.3 Aminosäuregehalt im Wildtyp (Col-0) aus der SALK-Kollektion und der *aco1-1* Mutante. Der Aminosäuregehalt ist signifikant unterschiedlich zwischen Wildtyp und Mutante, wenn im t-Test $P < 0,01$. Abkürzungen: Total, Aminosäuregehalt gesamt.

Glucosinolat Typ	Glucosinolatgehalt in Rosettenblättern [$\mu\text{mol/g}$ Blattmaterial]		
	<i>aco1-1</i>	<i>Arabidopsis Col-0</i>	t-Test
Total Met GS	22,99 ± 2,39	24,36 ± 0,93	0,22185
Total	26,26 ± 2,40	27,40 ± 1,12	0,31705
3MSOP	1,82 ± 0,20	1,99 ± 0,08	0,07525
4MTB	0,76 ± 0,24	0,75 ± 0,19	0,88769
4MSOB	16,43 ± 2,10	17,57 ± 0,68	0,23537
5MSOP	0,86 ± 0,10	0,89 ± 0,11	0,61908
4OHI3M	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,33983
7MSOH	0,44 ± 0,03	0,47 ± 0,03	0,23883
8MSOO	2,68 ± 0,14	2,70 ± 0,17	0,84282
I3M	2,10 ± 0,23	2,02 ± 0,08	0,43132
1MOI3M	0,75 ± 0,12	0,65 ± 0,17	0,29098
4MOI3M	0,36 ± 0,05	0,32 ± 0,03	0,09595

Tab. 8.4 Glucosinolatgehalt im Wildtyp (Col-0) aus der SALK-Kollektion und der *aco1-1* Mutante. Der Glucosinolatgehalt ist zwischen Wildtyp und Mutante signifikant unterschiedlich, wenn im t-Test $P < 0,01$.

Glucosinolat Typ	Glucosinolatgehalt in Samen [$\mu\text{mol/g Samen}$]		
	<i>aco1-1</i>	<i>Arabidopsis Col-0</i>	t-Test
Total Met GS	78,35 \pm 6,24	68,99 \pm 8,21	0,01000
Total	91,12 \pm 6,38	81,71 \pm 9,11	0,01542
3OHP	1,08 \pm 0,21	0,94 \pm 0,31	0,24851
3BZO	5,84 \pm 0,45	5,16 \pm 0,68	0,01648
4OHB	4,14 \pm 0,71	4,06 \pm 1,10	0,86219
4MTB	31,79 \pm 3,69	24,81 \pm 4,06	0,00080
4BZO	16,67 \pm 1,63	17,70 \pm 2,32	0,26232
4MSOB	1,90 \pm 0,54	1,40 \pm 0,26	0,01585
5MTP	2,63 \pm 0,63	2,08 \pm 0,26	0,01923
5MSOP	0,20 \pm 0,07	0,13 \pm 0,03	0,00842
7MTH	2,74 \pm 0,26	2,46 \pm 0,52	0,15103
7MSOH	0,87 \pm 0,36	0,61 \pm 0,30	0,09489
8MTO	4,43 \pm 0,58	4,24 \pm 0,95	0,59181
8MSOO	6,07 \pm 0,56	5,42 \pm 0,94	0,07243
I3M	12,60 \pm 3,02	12,47 \pm 2,35	0,91463
4OHI3M	0,16 \pm 0,04	0,24 \pm 0,05	0,00161

Tab. 8.5 Glucosinolatgehalt im Wildtyp (Col-0) aus der SALK-Kollektion und der *aco1-1* Mutante. Der Glucosinolatgehalt ist zwischen Wildtyp und Mutante signifikant unterschiedlich, wenn im t-Test $P < 0,01$.

8.1.3 Aminosäure- und Glucosinolat-Spektren der *aco2-1* Mutante

Aminosäure	Aminosäuregehalt in Rosettenblättern [nmol/mg Blattmaterial]		
	<i>aco2-1</i>	<i>Arabidopsis Col-0</i>	t-Test
Total	182,87 \pm 14,47	174,73 \pm 14,80	0,24324
Ala	8,07 \pm 0,98	8,93 \pm 0,74	0,04371
Arg	0,79 \pm 0,06	0,85 \pm 0,07	0,04546
Asn	4,67 \pm 0,53	5,35 \pm 0,54	0,01277
Asp	18,03 \pm 1,78	16,51 \pm 1,42	0,05486
Gln	96,96 \pm 9,56	91,97 \pm 8,88	0,25422
Glu	34,99 \pm 3,19	31,30 \pm 2,68	0,01398
Gly	1,15 \pm 0,50	1,42 \pm 0,58	0,29255
His	0,25 \pm 0,04	0,29 \pm 0,06	0,17099
Ile	0,44 \pm 0,06	0,44 \pm 0,06	0,88430
Leu	0,65 \pm 0,06	0,64 \pm 0,08	0,61284
Lys	0,31 \pm 0,06	0,40 \pm 0,08	0,01660
Met	1,55 \pm 0,04	1,39 \pm 0,06	0,00001
Phe	0,35 \pm 0,04	0,36 \pm 0,00	0,30506
Ser	9,41 \pm 0,72	9,08 \pm 0,69	0,32096
SMM	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	
Thr	4,03 \pm 0,39	4,48 \pm 0,36	0,01788
Trp	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	
Tyr	0,27 \pm 0,05	0,25 \pm 0,04	0,49345
Val	0,97 \pm 0,07	1,08 \pm 0,06	0,00217

Tab. 8.6 Aminosäuregehalt im Wildtyp (Col-0) aus der SALK-Kollektion und der *aco2-1* Mutante. Der Glucosinolatgehalt ist zwischen Wildtyp und Mutante signifikant unterschiedlich, wenn im t-Test $P < 0,01$.

Aminosäure	Aminosäuregehalt in Samen [nmol/mg Samen]		
	<i>aco2-1</i>	<i>Arabidopsis Col-0</i>	t-Test
Total	5,73 ± 0,74	4,68 ± 0,38	0,00253
Ala	0,55 ± 0,04	0,14 ± 0,07	0,50758
Arg	1,42 ± 0,16	0,14 ± 0,02	0,77721
Asn	1,85 ± 0,25	1,46 ± 0,13	0,00145
Asp	0,04 ± 0,01	0,53 ± 0,06	0,00015
Gln	0,22 ± 0,07	0,14 ± 0,04	0,00095
Glu	0,33 ± 0,14	1,40 ± 0,13	0,00263
Gly	0,18 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,00323
His	0,14 ± 0,05	0,02 ± 0,00	0,01720
Ile	0,07 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,01972
Leu	0,11 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,32341
Met	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,00428
Phe	0,02 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,00006
Ser	0,12 ± 0,03	0,13 ± 0,01	0,00181
Thr	0,46 ± 0,07	0,06 ± 0,01	0,00076
Trp	0,10 ± 0,02	0,33 ± 0,06	0,00169
Tyr	0,06 ± 0,02	0,02 ± 0,00	0,00532
Val	0,03 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,01803

Tab. 8.7 Aminosäuregehalt im Wildtyp (Col-0) aus der SALK-Kollektion und der *aco2-1* Mutante. Der Glucosinolatgehalt ist zwischen Wildtyp und Mutante signifikant unterschiedlich, wenn im t-Test $P < 0,01$.

Glucosinolat Typ	Glucosinolatgehalt in Rosettenblättern [$\mu\text{mol/g}$ Blattmaterial]		
	<i>aco2-1</i>	<i>Arabidopsis Col-0</i>	t-Test
Total Met GS	2,86 ± 0,37	2,86 ± 0,31	0,99596
Total	16,58 ± 2,11	16,34 ± 1,80	0,78899
3MSOP	1,38 ± 0,16	1,35 ± 0,12	0,58611
4MTB	0,17 ± 0,02	0,16 ± 0,04	0,70114
4MSOB	11,25 ± 1,34	11,09 ± 1,25	0,78864
7MSOH	0,27 ± 0,07	0,29 ± 0,04	0,40848
8MSOO	1,25 ± 0,33	1,43 ± 0,24	0,17321
I3M	1,62 ± 0,23	1,52 ± 0,20	0,31307
1MOI3M	0,44 ± 0,13	0,27 ± 0,08	0,00274
4MOI3M	0,20 ± 0,02	0,23 ± 0,03	0,05055

Tab. 8.8 Glucosinolatgehalt im Wildtyp (Col-0) aus der SALK-Kollektion und der *aco2-1* Mutante. Der Glucosinolatgehalt ist zwischen Wildtyp und Mutante signifikant unterschiedlich, wenn im t-Test $P < 0,01$.

Glucosinolat Typ	Glucosinolatgehalt in Samen [$\mu\text{mol/g}$ Samen]		
	<i>aco2-1</i>	<i>Arabidopsis</i> Col-0	t-Test
Total Met GS	37,81 \pm 3,97	33,01 \pm 3,98	0,03629
Total	39,94 \pm 3,89	34,74 \pm 4,27	0,02817
3OHP	0,45 \pm 0,07	0,41 \pm 0,10	0,33803
3BZO	2,93 \pm 0,26	2,56 \pm 0,33	0,02897
4OHB	3,47 \pm 0,65	3,16 \pm 0,43	0,30243
4MTB	7,36 \pm 1,27	6,46 \pm 1,47	0,22310
4BZO	14,92 \pm 1,52	12,60 \pm 0,97	0,00429
4MSOB	0,59 \pm 0,19	0,61 \pm 0,12	0,81683
5MTP	0,90 \pm 0,07	0,81 \pm 0,12	0,09019
5BZO	0,08 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01	0,01719
7MTH	1,61 \pm 0,36	1,40 \pm 0,32	0,26432
7MSOH	0,36 \pm 0,06	0,34 \pm 0,07	0,58097
8MTO	2,12 \pm 0,45	1,75 \pm 0,32	0,08908
8MSOO	3,02 \pm 0,60	2,85 \pm 0,48	0,54608
I3M	2,01 \pm 0,37	1,64 \pm 0,35	0,06864
4OHI3M	0,11 \pm 0,02	0,09 \pm 0,01	0,03530

Tab. 8.9 Glucosinolatgehalt im Wildtyp (Col-0) aus der SALK-Kollektion und der *aco2-1* Mutante. Der Glucosinolatgehalt ist zwischen Wildtyp und Mutante signifikant unterschiedlich, wenn im t-Test $P < 0,01$.

8.1.4 Aminosäure- und Glucosinolat-Spektren der *aco3-1* Mutante

Aminosäure	Aminosäuregehalt in Rosettenblättern [nmol/mg Blattmaterial]		
	<i>aco3-1</i>	<i>Arabidopsis</i> Col-0	t-Test
Total	111,80 \pm 10,63	136,97 \pm 9,17	0,00017
Ala	8,40 \pm 0,78	10,91 \pm 0,71	0,00001
Arg	0,93 \pm 0,11	0,87 \pm 0,08	0,23278
Asn	3,24 \pm 1,18	4,79 \pm 0,44	0,00375
Asp	13,80 \pm 1,85	18,48 \pm 1,52	0,00007
Gln	38,88 \pm 4,67	47,64 \pm 4,62	0,00207
Glu	30,24 \pm 4,41	35,88 \pm 3,16	0,01079
Gly	0,60 \pm 0,18	1,11 \pm 0,21	0,00014
His	0,15 \pm 0,06	0,24 \pm 0,00	0,00043
Ile	0,51 \pm 0,08	0,47 \pm 0,04	0,20107
Leu	0,56 \pm 0,18	0,39 \pm 0,06	0,02706
Lys	0,48 \pm 0,14	0,41 \pm 0,09	0,22981
Met	0,12 \pm 0,00	0,12 \pm 0,00	
Phe	0,41 \pm 0,06	0,41 \pm 0,06	
Ser	8,78 \pm 0,46	9,36 \pm 0,54	0,03520
SMM	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	
Thr	3,47 \pm 0,20	4,62 \pm 0,24	0,00000
Trp	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	
Tyr	0,17 \pm 0,06	0,23 \pm 0,04	0,04057
Val	1,08 \pm 0,14	1,07 \pm 0,04	0,78083

Tab. 8.10 Aminosäuregehalt im Wildtyp (Col-0) aus der SALK-Kollektion und der *aco3-1* Mutante. Der Glucosinolatgehalt ist zwischen Wildtyp und Mutante signifikant unterschiedlich, wenn im t-Test $P < 0,01$.

Aminosäure	Aminosäuregehalt in Samen [nmol/mg Samen]		
	<i>aco3-1</i>	<i>Arabidopsis Col-0</i>	t-Test
total	11,92 ± 1,38	12,58 ± 1,21	0,78557
Ala	0,44 ± 0,08	0,42 ± 0,14	0,78557
Arg	0,61 ± 0,07	0,65 ± 0,07	0,32268
Asn	2,42 ± 0,38	3,04 ± 0,34	0,00163
Asp	1,42 ± 0,19	1,49 ± 0,15	0,42277
Gln	0,15 ± 0,03	0,18 ± 0,05	0,22775
Glu	4,59 ± 0,43	4,58 ± 0,51	0,96755
Gly	0,24 ± 0,04	0,26 ± 0,04	0,31832
His	0,07 ± 0,02	0,04 ± 0,01	0,00008
Ile	0,16 ± 0,03	0,16 ± 0,03	0,86482
Leu	0,11 ± 0,04	0,10 ± 0,02	0,34456
Met	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,05723
Phe	0,32 ± 0,08	0,31 ± 0,04	0,75228
Ser	0,57 ± 0,08	0,59 ± 0,07	0,43294
Thr	0,26 ± 0,04	0,27 ± 0,04	0,45345
Trp	0,18 ± 0,04	0,14 ± 0,03	0,01566
Tyr	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,02	0,25175
Val	0,32 ± 0,08	0,31 ± 0,05	0,75991

Tab. 8.11 Aminosäuregehalt im Wildtyp (Col-0) aus der SALK-Kollektion und der *aco3-1* Mutante. Der Glucosinolatgehalt ist zwischen Wildtyp und Mutante signifikant unterschiedlich, wenn im t-Test $P < 0,01$.

Glucosinolat Typ	Glucosinolatgehalt in Rosettenblättern [$\mu\text{mol/g}$ Blattmaterial]		
	<i>aco3-1</i>	<i>Arabidopsis Col-0</i>	t-Test
Total Met GS	19,35 ± 1,20	19,99 ± 3,48	0,63011
Total	24,13 ± 4,10	23,60 ± 1,38	0,73302
3MSOP	2,07 ± 0,31	1,77 ± 0,17	0,03321
4MTB	0,27 ± 0,11	0,49 ± 0,12	0,00198
4MSOB	16,21 ± 2,79	15,15 ± 1,01	0,32972
7MSOH	0,27 ± 0,05	0,31 ± 0,01	0,04469
8MSOO	1,17 ± 0,27	1,63 ± 0,11	0,00069
I3M	3,23 ± 0,44	3,26 ± 0,18	0,87042
1MOI3M	0,61 ± 0,22	0,55 ± 0,11	0,46744
4MOI3M	0,30 ± 0,04	0,44 ± 0,03	0,00000

Tab. 8.12 Glucosinolatgehalt im Wildtyp (Col-0) aus der SALK-Kollektion und der *aco3-1* Mutante. Der Glucosinolatgehalt ist zwischen Wildtyp und Mutante signifikant unterschiedlich, wenn im t-Test $P < 0,01$.

Glucosinolat Typ	Glucosinolatgehalt in Samen [$\mu\text{mol/g}$ Samen]		
	<i>aco3-1</i>	<i>Arabidopsis</i> Col-0	t-Test
Total Met GS	76,81 \pm 18,31	74,79 \pm 6,97	0,74912
Total	89,77 \pm 19,09	88,70 \pm 7,81	0,87234
3OHP	0,96 \pm 0,23	1,02 \pm 0,13	0,43591
3BZO	4,84 \pm 0,91	5,19 \pm 0,47	0,31159
4OHB	4,81 \pm 1,23	5,24 \pm 0,63	0,34275
4MTB	27,63 \pm 8,42	23,96 \pm 3,13	0,21602
4BZO	17,10 \pm 0,55	19,37 \pm 1,59	0,00080
4MSOB	1,45 \pm 0,44	1,15 \pm 0,13	0,05200
5MTP	3,13 \pm 1,06	2,47 \pm 0,56	0,10133
5MSOP	0,17 \pm 0,04	0,15 \pm 0,03	0,23124
7MTH	3,39 \pm 1,52	2,97 \pm 0,56	0,42051
7MSOH	0,78 \pm 0,41	0,64 \pm 0,13	0,31758
8MTO	5,56 \pm 1,69	5,61 \pm 0,75	0,93856
8MSOO	6,98 \pm 2,61	7,03 \pm 0,97	0,95912
I3M	12,78 \pm 1,55	13,73 \pm 1,36	0,17521
4OHI3M	0,17 \pm 0,02	0,18 \pm 0,03	0,49248

Tab. 8.13 Glucosinolatgehalt im Wildtyp (Col-0) aus der SALK-Kollektion und der *aco3-1* Mutante. Der Glucosinolatgehalt ist zwischen Wildtyp und Mutante signifikant unterschiedlich, wenn im t-Test $P < 0,01$.

8.1.5 Aminosäure- und Glucosinolat-Spektren der *aco3-2* Mutante

Aminosäure	Aminosäuregehalt in Rosettenblättern [nmol/mg Blattmaterial]		
	<i>aco3-2</i>	<i>Arabidopsis</i> Col-0	t-Test
Total	145,76 \pm 9,69	158,52 \pm 10,51	0,05362
Ala	5,46 \pm 0,34	5,28 \pm 0,33	0,37267
Arg	1,26 \pm 0,20	1,08 \pm 0,00	0,04933
Asn	6,92 \pm 0,26	7,34 \pm 0,44	0,07112
Asp	20,96 \pm 1,65	23,52 \pm 1,46	0,01736
Gln	57,44 \pm 5,93	63,36 \pm 5,66	0,10744
Glu	33,12 \pm 2,70	36,64 \pm 2,38	0,03765
Gly	3,58 \pm 0,65	3,56 \pm 0,21	0,94427
His	0,12 \pm 0,00	0,12 \pm 0,00	
Ile	0,34 \pm 0,05	0,32 \pm 0,06	0,54901
Leu	0,26 \pm 0,05	0,30 \pm 0,07	0,25957
Lys	0,50 \pm 0,05	0,52 \pm 0,06	0,54901
Met	0,16 \pm 0,06	0,12 \pm 0,00	0,14493
Phe	0,36 \pm 0,00	0,38 \pm 0,05	0,34089
Ser	9,66 \pm 0,25	9,96 \pm 0,46	0,18713
SMM	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	
Thr	4,54 \pm 0,14	4,92 \pm 0,21	0,00461
Trp	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	
Tyr	0,24 \pm 0,00	0,24 \pm 0,00	
Val	0,84 \pm 0,00	0,86 \pm 0,05	0,34089

Tab. 8.14 Aminosäuregehalt im Wildtyp (Col-0) aus der SALK-Kollektion und der *aco3-2* Mutante. Der Glucosinolatgehalt ist zwischen Wildtyp und Mutante signifikant unterschiedlich, wenn im t-Test $P < 0,01$.

Aminosäure	Aminosäuregehalt in Samen [nmol/mg Samen]		
	<i>aco3-2</i>	<i>Arabidopsis Col-0</i>	t-Test
Total	21,47 ± 1,95	17,70 ± 2,47	0,00641
Ala	2,27 ± 0,46	2,29 ± 0,32	0,90279
Arg	1,11 ± 0,09	0,85 ± 0,18	0,00411
Asn	2,89 ± 0,27	2,23 ± 0,46	0,00588
Asp	1,43 ± 0,24	0,80 ± 0,18	0,00005
Gln	1,06 ± 0,18	0,73 ± 0,21	0,00497
Glu	7,51 ± 0,64	6,46 ± 0,85	0,01915
Gly	0,71 ± 0,12	0,63 ± 0,10	0,19680
His	0,40 ± 0,09	0,28 ± 0,13	0,05274
Ile	0,31 ± 0,05	0,26 ± 0,03	0,03888
Leu	0,26 ± 0,04	0,23 ± 0,02	0,06057
Met	0,09 ± 0,03	0,07 ± 0,03	0,38157
Phe	0,58 ± 0,07	0,46 ± 0,07	0,00482
Ser	1,15 ± 0,16	0,88 ± 0,17	0,00850
Thr	0,59 ± 0,09	0,45 ± 0,07	0,00440
Trp	0,42 ± 0,12	0,48 ± 0,10	0,29228
Tyr	0,21 ± 0,03	0,18 ± 0,02	0,05236
Val	0,48 ± 0,07	0,41 ± 0,04	0,04448

Tab. 8.15 Aminosäuregehalt im Wildtyp (Col-0) aus der SALK-Kollektion und der *aco3-2* Mutante. Der Glucosinolatgehalt ist zwischen Wildtyp und Mutante signifikant unterschiedlich, wenn im t-Test $P < 0,01$.

Glucosinolat Typ	Glucosinolatgehalt in Rosettenblättern [$\mu\text{mol/g}$ Blattmaterial]		
	<i>aco3-2</i>	<i>Arabidopsis Col-0</i>	t-Test
Total Met GS	23,74 ± 1,10	23,88 ± 1,13	0,84293
Total	27,22 ± 1,12	27,58 ± 1,11	0,58719
3MSOP	2,04 ± 0,15	1,97 ± 0,11	0,41135
4MTB	0,40 ± 0,07	0,64 ± 0,09	0,00037
4MSOB	17,82 ± 1,04	17,58 ± 1,10	0,71283
5MSOP	0,87 ± 0,07	0,82 ± 0,03	0,18056
7MSOH	0,39 ± 0,01	0,38 ± 0,03	0,52816
8MSOO	2,23 ± 0,12	2,47 ± 0,15	0,00993
I3M	2,52 ± 0,21	2,50 ± 0,29	0,88361
1MOI3M	0,52 ± 0,14	0,69 ± 0,13	0,06360
4MOI3M	0,34 ± 0,01	0,43 ± 0,03	0,00008
4OHI3M	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,74278

Tab. 8.16 Glucosinolatgehalt im Wildtyp (Col-0) aus der SALK-Kollektion und der *aco3-2* Mutante. Der Glucosinolatgehalt ist zwischen Wildtyp und Mutante signifikant unterschiedlich, wenn im t-Test $P < 0,01$.

Glucosinolat Typ	Glucosinolatgehalt in Samen [$\mu\text{mol/g}$ Samen]		
	<i>aco3-2</i>	<i>Arabidopsis Col-0</i>	t-Test
Total Met GS	56,32 \pm 6,32	57,06 \pm 10,45	0,84932
Total	58,23 \pm 6,46	59,20 \pm 10,71	0,80837
3OHP	0,90 \pm 0,25	0,70 \pm 0,18	0,06792
3BZO	4,24 \pm 0,53	4,12 \pm 0,78	0,68313
4OHB	4,07 \pm 0,72	3,66 \pm 0,56	0,20343
4MTB	20,83 \pm 3,56	20,66 \pm 5,59	0,93323
4BZO	12,48 \pm 1,23	13,33 \pm 1,56	0,19991
4MSOB	1,54 \pm 0,51	1,30 \pm 0,20	0,21328
5MTP	2,14 \pm 0,26	2,14 \pm 0,41	0,96818
7MTH	1,88 \pm 0,31	2,38 \pm 1,03	0,14120
7MSOH	0,42 \pm 0,11	0,53 \pm 0,29	0,27781
8MTO	3,65 \pm 0,54	3,58 \pm 0,91	0,84225
8MSOO	4,17 \pm 0,80	4,66 \pm 1,70	0,40759
I3M	1,76 \pm 0,38	1,94 \pm 0,49	0,38923
4OHI3M	0,15 \pm 0,05	0,20 \pm 0,05	0,03281

Tab. 8.17 Glucosinolatgehalt im Wildtyp (Col-0) aus der SALK-Kollektion und der *aco3-2* Mutante. Der Glucosinolatgehalt ist zwischen Wildtyp und Mutante signifikant unterschiedlich, wenn im t-Test $P < 0,01$.

8.1.6 Aminosäure- und Glucosinolat-Spektren der *aco3-3* Mutante

Aminosäure	Aminosäuregehalt in Rosettenblättern [nmol/mg Blattmaterial]		
	<i>aco3-3</i>	<i>Arabidopsis Col-0</i>	t-Test
Total	121,02 \pm 46,38	125,18 \pm 9,96	0,83423
Ala	9,28 \pm 0,75	7,74 \pm 0,29	0,00083
Arg	0,60 \pm 0,00	0,62 \pm 0,05	0,34089
Asn	3,90 \pm 0,85	1,76 \pm 0,12	0,00012
Asp	22,66 \pm 1,61	18,24 \pm 2,27	0,00540
Gln	42,72 \pm 21,11	49,76 \pm 4,09	0,44120
Glu	35,33 \pm 1,85	32,48 \pm 3,95	0,17498
Gly	1,28 \pm 0,41	0,78 \pm 0,13	0,01772
His	0,26 \pm 0,05	0,24 \pm 0,00	0,34089
Ile	0,42 \pm 0,07	0,38 \pm 0,05	0,25957
Leu	0,54 \pm 0,07	0,48 \pm 0,08	0,17395
Lys	0,36 \pm 0,00	0,34 \pm 0,05	0,34089
Met	0,12 \pm 0,00	0,12 \pm 0,00	
Phe	0,36 \pm 0,00	0,36 \pm 0,00	
Ser	8,04 \pm 0,38	7,62 \pm 0,60	0,17622
SMM	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	
Thr	3,62 \pm 0,24	3,24 \pm 0,15	0,00902
Trp	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	
Tyr	0,18 \pm 0,07	0,12 \pm 0,00	0,04933
Val	1,02 \pm 0,07	0,90 \pm 0,07	0,01012

Tab. 8.18 Aminosäuregehalt im Wildtyp (Col-0) aus der SALK-Kollektion und der *aco3-3* Mutante. Der Glucosinolatgehalt ist zwischen Wildtyp und Mutante signifikant unterschiedlich, wenn im t-Test $P < 0,01$.

Aminosäure	Aminosäuregehalt in Samen [nmol/mg Samen]		
	<i>aco3-3</i>	<i>Arabidopsis Col-0</i>	t-Test
Total	12,50 ± 1,24	11,25 ± 0,95	0,04087
Ala	0,37 ± 0,05	0,33 ± 0,09	0,39911
Arg	0,67 ± 0,09	0,62 ± 0,09	0,24892
Asn	2,54 ± 0,32	2,09 ± 0,18	0,00363
Asp	1,55 ± 0,23	1,37 ± 0,13	0,06752
Gln	0,19 ± 0,04	0,21 ± 0,04	0,23053
Glu	4,61 ± 0,45	4,24 ± 0,41	0,11593
Gly	0,37 ± 0,07	0,32 ± 0,08	0,22509
His	0,07 ± 0,06	0,12 ± 0,02	0,03940
Ile	0,19 ± 0,02	0,17 ± 0,01	0,02394
Leu	0,13 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,40116
Met	0,01 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,06589
Phe	0,29 ± 0,03	0,27 ± 0,03	0,20152
Ser	0,67 ± 0,09	0,54 ± 0,04	0,00298
Thr	0,29 ± 0,03	0,28 ± 0,03	0,35213
Trp	0,16 ± 0,07	0,19 ± 0,06	0,36886
Tyr	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,58541
Val	0,34 ± 0,06	0,29 ± 0,03	0,09322

Tab. 8.19 Aminosäuregehalt im Wildtyp (Col-0) aus der SALK-Kollektion und der *aco3-3* Mutante. Der Glucosinolatgehalt ist zwischen Wildtyp und Mutante signifikant unterschiedlich, wenn im t-Test $P < 0,01$.

Glucosinolat Typ	Glucosinolatgehalt in Rosettenblättern [$\mu\text{mol/g}$ Blattmaterial]		
	<i>aco3-3</i>	<i>Arabidopsis Col-0</i>	t-Test
Total Met GS	22,93 ± 1,10	20,41 ± 1,20	0,00550
Total	26,98 ± 1,86	24,11 ± 1,38	0,01939
3MSOP	2,36 ± 0,15	2,07 ± 0,13	0,00948
4MTB	0,40 ± 0,06	0,24 ± 0,03	0,00048
4MSOB	17,95 ± 0,99	16,19 ± 0,95	0,01536
7MSOH	0,42 ± 0,02	0,36 ± 0,02	0,00061
8MSOO	1,80 ± 0,06	1,53 ± 0,10	0,00039
I3M	3,02 ± 0,48	2,75 ± 0,31	0,31710
1MOI3M	0,74 ± 0,34	0,71 ± 0,16	0,88168
4MOI3M	0,29 ± 0,02	0,24 ± 0,02	0,00451

Tab. 8.20 Glucosinolatgehalt im Wildtyp (Col-0) aus der SALK-Kollektion und der *aco3-3* Mutante. Der Glucosinolatgehalt ist zwischen Wildtyp und Mutante signifikant unterschiedlich, wenn im t-Test $P < 0,01$.

Glucosinolat Typ	Glucosinolatgehalt in Samen [$\mu\text{mol/g}$ Samen]		
	<i>aco3-3</i>	<i>Arabidopsis</i> Col-0	t-Test
Total Met GS	70,67 \pm 2,81	73,86 \pm 10,09	0,40497
Total	81,18 \pm 3,17	87,77 \pm 10,35	0,10927
3OHP	0,90 \pm 0,12	1,00 \pm 0,27	0,34498
3BZO	4,95 \pm 0,24	5,03 \pm 0,74	0,78368
4OHB	3,99 \pm 0,47	4,63 \pm 1,03	0,13870
4MTB	24,80 \pm 1,29	26,80 \pm 5,58	0,34135
4BZO	18,37 \pm 1,24	17,26 \pm 0,91	0,07306
4MSOB	1,33 \pm 0,19	1,23 \pm 0,36	0,49145
5MTP	2,14 \pm 0,22	2,32 \pm 0,39	0,28534
5MSOP	0,17 \pm 0,03	0,18 \pm 0,05	0,69356
7MTH	2,63 \pm 0,23	3,03 \pm 0,54	0,08041
7MSOH	0,63 \pm 0,14	0,71 \pm 0,23	0,45273
8MTO	4,51 \pm 0,71	5,00 \pm 0,65	0,18724
8MSOO	6,24 \pm 0,78	6,68 \pm 0,89	0,32943
I3M	10,12 \pm 1,18	13,70 \pm 1,52	0,00020
4OHI3M	0,38 \pm 0,11	0,21 \pm 0,03	0,00111

Tab. 8.21 Glucosinolatgehalt im Wildtyp (Col-0) aus der SALK-Kollektion und der *aco3-3* Mutante. Der Glucosinolatgehalt ist zwischen Wildtyp und Mutante signifikant unterschiedlich, wenn im t-Test $P < 0,01$.

8.1.7 Aminosäure- und Glucosinolat-Spektren der *aco3-4* Mutante

Aminosäure	Aminosäuregehalt in Rosettenblättern [nmol/mg Blattmaterial]		
	<i>aco3-4</i>	<i>Arabidopsis</i> Col-0	t-Test
Total	132,94 \pm 3,01	141,48 \pm 7,61	0,08726
Ala	9,77 \pm 0,92	8,99 \pm 0,66	0,11101
Arg	0,74 \pm 0,05	0,72 \pm 0,00	0,34659
Asn	4,66 \pm 0,20	4,50 \pm 0,20	0,16222
Asp	19,20 \pm 0,68	20,80 \pm 0,78	0,00627
Gln	48,38 \pm 1,61	53,44 \pm 3,92	0,03053
Glu	33,60 \pm 0,96	34,40 \pm 1,96	0,59271
Gly	1,56 \pm 0,08	1,95 \pm 0,10	0,00018
His	0,12 \pm 0,00	0,12 \pm 0,00	
Ile	0,41 \pm 0,07	0,36 \pm 0,00	0,14111
Leu	0,38 \pm 0,05	0,35 \pm 0,05	0,19502
Lys	0,36 \pm 0,08	0,35 \pm 0,05	0,60751
Met	0,12 \pm 0,00	0,12 \pm 0,00	
Phe	0,36 \pm 0,00	0,36 \pm 0,00	
Ser	7,97 \pm 0,18	7,94 \pm 0,29	1,00000
SMM	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	
Thr	4,20 \pm 0,08	4,72 \pm 0,48	0,00516
Trp	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	
Tyr	0,12 \pm 0,00	0,12 \pm 0,00	
Val	0,98 \pm 0,05	0,96 \pm 0,00	0,34659

Tab. 8.22 Aminosäuregehalt im Wildtyp (Col-0) aus der SALK-Kollektion und der *aco3-4* Mutante. Der Glucosinolatgehalt ist zwischen Wildtyp und Mutante signifikant unterschiedlich, wenn im t-Test $P < 0,01$.

Aminosäure	Aminosäuregehalt in Samen [nmol/mg Samen]		
	<i>aco3-4</i>	<i>Arabidopsis Col-0</i>	t-Test
Total	14,12 ± 2,51	12,81 ± 1,61	0,18266
Ala	0,54 ± 0,19	0,45 ± 0,09	0,15539
Arg	0,78 ± 0,35	0,82 ± 0,23	0,71969
Asn	2,42 ± 0,40	2,24 ± 0,33	0,30412
Asp	1,64 ± 0,10	1,45 ± 0,13	0,00281
Gln	0,68 ± 0,52	0,50 ± 0,25	0,33694
Glu	4,99 ± 0,49	4,69 ± 0,47	0,18100
Gly	0,38 ± 0,15	0,28 ± 0,04	0,04766
His	0,10 ± 0,03	0,08 ± 0,01	0,06507
Ile	0,23 ± 0,08	0,21 ± 0,04	0,35962
Leu	0,18 ± 0,09	0,16 ± 0,04	0,50698
Lys	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,06290
Met	0,33 ± 0,04	0,29 ± 0,03	0,03634
Phe	0,81 ± 0,22	0,71 ± 0,13	0,23933
Ser	0,40 ± 0,10	0,35 ± 0,05	0,18235
SMM	0,14 ± 0,02	0,13 ± 0,02	0,10570
Thr	0,08 ± 0,02	0,07 ± 0,02	0,58498
Trp	0,42 ± 0,15	0,37 ± 0,08	0,35067
Tyr	14,12 ± 2,51	12,81 ± 1,61	0,18266
Val	0,54 ± 0,19	0,45 ± 0,09	0,15539

Tab. 8.23 Aminosäuregehalt im Wildtyp (Col-0) aus der SALK-Kollektion und der *aco3-4* Mutante. Der Glucosinolatgehalt ist zwischen Wildtyp und Mutante signifikant unterschiedlich, wenn im t-Test $P < 0,01$.

Glucosinolat Typ	Glucosinolatgehalt in Rosettenblättern [$\mu\text{mol/g}$ Blattmaterial]		
	<i>aco3-4</i>	<i>Arabidopsis Col-0</i>	t-Test
Total Met GS	20,45 ± 1,22	20,26 ± 0,67	0,73200
Total	23,71 ± 1,47	24,11 ± 0,80	0,57697
3MSOP	1,85 ± 0,14	1,77 ± 0,09	0,28289
4MTB	0,37 ± 0,06	0,68 ± 0,07	0,00046
4MSOB	15,98 ± 1,02	15,62 ± 0,52	0,46353
7MSOH	0,34 ± 0,02	0,31 ± 0,02	0,02987
8MSOO	1,91 ± 0,14	1,86 ± 0,10	0,51310
I3M	2,36 ± 0,14	2,57 ± 0,20	0,05772
1MOI3M	0,57 ± 0,19	0,85 ± 0,23	0,04663
4MOI3M	0,33 ± 0,01	0,43 ± 0,01	0,00000

Tab. 8.24 Glucosinolatgehalt im Wildtyp (Col-0) aus der SALK-Kollektion und der *aco3-4* Mutante. Der Glucosinolatgehalt ist zwischen Wildtyp und Mutante signifikant unterschiedlich, wenn im t-Test $P < 0,01$.

Glucosinolat Typ	Glucosinolatgehalt in Samen [$\mu\text{mol/g}$ Samen]		
	<i>aco3-4</i>	<i>Arabidopsis</i> Col-0	t-Test
Total Met GS	84,22 \pm 8,40	82,77 \pm 9,93	0,74454
Total	97,89 \pm 8,65	95,80 \pm 10,80	0,66727
3OHP	1,14 \pm 0,27	1,25 \pm 0,36	0,44361
3BZO	5,83 \pm 0,43	5,92 \pm 0,64	0,61749
4OHB	5,49 \pm 1,18	5,42 \pm 1,20	0,89442
4MTB	33,37 \pm 4,26	32,16 \pm 4,79	0,55598
4BZO	15,71 \pm 1,36	14,55 \pm 1,84	0,15966
4MSOB	2,06 \pm 0,55	2,23 \pm 0,64	0,55131
5MTP	2,51 \pm 0,50	2,49 \pm 0,60	0,84735
5MSOP	0,18 \pm 0,06	0,21 \pm 0,06	0,44211
7MTH	3,40 \pm 0,53	3,49 \pm 0,68	0,76313
7MSOH	0,81 \pm 0,23	0,87 \pm 0,24	0,61302
8MTO	5,95 \pm 0,72	6,10 \pm 1,07	0,63340
8MSOO	7,78 \pm 1,26	8,08 \pm 1,60	0,66206
I3M	13,20 \pm 1,53	12,82 \pm 2,09	0,72401
4OHI3M	0,47 \pm 0,12	0,21 \pm 0,05	0,00001

Tab. 8.25 Glucosinolatgehalt im Wildtyp (Col-0) aus der SALK-Kollektion und der *aco3-4* Mutante. Der Glucosinolatgehalt ist zwischen Wildtyp und Mutante signifikant unterschiedlich, wenn im t-Test $P < 0,01$.

8.1.8 Aminosäure- und Glucosinolat-Spektren der *ipmi ssu2-1* Mutante

Aminosäure	Aminosäuregehalt in Rosettenblättern [nmol/mg Blattmaterial]		
	<i>ipmi ssu2-1</i>	<i>Arabidopsis</i> Col-0	t-Test
Total	160,17 \pm 4,65	153,29 \pm 4,94	0,03335
Ala	8,73 \pm 0,63	6,65 \pm 0,40	0,00007
Arg	0,71 \pm 0,22	0,92 \pm 0,27	0,17206
Asn	7,78 \pm 0,52	7,21 \pm 0,41	0,06844
Asp	21,14 \pm 0,74	22,64 \pm 0,70	0,00532
Gln	75,61 \pm 2,34	62,48 \pm 2,98	0,00001
Glu	17,19 \pm 1,16	22,34 \pm 1,37	0,00003
Gly	1,96 \pm 0,23	1,93 \pm 0,13	0,81815
His	0,44 \pm 0,13	0,19 \pm 0,15	0,00924
Ile	0,48 \pm 0,13	0,56 \pm 0,24	0,46270
Leu	0,59 \pm 0,14	0,77 \pm 0,22	0,16648
Lys	5,52 \pm 0,35	5,97 \pm 0,49	0,09559
Met	0,03 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01	0,50765
Phe	0,58 \pm 0,15	0,58 \pm 0,20	0,95829
Ser	10,61 \pm 0,40	13,07 \pm 0,20	0,00000
SMM	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	
Thr	6,95 \pm 0,36	6,04 \pm 0,30	0,00104
Trp	0,14 \pm 0,05	0,13 \pm 0,02	0,46196
Tyr	0,49 \pm 0,08	0,51 \pm 0,09	0,79825
Val	1,30 \pm 0,21	1,43 \pm 0,29	0,38692

Tab. 8.26 Aminosäuregehalt im Wildtyp (Col-0) aus der SALK-Kollektion und der *ipmi ssu2-1* Mutante. Der Glucosinolatgehalt ist zwischen Wildtyp und Mutante signifikant unterschiedlich, wenn im t-Test $P < 0,01$.

Aminosäure	Aminosäuregehalt in Samen [nmol/mg Samen]		
	<i>ipmi ssu2-1</i>	<i>Arabidopsis Col-0</i>	t-Test
Total	14,61 ± 1,16	12,94 ± 0,63	0,00346
Ala	0,86 ± 0,08	0,74 ± 0,06	0,00394
Arg	0,73 ± 0,07	0,57 ± 0,26	0,07887
Asn	1,54 ± 0,15	1,37 ± 0,11	0,02611
Asp	1,98 ± 0,19	1,73 ± 0,12	0,00610
Gln	0,24 ± 0,10	0,19 ± 0,06	0,22981
Glu	3,52 ± 0,28	3,03 ± 0,23	0,00177
Gly	0,54 ± 0,09	0,47 ± 0,02	0,05913
His	0,16 ± 0,02	0,15 ± 0,01	0,18971
Ile	0,39 ± 0,04	0,34 ± 0,02	0,00271
Leu	0,80 ± 0,08	0,75 ± 0,08	0,18552
Lys	0,55 ± 0,07	0,53 ± 0,06	0,50115
Met	0,14 ± 0,02	0,14 ± 0,02	0,89243
Phe	0,62 ± 0,06	0,60 ± 0,10	0,54134
Ser	0,80 ± 0,08	0,70 ± 0,04	0,00982
SMM	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	
Thr	0,46 ± 0,05	0,39 ± 0,01	0,00664
Trp	0,55 ± 0,07	0,59 ± 0,05	0,20492
Tyr	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,05	0,96804
Val	0,61 ± 0,06	0,52 ± 0,03	0,00321

Tab. 8.27 Aminosäuregehalt im Wildtyp (Col-0) aus der SALK-Kollektion und der *ipmi ssu2-1* Mutante.
Der Glucosinolatgehalt ist zwischen Wildtyp und Mutante signifikant unterschiedlich, wenn im t-Test $P < 0,01$.

Glucosinolat Typ	Glucosinolatgehalt in Rosettenblättern [$\mu\text{mol/g}$ Blattmaterial]		
	<i>ipmi ssu2-1</i>	<i>Arabidopsis Col-0</i>	t-Test
Total Met GS	28,85 ± 2,29	29,64 ± 1,95	0,54227
Total	32,15 ± 2,67	33,44 ± 2,00	0,38563
3MSOP	2,93 ± 0,23	2,65 ± 0,19	0,05479
4MTB	0,27 ± 0,06	0,22 ± 0,02	0,10980
4MSOB	22,45 ± 1,94	22,84 ± 1,59	0,72049
7MSOH	1,01 ± 0,04	1,11 ± 0,08	0,01320
8MSOO	0,77 ± 0,07	0,52 ± 0,06	0,00007
I3M	1,42 ± 0,12	2,30 ± 0,17	0,00000
1MOI3M	2,14 ± 0,22	2,51 ± 0,27	0,02504
4MOI3M	0,77 ± 0,33	0,86 ± 0,33	0,62430

Tab. 8.28 Glucosinolatgehalt im Wildtyp (Col-0) aus der SALK-Kollektion und der *ipmi ssu2-1* Mutante.
Der Glucosinolatgehalt ist zwischen Wildtyp und Mutante signifikant unterschiedlich, wenn im t-Test $P < 0,01$.

Glucosinolat Typ	Glucosinolatgehalt in Samen [$\mu\text{mol/g}$ Samen]		
	<i>ipmi ssu2-1</i>	<i>Arabidopsis Col-0</i>	t-Test
Total Met GS	75,23 \pm 8,27	56,59 \pm 9,80	0,00071
Total	87,28 \pm 8,15	66,12 \pm 10,26	0,00026
3OHP	0,83 \pm 0,17	0,48 \pm 0,12	0,00030
3BZO	6,29 \pm 0,72	4,01 \pm 0,58	0,00000
4OHB	4,59 \pm 0,58	3,05 \pm 0,50	0,00004
4MTB	30,69 \pm 4,41	18,11 \pm 4,60	0,00004
4BZO	15,42 \pm 0,83	16,77 \pm 0,62	0,00243
4MSOB	0,92 \pm 0,38	0,61 \pm 0,24	0,07669
5MTP	3,36 \pm 0,37	2,30 \pm 0,37	0,00004
5MSOP	0,18 \pm 0,06	0,11 \pm 0,02	0,01359
7MTH	4,62 \pm 0,94	2,53 \pm 1,05	0,00063
7MSOH	1,18 \pm 0,37	0,49 \pm 0,17	0,00034
8MTO	2,81 \pm 0,42	3,52 \pm 1,36	0,14034
8MSOO	4,34 \pm 0,83	4,60 \pm 1,57	0,65816
I3M	12,05 \pm 3,95	9,52 \pm 1,49	0,13039

Tab. 8.29 Glucosinolatgehalt im Wildtyp (Col-0) aus der SALK-Kollektion und der *ipmi ssu2-1* Mutante. Der Glucosinolatgehalt ist zwischen Wildtyp und Mutante signifikant unterschiedlich, wenn im t-Test $P < 0,01$.

8.1.9 Aminosäure- und Glucosinolat-Spektren der *ipmi ssu3-1* Mutante

Aminosäure	Aminosäuregehalt in Rosettenblättern [nmol/mg Blattmaterial]		
	<i>ipmi ssu3-1</i>	<i>Arabidopsis</i> Wassilewskija	t-Test
Total	198,36 \pm 21,03	225,00 \pm 24,16	0,01191
Ala	9,25 \pm 1,04	10,42 \pm 1,13	0,01778
Arg	0,82 \pm 0,07	0,82 \pm 0,05	0,82909
Asn	7,17 \pm 1,08	6,73 \pm 0,63	0,26553
Asp	17,20 \pm 1,44	17,86 \pm 1,98	0,38042
Gln	106,88 \pm 13,97	125,95 \pm 16,35	0,00788
Glu	33,92 \pm 2,69	36,58 \pm 3,98	0,07777
Gly	2,99 \pm 0,66	5,65 \pm 1,95	0,00025
His	0,25 \pm 0,09	0,29 \pm 0,06	0,26196
Ile	0,41 \pm 0,08	0,40 \pm 0,06	0,73419
Leu	0,56 \pm 0,12	0,53 \pm 0,06	0,45000
Lys	0,29 \pm 0,08	0,25 \pm 0,04	0,21856
Met	0,24 \pm 0,00	0,23 \pm 0,04	0,26371
Phe	0,45 \pm 0,07	0,50 \pm 0,05	0,06711
Ser	12,00 \pm 1,43	12,35 \pm 0,93	0,51158
SMM	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	
Thr	4,72 \pm 0,38	5,02 \pm 0,51	0,12104
Trp	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	
Tyr	0,26 \pm 0,11	0,23 \pm 0,09	0,47707
Val	1,15 \pm 0,16	1,21 \pm 0,11	0,32955

Tab. 8.30 Aminosäuregehalt im Wildtyp (Wassilewskija) aus der FLAG-Kollektion und der *ipmi ssu3-1* Mutante. Der Glucosinolatgehalt ist zwischen Wildtyp und Mutante signifikant unterschiedlich, wenn im t-Test $P < 0,01$.

Aminosäure	Aminosäuregehalt in Samen [nmol/mg Samen]		
	<i>ipmi ssu3-1</i>	<i>Arabidopsis</i> Wassilewskija	t-Test
Total	8,01 ± 1,18	6,82 ± 0,57	0,03452
Ala	0,23 ± 0,05	0,23 ± 0,07	0,84626
Arg	0,44 ± 0,14	0,36 ± 0,03	0,15090
Asn	1,11 ± 0,27	0,79 ± 0,05	0,00878
Asp	1,13 ± 0,22	0,98 ± 0,11	0,12372
Gln	0,23 ± 0,13	0,15 ± 0,04	0,14374
Glu	2,55 ± 0,31	2,36 ± 0,22	0,19363
Gly	0,35 ± 0,08	0,26 ± 0,04	0,02758
His	0,09 ± 0,04	0,08 ± 0,02	0,63458
Ile	0,17 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,00058
Leu	0,10 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,00833
Met	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,74317
Phe	0,22 ± 0,04	0,20 ± 0,02	0,20947
Ser	0,42 ± 0,07	0,31 ± 0,03	0,00175
Thr	0,19 ± 0,03	0,16 ± 0,02	0,01545
Trp	0,52 ± 0,17	0,50 ± 0,13	0,80593
Tyr	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,16469
Val	0,17 ± 0,03	0,14 ± 0,01	0,12079

Tab. 8.31 Aminosäuregehalt im Wildtyp (Wassilewskija) aus der FLAG-Kollektion und der *ipmi ssu3-1* Mutante. Der Glucosinolatgehalt ist zwischen Wildtyp und Mutante signifikant unterschiedlich, wenn im t-Test $P < 0,01$.

Glucosinolat Typ	Glucosinolatgehalt in Rosettenblättern [$\mu\text{mol/g}$ Blattmaterial]		
	<i>ipmi ssu3-1</i>	<i>Arabidopsis</i> Wassilewskija	t-Test
Total Met GS	19,06 ± 3,03	20,51 ± 2,24	0,21961
Total	21,16 ± 3,18	23,61 ± 2,44	0,05629
3MTP	0,16 ± 0,11	0,35 ± 0,05	0,00003
3MSOP	16,31 ± 2,69	17,63 ± 2,04	0,21142
4MSOB	0,40 ± 0,02	0,41 ± 0,03	0,17407
7MSOH	0,16 ± 0,03	0,12 ± 0,02	0,00024
8MSOO	2,03 ± 0,42	1,99 ± 0,20	0,79748
I3M	1,61 ± 0,24	2,51 ± 0,52	0,00002
1MOI3M	0,28 ± 0,10	0,37 ± 0,11	0,05155
4MOI3M	0,19 ± 0,03	0,19 ± 0,02	0,46047
4OHI3M	0,02 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,00003

Tab. 8.32 Glucosinolatgehalt im Wildtyp (Wassilewskija) aus der FLAG-Kollektion und der *ipmi ssu3-1* Mutante. Der Glucosinolatgehalt ist zwischen Wildtyp und Mutante signifikant unterschiedlich, wenn im t-Test $P < 0,01$.

Glucosinolat Typ	Glucosinolatgehalt in Samen [$\mu\text{mol/g}$ Samen]		
	<i>ipmi ssu3-1</i>	<i>Arabidopsis</i> Wassilevskija	t-Test
Total Met GS	9,26 \pm 0,56	7,01 \pm 0,60	0,00611
Total	74,76 \pm 4,45	56,52 \pm 4,78	0,00586
3OHP	3,58 \pm 0,40	3,20 \pm 0,32	0,38138
3MTP	36,04 \pm 1,82	25,38 \pm 2,34	0,00704
3BZO	11,80 \pm 0,56	10,81 \pm 0,66	0,02458
3MSOP	4,80 \pm 1,64	1,90 \pm 0,82	0,03460
7MTH	2,28 \pm 0,37	1,72 \pm 0,35	0,08291
7MSOH	0,36 \pm 0,06	0,27 \pm 0,10	0,24668
8MTO	9,84 \pm 2,02	8,38 \pm 0,89	0,23729
8MSOO	5,40 \pm 0,90	4,41 \pm 0,87	0,26415
I3M	0,65 \pm 0,11	0,45 \pm 0,04	0,00362

Tab. 8.33 Glucosinolatgehalt im Wildtyp (Wassilevskija) aus der FLAG-Kollektion und der *ipmi ssu3-1* Mutante. Der Glucosinolatgehalt ist zwischen Wildtyp und Mutante signifikant unterschiedlich, wenn im t-Test $P < 0,01$.

8.1.10 Aminosäure- und Glucosinolat-Spektren der *ipmi lsu-1* Mutante

Aminosäure	Aminosäuregehalt in Rosettenblättern [nmol/mg Blattmaterial]		
	<i>ipmi lsu-1</i>	<i>Arabidopsis</i> Col-0	t-Test
Total	225,75 \pm 9,42	221,01 \pm 12,05	0,42782
Ala	6,13 \pm 0,19	6,82 \pm 0,50	0,00559
Arg	0,81 \pm 0,05	0,92 \pm 0,09	0,01870
Asn	9,46 \pm 0,66	9,74 \pm 0,66	0,45357
Asp	23,45 \pm 0,94	20,71 \pm 1,22	0,00050
Gln	121,65 \pm 6,39	120,96 \pm 7,60	0,85802
Glu	38,13 \pm 1,73	34,97 \pm 1,74	0,00524
Gly	4,29 \pm 0,41	6,64 \pm 0,74	0,00001
His	0,40 \pm 0,04	0,41 \pm 0,05	0,55172
Ile	0,29 \pm 0,00	0,29 \pm 0,00	
Leu	0,29 \pm 0,00	0,30 \pm 0,04	0,33705
Lys	0,67 \pm 0,06	0,62 \pm 0,05	0,07873
Met	0,41 \pm 0,07	0,19 \pm 0,00	0,00000
Phe	0,44 \pm 0,05	0,45 \pm 0,05	0,61101
Ser	12,62 \pm 0,66	11,25 \pm 0,47	0,00076
SMM	0,19 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00000
Thr	5,12 \pm 0,20	5,25 \pm 0,38	0,41239
Trp	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	
Tyr	0,10 \pm 0,00	0,10 \pm 0,00	
Val	0,96 \pm 0,00	0,92 \pm 0,08	0,17512

Tab. 8.34 Aminosäuregehalt im Wildtyp (Col-0) aus der SALK-Kollektion und der *ipmi lsu-1* Mutante. Der Glucosinolatgehalt ist zwischen Wildtyp und Mutante signifikant unterschiedlich, wenn im t-Test $P < 0,01$.

Aminosäure	Aminosäuregehalt in Samen [nmol/mg Samen]		
	<i>ipmi lsu-1</i>	<i>Arabidopsis Col-0</i>	t-Test
Total	11,77 ± 1,53	12,92 ± 1,50	0,15501
Ala	1,18 ± 0,37	1,02 ± 0,07	0,27747
Arg	0,71 ± 0,12	0,66 ± 0,05	0,31421
Asn	2,40 ± 0,42	2,60 ± 0,22	0,27308
Asp	0,72 ± 0,17	1,01 ± 0,20	0,00710
Gln	0,62 ± 0,07	0,68 ± 0,06	0,08347
Glu	3,35 ± 0,53	3,73 ± 0,16	0,09606
Gly	0,35 ± 0,10	0,48 ± 0,25	0,17231
His	0,40 ± 0,05	0,40 ± 0,03	0,98694
Ile	0,19 ± 0,03	0,20 ± 0,07	0,78330
Leu	0,13 ± 0,02	0,16 ± 0,10	0,36907
Met	0,02 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,00017
Phe	0,33 ± 0,05	0,33 ± 0,06	0,95247
Ser	0,51 ± 0,08	0,63 ± 0,43	0,39583
Thr	0,18 ± 0,03	0,26 ± 0,12	0,09601
Trp	0,29 ± 0,04	0,28 ± 0,06	0,71480
Tyr	0,10 ± 0,02	0,12 ± 0,06	0,27826
Val	0,29 ± 0,05	0,32 ± 0,10	0,37505

Tab. 8.35 Aminosäuregehalt im Wildtyp (Col-0) aus der SALK-Kollektion und der *ipmi lsu-1* Mutante.
Der Glucosinolatgehalt ist zwischen Wildtyp und Mutante signifikant unterschiedlich, wenn im t-Test $P < 0,01$.

Glucosinolat Typ	Glucosinolatgehalt in Rosettenblättern [$\mu\text{mol/g}$ Blattmaterial]		
	<i>ipmi lsu-1</i>	<i>Arabidopsis Col-0</i>	t-Test
Total Met GS	38,51 ± 2,94	40,85 ± 2,95	0,16238
Total	48,16 ± 3,49	47,16 ± 3,04	0,57892
3MSOP	23,08 ± 1,89	3,51 ± 0,32	0,00000
4MTB	0,59 ± 0,06	2,47 ± 0,26	0,00000
4MSOB	14,26 ± 1,12	29,64 ± 2,22	0,00000
5MSOP	0,29 ± 0,03	1,04 ± 0,08	0,00000
7MSOH	0,15 ± 0,02	0,58 ± 0,03	0,00000
8MSOO	0,05 ± 0,02	3,54 ± 0,24	0,00000
4MP	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	
5MH	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	
I3M	6,65 ± 0,47	4,11 ± 0,27	0,00000
1MOI3M	2,24 ± 0,60	1,50 ± 0,59	0,03714
4MOI3M	0,76 ± 0,06	0,70 ± 0,05	0,07192
4OHI3M	0,08 ± 0,06	0,06 ± 0,02	0,41739

Tab. 8.36 Glucosinolatgehalt im Wildtyp (Col-0) aus der SALK-Kollektion und der *ipmi lsu-1* Mutante.
Der Glucosinolatgehalt ist zwischen Wildtyp und Mutante signifikant unterschiedlich, wenn im t-Test $P < 0,01$.

Glucosinolat Typ	Glucosinolatgehalt in Samen [$\mu\text{mol/g}$ Samen]		
	<i>ipmi lsu-1</i>	<i>Arabidopsis Col-0</i>	t-Test
Total Met GS	153,51 \pm 12,41	128,61 \pm 21,74	0,01168
Total	160,33 \pm 13,15	134,19 \pm 22,14	0,01052
3OHP	30,05 \pm 3,15	2,57 \pm 0,50	0,00000
3MTP	9,58 \pm 2,75	0,07 \pm 0,05	0,00000
3BZO	48,25 \pm 3,74	8,06 \pm 1,17	0,00000
3MSOP	2,71 \pm 1,25	0,01 \pm 0,02	0,00006
4OHB	6,46 \pm 0,96	9,50 \pm 1,71	0,00048
4MTB	41,31 \pm 4,88	53,91 \pm 12,07	0,01241
4BZO	6,82 \pm 0,93	22,71 \pm 1,36	0,00000
4MSOB	3,61 \pm 1,17	2,63 \pm 0,45	0,05484
5MTP	3,16 \pm 1,00	4,93 \pm 0,93	0,00274
7MTH	0,85 \pm 0,10	5,22 \pm 1,03	0,00000
7MSOH	0,35 \pm 0,06	1,20 \pm 0,32	0,00000
8MTO	0,10 \pm 0,06	7,67 \pm 1,50	0,00000
8MSOO	0,26 \pm 0,06	10,14 \pm 2,10	0,00000
I3M	6,63 \pm 0,85	5,44 \pm 2,15	0,15028
4OHI3M	0,19 \pm 0,03	0,14 \pm 0,05	0,01631

Tab. 8.37 Glucosinolatgehalt im Wildtyp (Col-0) aus der SALK-Kollektion und der *ipmi lsu-1* Mutante. Der Glucosinolatgehalt ist zwischen Wildtyp und Mutante signifikant unterschiedlich, wenn im t-Test $P < 0,01$.

8.1.11 Aminosäure- und Glucosinolat-Spektren der *ipmi lsu-2* Mutante

Aminosäure	Aminosäuregehalt in Rosettenblättern [nmol/mg Blattmaterial]		
	<i>ipmi lsu-2</i>	<i>Arabidopsis Col-0</i>	t-Test
Total	161,46 \pm 9,05	165,82 \pm 17,87	0,54039
Ala	6,44 \pm 0,61	6,25 \pm 1,02	0,66031
Arg	0,60 \pm 0,09	0,56 \pm 0,08	0,38723
Asn	4,89 \pm 0,43	4,42 \pm 0,83	0,16539
Asp	16,92 \pm 0,88	17,57 \pm 1,36	0,26208
Gln	82,92 \pm 6,13	90,34 \pm 13,14	0,16185
Glu	30,96 \pm 1,12	29,09 \pm 1,92	0,02696
Gly	1,07 \pm 0,49	0,89 \pm 0,58	0,50414
His	0,29 \pm 0,06	0,36 \pm 0,08	0,04502
Ile	0,30 \pm 0,06	0,29 \pm 0,06	0,69299
Leu	0,36 \pm 0,00	0,36 \pm 0,00	1,00000
Lys	0,36 \pm 0,00	0,34 \pm 0,05	0,20110
Met	0,18 \pm 0,06	0,12 \pm 0,00	0,00881
Phe	0,32 \pm 0,06	0,31 \pm 0,06	0,92005
Ser	10,85 \pm 0,68	9,80 \pm 0,65	0,00441
SMM	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	
Thr	3,87 \pm 0,18	3,90 \pm 0,45	0,86180
Trp	0,05 \pm 0,06	0,01 \pm 0,04	0,18294
Tyr	0,24 \pm 0,06	0,31 \pm 0,06	0,02823
Val	0,87 \pm 0,06	0,90 \pm 0,06	0,30750

Tab. 8.38 Glucosinolatgehalt im Wildtyp (Col-0) und der *ipmi lsu-2* Mutante. Der Glucosinolatgehalt ist zwischen Wildtyp und Mutante signifikant unterschiedlich, wenn im t-Test $P < 0,01$.

Aminosäure	Aminosäuregehalt in Samen [nmol/mg Samen]		
	<i>ipmi lsu-2</i>	<i>Arabidopsis Col-0</i>	t-Test
Total	47,67 ± 26,02	23,30 ± 8,07	0,07159
Ala	2,28 ± 0,91	1,73 ± 0,59	0,30205
Arg	2,19 ± 0,60	1,30 ± 0,20	0,00885
Asn	5,58 ± 1,68	3,37 ± 0,34	0,01242
Asp	2,56 ± 0,28	1,88 ± 0,55	0,04109
Gln	5,37 ± 1,91	3,24 ± 0,69	0,03742
Glu	9,49 ± 3,40	6,90 ± 1,59	0,23389
Gly	1,58 ± 0,11	1,78 ± 0,41	0,44710
His	0,87 ± 0,37	0,39 ± 0,10	0,01462
Ile	0,68 ± 0,08	0,76 ± 0,17	0,49033
Leu	0,49 ± 0,04	0,65 ± 0,25	0,33108
Met	0,17 ± 0,07	0,08 ± 0,02	0,01976
Phe	0,64 ± 0,04	0,55 ± 0,07	0,07569
Ser	2,40 ± 0,55	1,94 ± 0,35	0,16121
Thr	0,93 ± 0,25	0,78 ± 0,15	0,29836
Trp	1,02 ± 0,32	0,58 ± 0,10	0,01167
Tyr	0,29 ± 0,02	0,22 ± 0,06	0,10460
Val	1,15 ± 0,11	1,17 ± 0,27	0,90076

Tab. 8.39 Aminosäuregehalt im Wildtyp (Col-0) und der *ipmi lsu-2* Mutante. Der Glucosinolatgehalt ist zwischen Wildtyp und Mutante signifikant unterschiedlich, wenn im t-Test $P < 0,01$.

Glucosinolat Typ	Glucosinolatgehalt in Rosettenblättern [$\mu\text{mol/g}$ Blattmaterial]		
	<i>ipmi lsu-2</i>	<i>Arabidopsis Col-0</i>	t-Test
Total Met GS	16,02 ± 1,81	17,62 ± 1,96	0,08810
Total	20,70 ± 2,82	21,83 ± 2,23	0,34357
3MSOP	7,29 ± 0,94	1,67 ± 0,20	0,00000
4MTB	0,19 ± 0,04	0,23 ± 0,07	0,11009
4MSOB	8,10 ± 0,90	13,80 ± 1,58	0,00000
7MSOH	0,24 ± 0,03	0,30 ± 0,05	0,00770
8MSOO	0,21 ± 0,03	1,61 ± 0,37	0,00000
I3M	2,88 ± 0,72	2,76 ± 0,50	0,66708
1MOI3M	1,36 ± 0,70	1,08 ± 0,54	0,33564
4MOI3M	0,38 ± 0,05	0,34 ± 0,05	0,09851
4OHI3M	0,07 ± 0,03	0,04 ± 0,01	0,03695

Tab. 8.40 Glucosinolatgehalt im Wildtyp (Col-0) und der *ipmi lsu-2* Mutante. Der Glucosinolatgehalt ist zwischen Wildtyp und Mutante signifikant unterschiedlich, wenn im t-Test $P < 0,01$.

Glucosinolat Typ	Glucosinolatgehalt in Samen [$\mu\text{mol/g}$ Samen]		
	<i>ipmi lsu-2</i>	<i>Arabidopsis Col-0</i>	t-Test
Total Met GS	74,93 \pm 8,76	44,92 \pm 7,02	0,00004
Total	78,40 \pm 9,51	47,83 \pm 7,34	0,00005
3OHP	8,96 \pm 1,22	0,81 \pm 0,19	0,00000
3MTP	3,60 \pm 2,34	0,00 \pm 0,00	0,00046
3BZO	18,45 \pm 1,59	3,15 \pm 0,48	0,00000
3MSOP	2,53 \pm 1,45	0,12 \pm 0,04	0,00026
4OHB	4,38 \pm 1,67	4,31 \pm 0,58	0,90124
4MTB	26,82 \pm 8,01	13,84 \pm 3,83	0,00185
4BZO	4,40 \pm 2,78	12,29 \pm 0,66	0,00000
4MSOB	3,71 \pm 1,64	1,68 \pm 0,67	0,00745
5MTP	0,89 \pm 0,11	1,29 \pm 0,24	0,00885
7MTH	0,56 \pm 0,14	1,62 \pm 0,35	0,00012
7MSOH	0,25 \pm 0,07	0,51 \pm 0,14	0,00603
8MTO	0,15 \pm 0,03	1,95 \pm 0,62	0,00014
8MSOO	0,23 \pm 0,05	3,37 \pm 0,75	0,00001
I3M	3,47 \pm 0,82	2,78 \pm 0,43	0,06454
4OHI3M	0,00 \pm 0,00	0,13 \pm 0,03	0,00001

Tab. 8.41 Glucosinolatgehalt im Wildtyp (Col-0) und der *ipmi lsu-2* Mutante. Der Glucosinolatgehalt ist zwischen Wildtyp und Mutante signifikant unterschiedlich, wenn im t-Test $P < 0,01$.

8.1.12 Aminosäure- und Glucosinolat-Spektren der *ipmi lsu-3* Mutante

Aminosäure	Aminosäuregehalt in Rosettenblättern [nmol/mg Blattmaterial]		
	<i>ipmi lsu-3</i>	<i>Arabidopsis Col-0</i>	t-Test
Total	177,58 \pm 19,88	154,83 \pm 13,47	
Ala	7,39 \pm 1,16	7,28 \pm 1,16	0,83282
Arg	0,72 \pm 0,00	0,61 \pm 0,11	0,00188
Asn	3,88 \pm 0,28	3,08 \pm 0,33	0,00001
Asp	21,44 \pm 2,79	17,76 \pm 1,71	0,00164
Gln	88,16 \pm 9,44	79,68 \pm 6,21	0,00788
Glu	33,92 \pm 2,69	36,58 \pm 3,98	0,02456
Gly	1,25 \pm 0,45	1,42 \pm 0,35	0,35468
His	0,45 \pm 0,07	0,25 \pm 0,07	0,00000
Ile	0,32 \pm 0,06	0,29 \pm 0,08	0,30725
Leu	0,37 \pm 0,10	0,38 \pm 0,17	0,80811
Lys	0,46 \pm 0,07	0,17 \pm 0,28	0,00249
Met	0,39 \pm 0,07	0,18 \pm 0,06	0,00000
Phe	0,37 \pm 0,06	0,31 \pm 0,08	0,07673
Ser	10,40 \pm 0,85	9,98 \pm 0,86	0,26763
SMM	0,26 \pm 0,05	0,00 \pm 0,00	0,00000
Thr	5,08 \pm 0,23	4,51 \pm 0,46	0,00130
Trp	0,07 \pm 0,06	0,00 \pm 0,00	0,00000
Tyr	0,20 \pm 0,08	0,25 \pm 0,04	0,06946
Val	1,27 \pm 0,08	0,84 \pm 0,14	0,00000

Tab. 8.42 Aminosäuregehalt im Wildtyp (Col-0) aus der GABI Kat-Kollektion und der *ipmi lsu-3* Mutante. Der Glucosinolatgehalt ist zwischen Wildtyp und Mutante signifikant unterschiedlich, wenn im t-Test $P < 0,01$.

Glucosinolat Typ	Glucosinolatgehalt in Rosettenblättern [$\mu\text{mol/g}$ Blattmaterial]		
	<i>ipmi lsu-3</i>	<i>Arabidopsis Col-0</i>	t-Test
Total Met GS	16,05 \pm 1,04	15,17 \pm 1,32	0,14460
Total	20,19 \pm 1,16	17,67 \pm 1,43	0,00098
3MSOP	12,39 \pm 0,84	1,36 \pm 0,13	0,00000
4MTB	0,09 \pm 0,01	0,33 \pm 0,04	0,00000
4MSOB	3,57 \pm 0,23	11,43 \pm 0,99	0,00000
7MSOH	0,01 \pm 0,00	0,28 \pm 0,03	0,00000
8MSOO	0,00 \pm 0,00	1,76 \pm 0,18	0,00000
I3M	3,13 \pm 0,13	1,89 \pm 0,15	0,00000
1MOI3M	0,61 \pm 0,14	0,31 \pm 0,05	0,00001
4MOI3M	0,39 \pm 0,04	0,29 \pm 0,03	0,00001
4OHI3M	0,01 \pm 0,01	0,01 \pm 0,00	0,03881

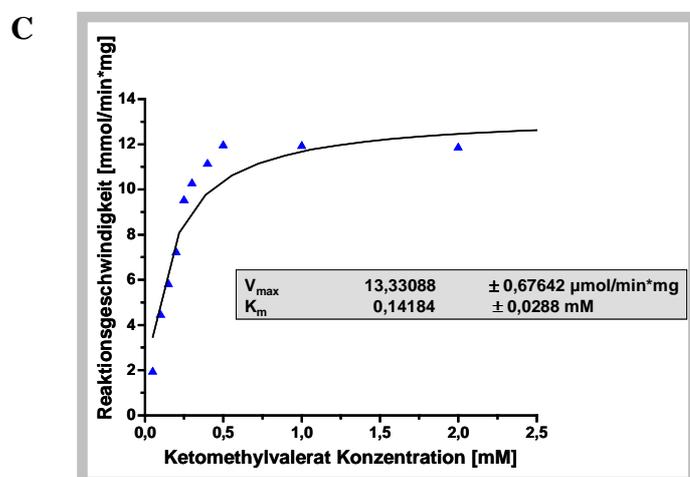
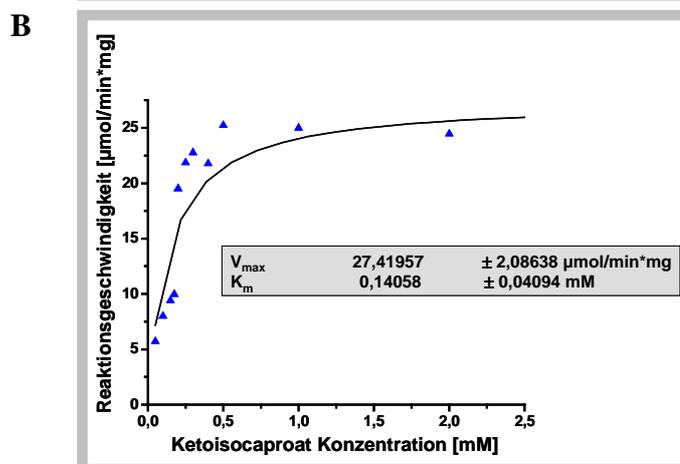
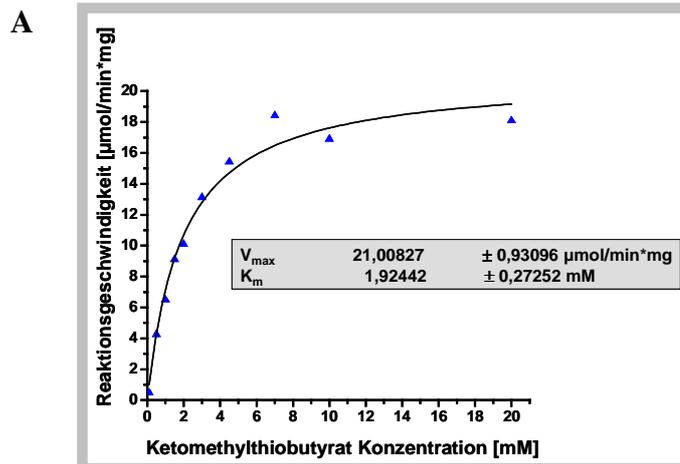
Tab. 8.43 Glucosinolatgehalt im Wildtyp (Col-0) aus der GABI Kat-Kollektion und der *ipmi lsu-3* Mutante. Der Glucosinolatgehalt ist zwischen Wildtyp und Mutante signifikant unterschiedlich, wenn im t-Test $P < 0,01$.

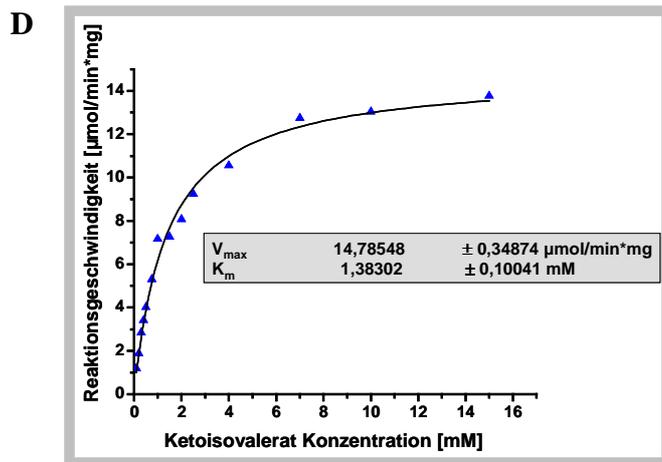
Glucosinolat Typ	Glucosinolatgehalt in Samen [$\mu\text{mol/g}$ Samen]	
	<i>ipmi lsu-3</i>	<i>Arabidopsis Col-0</i>
Total Met GS	63,11	65,23
Total	67,58	69,28
3OHP	17,51	0,89
3MTP	3,47	0,00
3BZO	21,63	4,39
3MSOP	1,19	0,00
4OHB	2,82	4,66
4MTB	12,97	22,28
4BZO	2,04	15,66
4MSOB	1,28	0,88
5MTP	0,00	2,05
7MTH	0,12	3,72
7MSOH	0,00	0,77
8MTO	0,07	4,00
8MSOO	0,00	5,93
I3M	4,31	3,87
4OHI3M	0,16	0,17

Tab. 8.44 Glucosinolatgehalt im Wildtyp (Col-0) aus der GABI Kat-Kollektion und der *ipmi lsu-3* Mutante. Hierbei wurden die Samen einer Pflanze untersucht.

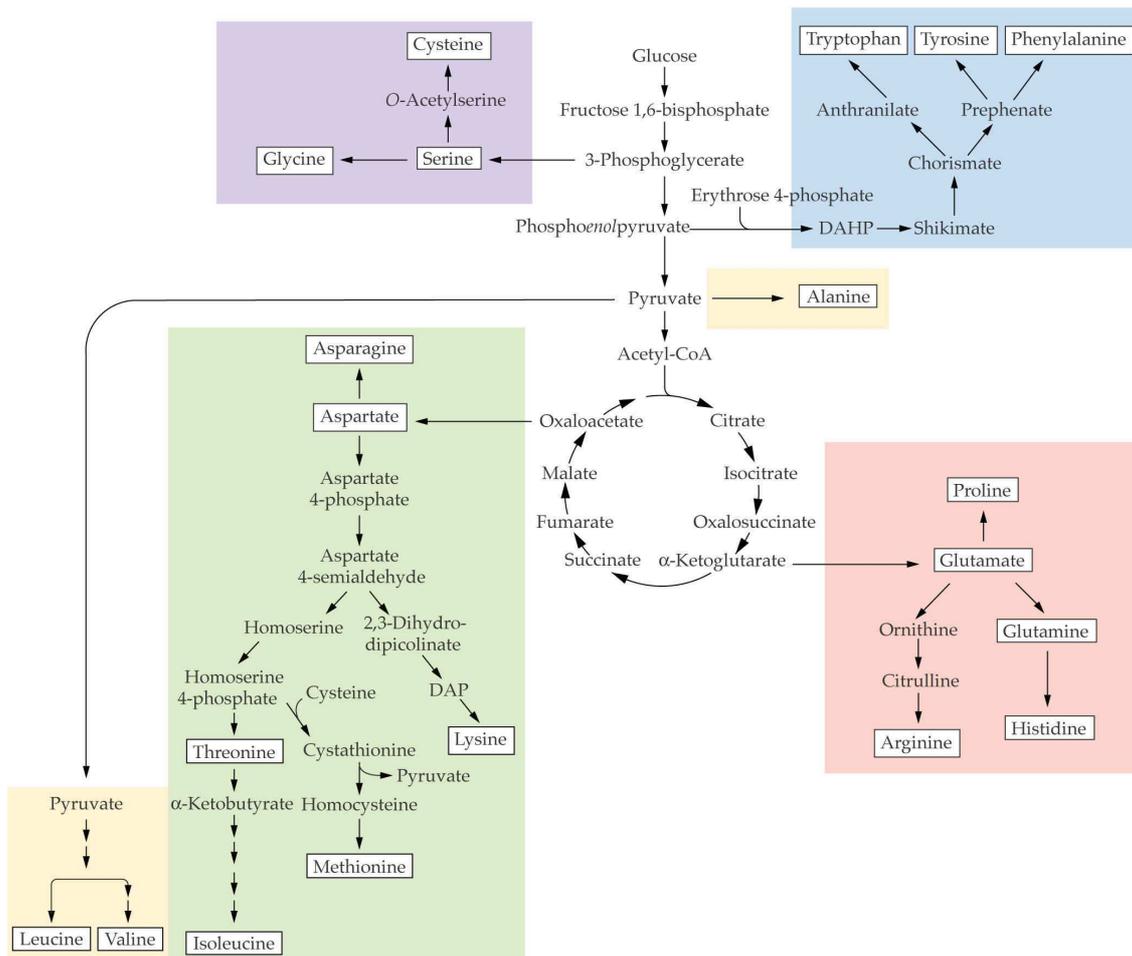
8.2 Kinetiken mit rekombinantem AtBCAT3-Protein

Darstellung der Aminierungskinetiken mit Ketomethylthiobutyrat (A), Ketoisocaproat (B), Ketomethylvalerat (C) und Ketoisovalerat (D). Es wurde jeweils die Substratkonzentration gegen die Reaktionsgeschwindigkeit aufgetragen. Es ergibt sich mit jedem Substrat eine typische Michaelis-Menten-Kinetik.





8.3 Aminosäuremetabolismus in höheren Pflanzen



8.4 Abkürzungen

%	Prozent
#	Nummer
~	ungefähr
3`-	Hydroxyterminus der Nukleinsäuren
5`-	Phosphatterminus der Nukleinsäuren
Abb.	Abbildung
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AtBCAT	Branched-Chain Aminotransferase aus <i>Arabidopsis thaliana</i>
bidest.	Bidestilliertes Wasser
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
cDNA	Copy DNA
cm	Zentimeter
C-Terminus	Carboxylterminus von Proteinen
d	Tag
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonucleic Acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiotreithol
g	Gravitationskonstante
h	Stunde
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
μE	Mikro-Einstein
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mOsm	Milliosmol
MPa	Megapascal
mRNA	Messenger RNA
msec	Millisekunde
N	Normalität
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
N-Terminus	Stickstoffterminus von Proteinen
OD	Optische Dichte
P	Wahrscheinlichkeit
RNA	Ribonucleic Acid, Ribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale RNA

rpm	Rounds Per Minute
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
sd	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
U	Unit
v/v	Volumen / Volumen
w/v	Gewicht / Volumen

8.5 Publikationsliste

Originalpublikationen

Knill T., Schuster, J., Reichelt, M., Gershenzon, J. and Binder, S. (2008) *Arabidopsis thaliana* branched-chain aminotransferase 3 (BCAT3) functions in both amino acid and glucosinolate biosynthesis of methionine-derived in *Arabidopsis*. Plant Physiol. Epub 27th of Dec 2007

Schuster, J., Knill T., Reichelt, M., Gershenzon, J. and Binder, S. (2006) BRANCHED-CHAIN AMINOTRANSFERASE4 is part of the chain elongation pathway in the biosynthesis of methionine-derived glucosinolates in *Arabidopsis*. Plant Cell, 18: 2664-2679

Reviews

Binder, S., Knill, T. and Schuster, J. (2007) Branched-chain amino acid metabolism in plants. Physiol. Plant., 129, 68-78

Poster und Tagungsbeiträge

Tanja Knill, Joachim Schuster, Michael Reichelt, Jonathan Gershenzon und Stefan Binder (2007) A Branched-Chain Aminotransferase involved in primary and amino acid and secondary glucosinolate metabolism. Botanikertagung, Universität Hamburg 2007, P15: Nr. 1

Tanja Knill, Joachim Schuster, Michael Reichelt, Jonathan Gershenzon und Stefan Binder (2006) *AtBCAT-4*, an enzyme operating at the interface between primary methionine and secondary glucosinolate biosynthesis. 1st International Conference on Glucosinolates, Jena 2006, Nr. 9

Tanja Knill, Joachim Schuster, Michael Reichelt, Jonathan Gershenzon und Stefan Binder (2006) *AtBCAT-4*, an enzyme operating at the interface between primary methionine and secondary glucosinolate biosynthesis. 19.Tagung Molekularbiologie der Pflanzen, Dabringhausen, Nr. 36

Schuster J., Knill T., Binder S. (2005) The role of branched-chain aminotransferases and isovaleryl-CoA dehydrogenase in primary and secondary metabolism. 7th International Congress on Plant Mitochondria, Obernai, Frankreich, P90

Schuster J., Knill T., Binder S. (2005) The role of branched-chain aminotransferases in primary and secondary metabolism. 18. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen, Dabringhausen, Nr. 39

Schuster J., Schmid O., Knill T., Binder S. (2004)

Distinct roles of branched-chain aminotransferases and isovaleryl-CoA dehydrogenase in the aliphatic amino acid metabolism in plants.

Botanikertagung 2004, Braunschweig, P 10-02

Schuster J., Schmid O., Knill T., Binder S. (2004)

Different roles of branched-chain aminotransferases (BCAT) in the metabolism of aliphatic amino acids in plants.

15th International Conference on Arabidopsis Research, Berlin, T07-004

8.6 Lebenslauf

Name:	Knill
Vorname:	Tanja
Geburtsdatum:	07.11.1979
Geburtsort:	Ulm / Deutschland
1986-1990:	Grund- und Teilhauptschule Neu-Ulm/Ludwigsfeld
1990-1994:	Lessing-Gymnasium Neu-Ulm
1994-1999:	Illertal-Gymnasium Vöhringen/Illerzell allgemeine Hochschulreife (25.06.1999)
WS 1999-SS 2005:	Studium der Biologie an der Universität Ulm, Diplomarbeit in der Abteilung Molekulare Botanik der Universität Ulm Titel der Arbeit: Enzymaktivitäten der Branched-Chain Aminotransferasen 3 und 4 (AtBCAT-3 und AtBCAT-4) in <i>Arabidopsis thaliana</i> Diplom (11.07.2005)
SS 2005-SS 2008:	Promotion in der Abteilung Molekulare Botanik der Universität Ulm bei Prof. Dr. S. Binder

8.7 Erklärung über die in Anspruch genommenen Hilfen

Ich erkläre, dass ich diese Arbeit selbständig angefertigt, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt, und wörtlich oder inhaltlich übernommene Texte als solche kenntlich gemacht habe.

Ulm, den

8.8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Besonders danke ich Herrn Prof. Dr. S. Binder für die umfangreiche und freundliche Betreuung in den letzten drei Jahren.

Ich danke allen meinen Kolleginnen und Kollegen im SB-Labor Joachim Forner, Conny Guha, Angela Hölzle, Christian Jonietz, Daniela Köhler, Carolin Müller, Angelika Müller, Ulrike Tengler, Daniela Thornton, Sabine Thuss und Bärbel Weber für die gegenseitige Unterstützung und für die schöne Arbeitsatmosphäre.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. A. Brennicke für seine Unterstützung während der letzten Jahre, sowie allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern in der Abteilung Molekulare Botanik für das kollegiale Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt ebenfalls den Mitgliedern der Prüfungskommission, die sich freundlicherweise bereit erklärten, diese Arbeit zu begutachten. Hierbei danke ich im Besonderen Herrn Prof. Dr. B. Eikmanns, der sich freundlicherweise bereit erklärte Zweitgutachter dieser Arbeit zu sein.

Nicht zuletzt danke ich auch besonders dem Land Baden-Württemberg, für die finanzielle Förderung (Landesgraduiertenförderung) während meiner Promotion.