



Technische Universität München
Lehrstuhl für Botanik

Analyse des Schwefelmetaboloms in *Arabidopsis thaliana*

Katharina Gläser-Wellmann

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. A. Gierl

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. E. Grill
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. Ph. Schmitt-Kopplin

Die Dissertation wurde am 25.11.2014 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 03.03.2015 angenommen.

In Gedenken an Dr. Ralph Blum

Mental acuity was never born from comfortable circumstances

Haruki Murakami (1Q84)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Formelverzeichnis	IX
Abkürzungen	X
1 Einleitung.....	1
1.1 Schwefel und seine Verbindungen	1
1.1.1 Primäre Schwefelassimilation.....	1
1.1.2 Methionin.....	6
1.1.3 Glutathion	7
1.1.3.1 Glutathionkonjugatmetabolismus	9
1.1.4 Spezialisierter Schwefelmetabolismus.....	13
1.2 Metabolomics	17
1.2.1 Analytische Methoden	18
1.2.1.1 Ultrahochauflösende Massenspektrometrie durch Ionenzyklotronresonanz Fouriertransformation	19
1.2.2 Identifikation von Metaboliten	20
1.2.3 Markierung mit stabilen Isotopen.....	22
1.3 Zielsetzung der Arbeit.....	24
2 Ergebnisse	26
2.1 Etablierung von Nährmedien zur Markierung von <i>Arabidopsis</i> -Keimlingen mit isotopem Schwefel	26
2.2 Extraktion von Schwefelmetaboliten und deren Analyse mit Ionenzyklotronresonanz Fouriertransformations Massenspektrometrie.....	38
2.3 Identifikation, Charakterisierung und Verifizierung von Schwefelmetaboliten auf Basis massenspektrometrischer Daten.....	47
2.3.1 <i>Open-source</i> -Datenbanken	47
2.3.2 Schwefelbiomarker in <i>Arabidopsis thaliana</i>	50
2.3.3 Massenspektren basierte Identifikation unbekannter Schwefelmassen ..	56
2.4 Vergleichende Analyse des Schwefelmetaboloms in <i>Arabidopsis</i>	65
2.4.1 Differentieller Schwefelmetabolismus in <i>Arabidopsis</i> -Ökotypen.....	67
2.4.2 <i>Loss-of-function</i> Mutationen im primären Schwefelmetabolismus.....	71
2.4.2.1 ATP-Sulfurylasen.....	71

VERZEICHNISSE

2.4.2.2 Adenosin-Phosphosulfat-Reduktasen.....	74
2.4.2.3 Adenosin-Phosphosulfat-Kinasen	76
2.4.3 <i>Loss-of-function</i> Mutationen im Glutathion-assoziierten Metabolismus ...	86
2.4.3.1 γ -Glutamyltransferasen.....	86
2.4.3.2 Phytochelatinsynthesen.....	96
2.4.4 <i>Loss-of-function</i> Mutationen in der Glucosinolatbiosynthese.....	103
2.4.4.1 P450 Zytochrome der Glucosinolatbiosynthese	104
3 Diskussion	112
3.1 ICR-FT/MS für metabolische Studien	113
3.2 Biodiversität und Genfunktionen im Schwefelmetabolismus.....	115
3.2.1 Reduzierte Schwefelassimilation führt zu geringerer Bereitstellung von PAPS für Sulfatierungsreaktionen	119
3.2.2 Geringe PAPS-Verfügbarkeit kann zu einer Desulfatierung von Sulfo- Verbindungen führen	121
3.2.3 APK1 hat eine spezifische Funktion	124
3.2.4 In <i>Arabidopsis</i> gibt es nicht charakterisierte Glucosinolate und Phytoalexine	126
3.3 Das Schwefelmetabolom von <i>Arabidopsis thaliana</i>	130
4 Material und Methoden.....	137
4.1 Verwendete Materialien.....	137
4.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel.....	137
4.1.2 Enzyme und Größenstandards zur Analyse von Nukleinsäuren	137
4.1.3 Oligonukleotide.....	137
4.1.4 Geräte	138
4.1.5 Pflanzenmaterial.....	138
4.1.6 Nährmedien	140
4.2 Verwendete Methoden.....	141
4.2.1 Anzucht von <i>Arabidopsis</i> -Keimlingen	141
4.2.2 <i>Arabidopsis</i> -Suspensionszellkultur	141
4.2.3 Isolation von genomischer DNA aus Pflanzenmaterial	141
4.2.4 Amplifikation von DNA-Fragmenten.....	142
4.2.5 Isolation von RNA aus Pflanzenmaterial	144
4.2.6 cDNA Synthese von pflanzlicher RNA mittel reverser Transkriptase	144
4.2.7 Semiquantitative RT-PCR	144

VERZEICHNISSE

4.2.8 Agarose-Gelelektrophorese.....	144
4.2.9 Synthese von Natriumsulfat.....	145
4.2.10 Markierung von <i>Arabidopsis</i> mit stabilem, isotopem Schwefel.....	145
4.2.10.1 Keimlinge.....	145
4.2.10.2 Suspensionszellkultur.....	146
4.2.11 Bestimmung des Wurzelwachstums von Keimlingen.....	146
4.2.12 Bestimmung des Photopigmentgehalts in Keimlingen.....	147
4.2.13 Bestimmung des Gesamtthiolgehalts in Keimlingen.....	147
4.2.14 Metabolitextraktion aus <i>Arabidopsis</i> -Keimlingen.....	148
4.2.15 DI-ICR-FT/MS Analytik.....	148
4.2.16 Annotation massenspektrometrischer Daten mit bekannten Schwefelmetaboliten.....	149
4.2.17 Identifikation von Schwefelmassen in massenspektrometrischen Daten	150
4.2.18 Vergleichende Analysen des Schwefelmetaboloms durch hierarchische Clusteranalyse.....	150
4.2.19 Annotation organischer, molekularer Kompositionen zu Schwefelkandidatenmassen.....	152
4.2.20 MS/MS-Fragmentierung.....	152
4.2.21 Enzymatische Analyse von γ -Glutamylgruppen.....	153
4.2.22 Behandlung von <i>Arabidopsis</i> -Keimlingen mit GGT-Inhibitoren.....	153
4.2.23 Belastung von <i>Arabidopsis</i> -Keimlingen mit Cadmiumnitrat.....	153
4.2.24 Verwendete Datenbanken und Online-Ressourcen.....	154
5 Zusammenfassung.....	155
6 Summary.....	157
7 Literatur.....	159
8 Anhang.....	194
Danksagung.....	283

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Redoxnetzwerk der Oxidationsstufen des Schwefels.	2
Abbildung 1.2 Reduktive Sulfatassimilation und Metabolisierung.....	4
Abbildung 1.3 Struktur von GSH und häufigen Analoga.....	8
Abbildung 1.4 Abbau von Glutathionkonjugaten.....	13
Abbildung 1.5 Biosynthese von Glucosinolaten.....	15
Abbildung 1.6 Abbau von Glucosinolaten.....	16
Abbildung 1.7 Spezialisierte Schwefelmetaboliten in Pflanzen	16
Abbildung 1.8 Massenspektrum der stabilen Isotope einer organischen Verbindung.....	22
Abbildung 2.1 Wachstum von <i>Arabidopsis</i> -Zellkultur in modifiziertem Anzuchtmedium.	29
Abbildung 2.2 Bestimmung des Schwefelmangels in <i>Arabidopsis</i> -Keimlingen.	30
Abbildung 2.3 Einfluss des Nährsalzgehalts im Anzuchtmedium auf die Entwicklung von <i>Arabidopsis</i> -Keimlingen.....	31
Abbildung 2.4 Einfluss des Nährsalzgehalts im Anzuchtmedium auf den Schwefelhaushalt von <i>Arabidopsis</i> -Keimlingen.....	32
Abbildung 2.5 Einfluss unterschiedlicher Sulfatkonzentration im Anzuchtmedium auf den Schwefelhaushalt von <i>Arabidopsis</i> -Keimlingen.....	33
Abbildung 2.6 Einfluss des Nährsalzgehalts im Anzuchtmedium auf den Salzgehalt der Extrakte zur ICR-FT/MS-Analyse.	34
Abbildung 2.7 Quantitative Analyse von Schwefelmetaboliten mittels ICR- FT/MS.	36
Abbildung 2.8 Effizienz der ³⁴ S-Isotopenmarkierung in <i>Arabidopsis</i> -Keimlingen.	37
Abbildung 2.9 Extraktion von Schwefelmetaboliten aus <i>Arabidopsis</i> -Zellkultur und Keimlingen.	40
Abbildung 2.10 Extraktionseffizienz von Schwefelmetaboliten.	40
Abbildung 2.11 Fraktionierte Extraktion von Schwefelmetaboliten mit Chloroform.	42
Abbildung 2.12 Optimierung der Messparameter zur ICR-FT/MS- Analyse	43
Abbildung 2.13 Detektion von Schwefelmetaboliten in Rohextrakten von <i>Arabidopsis</i> -Keimlingen.	45

VERZEICHNISSE

Abbildung 2.14 Isotopenverhältnis von Schwefelmetaboliten in ^{32}S - und ^{34}S -markierten <i>Arabidopsis</i> -Keimlingen	46
Abbildung 2.15 Hierarchische Clusteranalyse reproduzierbarer Massen in Keimlingsextrakten.....	57
Abbildung 2.16 Identifikation von Schwefelmassen in Keimlingsextrakten von <i>Arabidopsis</i>	61
Abbildung 2.17 Varianz bekannter Schwefelmetaboliten in den analysierten <i>Arabidopsis</i> Mutanten und dem Ökotyp Ler-0 in Relation zum Wildtyp Col-0.....	66
Abbildung 2.18 Die spezifischen Funktionen der 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxigenasen in <i>Arabidopsis thaliana</i>	68
Abbildung 2.19 Natürliche Variabilität bekannter Schwefelmetaboliten in den <i>Arabidopsis</i> -Ökotypen Columbia und Landsberg.....	69
Abbildung 2.20 Veränderte Schwefelmetabolitabundanz des <i>Arabidopsis</i> -Ökotyps Landsberg gegenüber Columbia.....	70
Abbildung 2.21 Struktur von Isobutylglucosinolat	70
Abbildung 2.22 Variabilität bekannter Schwefelmetaboliten in Abhängigkeit von der Aktivität der ATP-Sulfurylasen	72
Abbildung 2.23 Veränderte Schwefelmetabolitabundanz in <i>atps1</i>	73
Abbildung 2.24 Variabilität bekannter Schwefelmetaboliten in Abhängigkeit von der Aktivität der APS-Reduktasen.....	75
Abbildung 2.25 Variabilität bekannter Schwefelmetaboliten in Abhängigkeit von der Aktivität der APS-Kinasen.....	77
Abbildung 2.26 Veränderte Schwefelmetabolitabundanz in Mutanten der APS-Kinasen	77
Abbildung 2.27 Variabilität bekannter Schwefelmetaboliten bei multipltem Aktivitätsverlust von APS-Kinasen	80
Abbildung 2.28 Veränderte Schwefelmetabolitabundanz in multiplen Mutanten der APS-Kinasen	81
Abbildung 2.29 Akkumulation von Desulfoglucosinolaten in Mutanten der APS-Kinasen.....	82
Abbildung 2.30 Einfluss von fehlender APK-Aktivität auf die Sulfatierung von Metaboliten im Jasmonsäuremetabolismus	84

VERZEICHNISSE

Abbildung 2.31 Variabilität bekannter Schwefelmetaboliten in Abhängigkeit von der Aktivität der γ -Glutamyltransferasen	88
Abbildung 2.32 Veränderte Schwefelmetabolitabundanz in ggt4-1	89
Abbildung 2.33 Analyse spezifisch akkumulierter Schwefelmetaboliten in ggt4-1	91
Abbildung 2.34 Heterolytische Bindungsspaltung durch MS/MS-Fragmentierung	92
Abbildung 2.35 Putative Glutathionkonjugate mit veränderter Abundanz in ggt4	93
Abbildung 2.36 Struktur endogener Cysteinkonjugate	93
Abbildung 2.37 Molekülstruktur von γ -Glutamyltransferasesubstraten und Inhibitoren	94
Abbildung 2.38 Einfluss von spezifischen GGT-Inhibitoren auf die Vitalität von <i>Arabidopsis</i> -Keimlingen des Ökotyps Landsberg.....	95
Abbildung 2.39 Analyse des Inhibitor-induzierten Chemotyps im Vergleich zu ggt4-1	96
Abbildung 2.40 Variabilität bekannter Schwefelmetaboliten in Abhängigkeit der Aktivität von Phytochelatinsynthasen	97
Abbildung 2.41 Veränderte Abundanz von Schwefelmetaboliten in der Δ PCS-Mutante	99
Abbildung 2.42 Veränderte Schwefelmetabolitabundanz in Δ PCS bei Cadmiumexposition.....	99
Abbildung 2.43 Variabilität bekannter Schwefelmetaboliten in Abhängigkeit von kombiniertem Aktivitätsverlust der Phytochelatinsynthasen und GGTs	101
Abbildung 2.44 Veränderte Schwefelmetabolitabundanz bei kombiniertem Aktivitätsverlust der Phytochelatinsynthasen und GGTs.....	103
Abbildung 2.45 Variabilität bekannter Schwefelmetaboliten in Abhängigkeit vom Aktivitätsverlust der P450 Zytochrome der Indolglucosinolatbiosynthese	105
Abbildung 2.46 Veränderte Schwefelmetabolitabundanz in <i>cyp79B2xcyp79B3</i>	105
Abbildung 2.47 Fragmentierungsanalyse spezifisch akkumulierter Schwefelmetaboliten in <i>cyp79B2xcyp79B3</i>	107

VERZEICHNISSE

Abbildung 2.48 Struktur von Resveratrolglucosiden.....	107
Abbildung 2.49 Schema der Camalexinbiosynthese	109
Abbildung 2.50 Einfluss von fehlender Aktivität von CYP79B2 und CYP79B3 auf schwefelfreie Metaboliten.....	110
Abbildung 3.1 Einfluss des Funktionsverlusts von GGT4 auf den Abbau von Glutathionkonjugaten	118
Abbildung 3.2 Veränderter Schwefelfluss durch Funktionsverlust von APTS1120	
Abbildung 3.3 Hypothetische Remobilisierung von PAPS durch APR-Aktivität	122
Abbildung 3.4 Desulfatierung von Glucosinolaten bei reduzierter PAPS- Verfügbarkeit.....	123
Abbildung 3.5 Kandidaten für Glucosinolate in <i>Arabidopsis</i>	127
Abbildung 3.6 Synthese von Metaboliten der Pathogenabwehr in <i>Arabidopsis</i>	128
Abbildung 3.7 Fragmentierung eines Resveratrol-O-glucosids	129
Abbildung 3.8 Das Metabolom von <i>Arabidopsis thaliana</i>	132
Abbildung 3.9 Einflüsse auf das Metabolom und dessen Analyse	134

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Mineralnährsalzmedien zur Kultivierung von Pflanzen	28
Tabelle 2.2 Massenberechnung der Addukte von Schwefelmetaboliten bei negativer Ionisierung	52
Tabelle 2.3 Massenberechnung der Addukte von Schwefelmetaboliten bei positiver Ionisierung	53
Tabelle 2.4 Annotierte Schwefelbiomarker in <i>Arabidopsis</i> -Extrakten bei negativer Ionisierung	55
Tabelle 2.5 Annotierte Schwefelbiomarker in <i>Arabidopsis</i> -Extrakten bei positiver Ionisierung	56
Tabelle 2.6 Verifizierte Schwefelmassen aus <i>Arabidopsis thaliana</i> mit zugeordneten Summenformeln (< 5 ppm) bei negativer Ionisierung.	63
Tabelle 2.7 Verifizierte Schwefelmassen aus <i>Arabidopsis thaliana</i> mit zugeordneten Summenformeln (< 5 ppm) bei positiver Ionisierung.	64
Tabelle 3.1 Vergleich unterschiedlicher Schwefelmetabolomstudien polarer Metaboliten	136
Tabelle 4.1 Verwendete Geräte	138
Tabelle 4.2 Verwendete Pflanzenlinien	139
Tabelle 4.3 Zusammensetzung von Murashige-Skoog-Vollmedium	140
Tabelle 4.4 Allgemeiner PCR-Ansatz für KAPA3G-DNA-Polymerase	142
Tabelle 4.5 Allgemeiner PCR-Ansatz für GoTaq-DNA-Polymerase	142
Tabelle 4.6 Allgemeines PCR-Protokoll für die Verwendung mit der KAPA3G- DNA-Polymerase	143
Tabelle 4.7 Allgemeines PCR-Protokoll für die Verwendung mit der GoTaq- DNA-Polymerase	143

Formelverzeichnis

Formel 2.1 Auswahl der ^{32}S -Signale putativer Schwefelmassen.....	59/150
Formel 2.2 Verifikation der Isotopenmassenverschiebung durch ^{34}S	59/150
Formel 4.1 Berechnung des Gehalts an Chlorophyll a	147
Formel 4.2 Berechnung des Gehalts an Chlorophyll b	147
Formel 4.3 Berechnung des Gehalts an Carotinoiden.....	147
Formel 4.4 Standardisierung der Matrix	151
Formel 4.5 Durchschnittlicher Abstand nach UPGMA.....	151
Formel 4.6 Euklidische Abstand	151
Formel 4.7 Pearsonsche Korrelation	152

Abkürzungen

2PE	2-Phenethylglucosinolat (Gluconasturtiin)
3MOSOP	3-Methylsulfinylpropylglucosinolat (Glucoiberin)
3MTP	3-Methylthiopropylglucosinolat (Glucoibererin)
4MSOB	4-Methylsulfinylbutylglucosinolat (Glucoraphanin)
4MTB	4-Methylthiobutylglucosinolat (Glucoerucin)
5MSP	5-Methylsulfinylpentylglucosinolat (Glucoalyssin)
5MTP	5-Methylthiopentylglucosinolat (Glucoberteroin)
6MSOH	6-Methylsulfinylhexylglucosinolat (Glucohesperin)
6MTH	6-Methylthiohexylglucosinolat (Glucolesquerellerin)
7MSH	7-Methylsulfinylheptylglucosinolat (Glucoibarin)
7MTH	7-Methylthioheptylglucosinolat
8MSOO	8-Methylsulfinyloctylglucosinolat (Glucohirsutin)
8MTO	8-methylthiooctylglucosinolat
amu	Atomare Masseeinheiten (<i>atomic mass units</i>)
AOP	<i>alkenyl hydroxyalkyl producing</i>
APK	APS-Kinase
APR	APS-Reduktasen
APS	Adenosinphosphosulfat
APX	Ascorbatperoxidase
ATP	Adenosintriphosphat
ATPS	ATP-Sulfurylasen
Bay-0	Ökotyp Bayreuth
BG	Benzylglucosinolat
CAT	Katalase (<i>catalase</i>)
CE	Kapillarelektrophorese (<i>capillary electrophoresis</i>)
CoA	Coenzym A
Col-0	Ökotyp Columbia
C-Terminus	Carboxyterminus
CYP	Zytochrom (<i>cytochrome</i>) P450
DHCA	Dihydrocamalexinsäure (<i>dihydrocamalexic acid</i>)
DI	Direktinjektion
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DON	6-Diazo-5-oxo-L-norleucin

VERZEICHNISSE

ESI	Elektrosprayionisation
eV	Elektronenvolt
FI	Fließinjektion
FT	Fouriertransformation
GC	Gaschromatographie
γ EC	γ -Glutamylcystein
GGP	γ -Glutamylpeptidase
GGT	γ -Glutamyltransferasen
Glc	Glucose
GR	Glutathionreduktase
GSH	Glutathion
GSH1	γ -Glutamylcysteinyl-Synthetase
GSH2	Glutathion-Synthetase
GS-OX	Glucosinolat S-Oxygenase
GSSG	Glutathiondisulfid
GST	Glutathiontransferase
h	Stunde (<i>hora</i>)
HCA	hierarchische Clusteranalyse
I3M	3-Indolylmethylglucosinolat (Glucobrassicin)
IAN	Indol-3-acetonitril
IAOx	Indole-3-acetaldomixe
JA	Jasmonsäure (<i>jasmonic acid</i>)
ICR	Ionenzyklotronresonanz (<i>ion cyclotron resonance</i>)
LC	Flüssigchromatographie (<i>liquid chromatography</i>)
Ler-0	Ökotyp Landsberg
m	Masse
min	Minute
MOI3M	Methoxy-3-indolylmethylglucosinolat (Methoxyglucobrassicin)
MS	Massenspektrometrie
M-S	Murashige und Skoog
NAA	Naphthylelessigsäure
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NMR	Kernspinresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
N-Terminus	Aminoterminus

VERZEICHNISSE

OAS	O-Acetylserin
OASTL	O-Acetylserin-Thiolyase
O-Glc-JA	Hydroxyjasmonsäure-O-Glykosid
OHIMG	Hydroxy-3-indolylmethylglucosinolat (Hydroxyglucobrassicin)
OHJA	hydroxy-jasmonic acid Hydroxyjasmonsäure
OPDA	Oxophytodiensäure (<i>oxophytodienoic acid</i>)
PAN	Pantethein
PAPS	Phosphoadenosin-Phosphosulfat
PC	Phytochelatine
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PCS	Phytochelatinsynthase
ppm	10^{-6} (<i>parts per million</i>)
RHC	S-Ribosylhomocystein
RNA	RNA Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
RT	reverse Transkriptase
S	Schwefel
s	Sekunde
SAM	S-Adenosylmethionin
SAT	Serin-Acetyltransferase
SE	substanzielle Äquivalenz (<i>substantial equivalence</i>)
Sha	Ökotyp Shahdara
SiR	Sulfitreduktase
SULTR	Sulfattransporter
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
T-DNA	Transfer-DNA
u	<i>units</i> (Einheit der Enzymaktivität)
UDP	Uridindiphosphat
UGT	UDP-Glucosyltransferase
upm	Umdrehungen pro Minute
WS	Ökotyp Wassilewskija
z	Ladungszahl

1 Einleitung

1.1 Schwefel und seine Verbindungen

Schwefel ist allgegenwärtig, er durchläuft einen natürlichen Kreislauf zwischen seiner zumeist oxidierten, anorganische Form in Atmosphäre, Boden Gewässern und den Organismen, welche den anorganischen Schwefel assimilieren, reduzieren, verwerten und aus deren Biomasse wieder anorganisches Sulfat regeneriert werden kann (Takahashi *et al.*, 2011). Schwefel stellt ein essentielles Nährelement für alle Lebensformen dar. Die Rolle des Schwefels ist nicht maßgeblich strukturbildender Natur, sondern vorwiegend durch die Etablierung katalytischer und elektrochemischer Interaktionen schwefelhaltiger Moleküle geprägt (Leustek *et al.*, 2000). Aufgrund seiner biochemischen Eigenschaften bildet Schwefel *in vivo* ein umfassendes Netzwerk redoxaktiver Schwefelspezies. Hierbei kann der Schwefel in den Oxidationsstufen von -2, als Thiolgruppe bis +6, als freies Sulfat vorliegen (Jacob Claus 2006) (Abbildung 1.1). Die von Schwefelverbindungen vermittelten Eigenschaften und Reaktionen umfassen neben Redoxaktivität auch nukleophile Substitution, Bindung von Metallen, Erzeugung von Radikalen und elektrostatische Wechselwirkungen. Diese Variabilität der Schwefelverbindungen macht sie zum Ziel pharmakologischer Forschung, wo sie Anwendung in Behandlungsansätzen von z.B. Schwermetallentgiftung, Krebs, Amyloidose und Nephropathie finden (Fishbane *et al.*, 2004; Blanusa *et al.*, 2005; Tucker *et al.*, 2005; Pappa *et al.*, 2006).

1.1.1 Primäre Schwefelassimilation

Der Weg der Schwefelassimilation wurde erstmals für *Escherichia coli* und *Salmonella thyphimurium* beschrieben und nachgewiesen (Jones-Mortimer 1968; Kredich 1971). Es wurde gezeigt, dass chemisch inertes Sulfat durch Adenylierung aktiviert wird um Adenosinphosphosulfat (APS) zu bilden. Durch erneute Phosphorylierung wird Phosphoadenosinphosphosulfat (PAPS) erzeugt, welches Thioredoxin-abhängig zu Sulfit reduziert werden kann. In einer NADPH-abhängigen Reaktion erfolgt die Reduktion zu Sulfid, welches schließlich mit O-Acetylserin Cystein bildet. Cystein ist das zentrale Produkt der

reduktiven Schwefelassimilation, welches außerdem ein wichtiges Intermediat für die Synthese der meisten Schwefelmetaboliten darstellt (Leustek *et al.*, 2000; Hell und Wirtz 2011). Neben den schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin und ihrer Funktion in Proteine und Peptiden, ist Schwefel in Thiolen, prosthetischen Gruppen, Vitaminen und Co-Faktoren präsent (Foyer und Noctor 2009; Kopriva *et al.*, 2009). Darüber hinaus hat Schwefel Funktion in der Regulation von Hormonen durch Sulfatierung, wie bei Jasmonsäure und Brassinosteroid (Matsubayashi und Sakagami 1996; Gidda *et al.*, 2003; Amano *et al.*, 2007; Marsolais *et al.*, 2007).

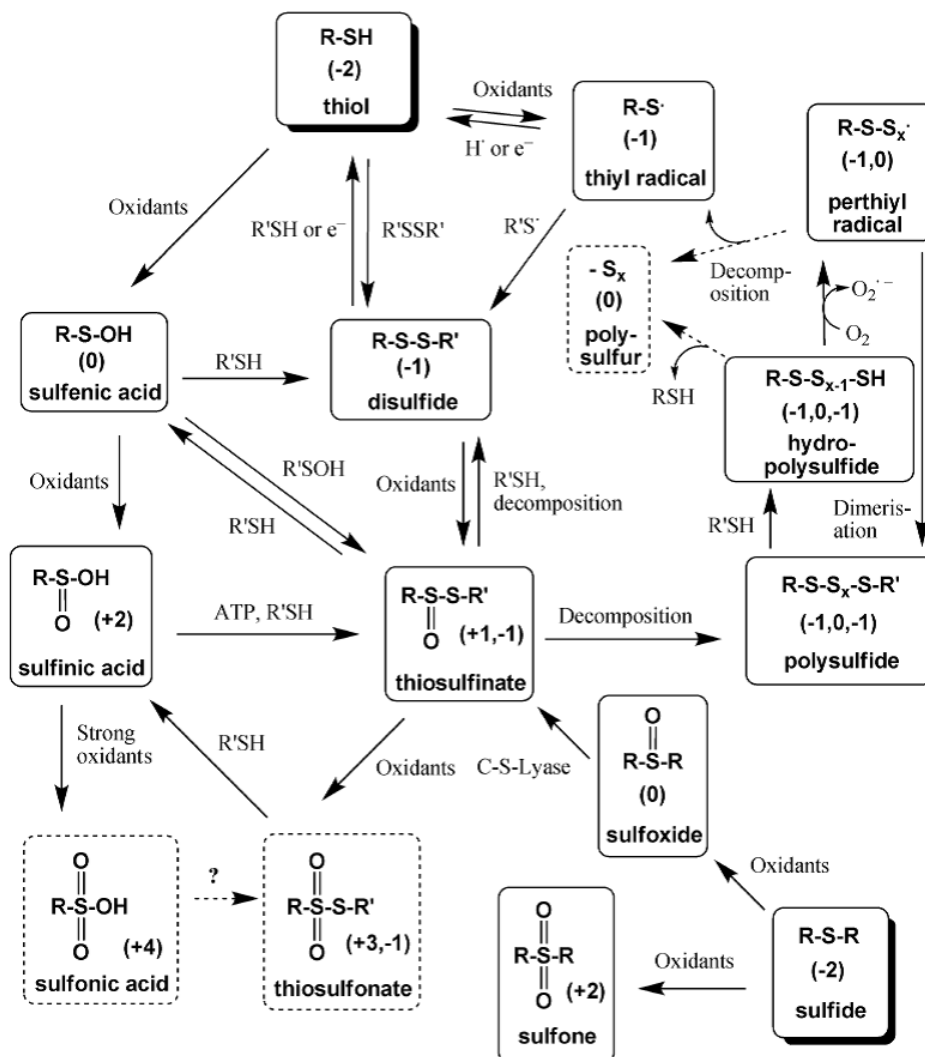


Abbildung 1.1 Redoxnetzwerk der Oxidationsstufen des Schwefels.

Der Schwefel erfüllt in Organismen eine Vielzahl von Aufgaben, die zumeist mit seiner Redoxreaktivität verknüpft sind. Gezeigt werden die möglichen Oxidationsstufen, welche der Schwefel *in vivo* durchläuft und die damit assoziierten Reaktionen.

Reproduced from Jacob Claus 2006 with permission of the Royal Society of Chemistry.

Pflanzen sind die Primärproduzenten schwefelhaltiger Aminosäuren. Obgleich Schwefel in Pflanzen das am wenigsten abundante Makroelement mit durchschnittlich 0,5 % Anteil an der Trockenmasse ist, bilden Pflanzen eine Vielzahl an charakteristischen Schwefelmetaboliten (Romero *et al.*, 2014). Sie sind als Sulfolipide Bestandteile ihrer Membranen und Zellwände (Popper *et al.*, 2011; Benning 1998). Darüber hinaus bilden die Familien der *Brassicaceae*n und *Alliaceae*n die schwefelhaltigen, spezialisierten Metaboliten Glucosinolate und Alliine, welche Teil der Abwehr gegenüber Pathogenen und Fraßfeinden sind (Halkier und Gershenzon 2006; Jones *et al.*, 2004). Lange wurde angenommen, dass die reduktive Schwefelassimilation in Pflanzen analog zu dem beschriebenen Weg in Mikroorganismen abläuft. Studien mit Grünalgen lieferten erste Hinweise, dass Sulfid in photosynthetischen Organismen nicht durch die Reduktion von PAPS sondern von APS erzeugt wird (Schmidt 1972). Seitdem wurden die einzelnen Schritte der reduktiven Schwefelassimilation in Pflanzen auf biochemischer und genetischer Ebene charakterisiert, unterstützt durch die zunehmende Verfügbarkeit genomischer Sequenzen (Takahashi *et al.*, 2011). Die gegenwärtig gültige Auffassung des primären Schwefelmetabolismus in Pflanzen ist in Abbildung 1.2 zusammengefasst. Wenngleich Pflanzen in der Lage sind unterschiedlichste Schwefelverbindungen, wie Schwefeldioxid oder Hydrogensulfid als Schwefelquelle zu nutzen, ist doch anorganisches Sulfat die Hauptressource (Leustek *et al.*, 2000). Die Sulfataufnahme über die Plasmamembran wird unterstützt durch membran-gebundene Transporter, die den Co-Transport von Protonen nutzen um das Membranpotential zu überwinden (Lass und Ullrich-Eberius 1984; Smith *et al.*, 1995). Für *Arabidopsis* sind 14 Sulfattransporter (SULTR) beschrieben, welche in 5 Gruppen, in Abhängigkeit von Sequenz, biochemischen Eigenschaften und physiologischer Funktion eingeteilt werden (Hawkesford 2003; Buchner *et al.*, 2004; Takahashi 2010). Unlängst wurde erstmals ein Chloroplasten-lokalisierter Transporter charakterisiert, welcher an der Bereitstellung von Sulfat im Chloroplasten beteiligt ist (Cao *et al.*, 2013). Durch das niedrige Reduktionspotential des aufgenommenen Sulfats wird es in einer ATP-abhängigen Reaktion aktiviert (Schmidt und Jäger 1992). Die Adenylierung des Sulfats zu APS wird durch ATP-Sulfurylasen (ATPS, EC 2.7.7.4) katalysiert. Da das Gleichgewicht der Reaktion stark auf der Seite des ATPs liegt, werden die

Konzentrationen der Produkte durch einen hohen Fluss der Metabolisierung und durch Hydrolyse des gebildeten Pyrophosphats mittels anorganischer Pyrophosphatase gering gehalten (Kopriva *et al.*, 2009).

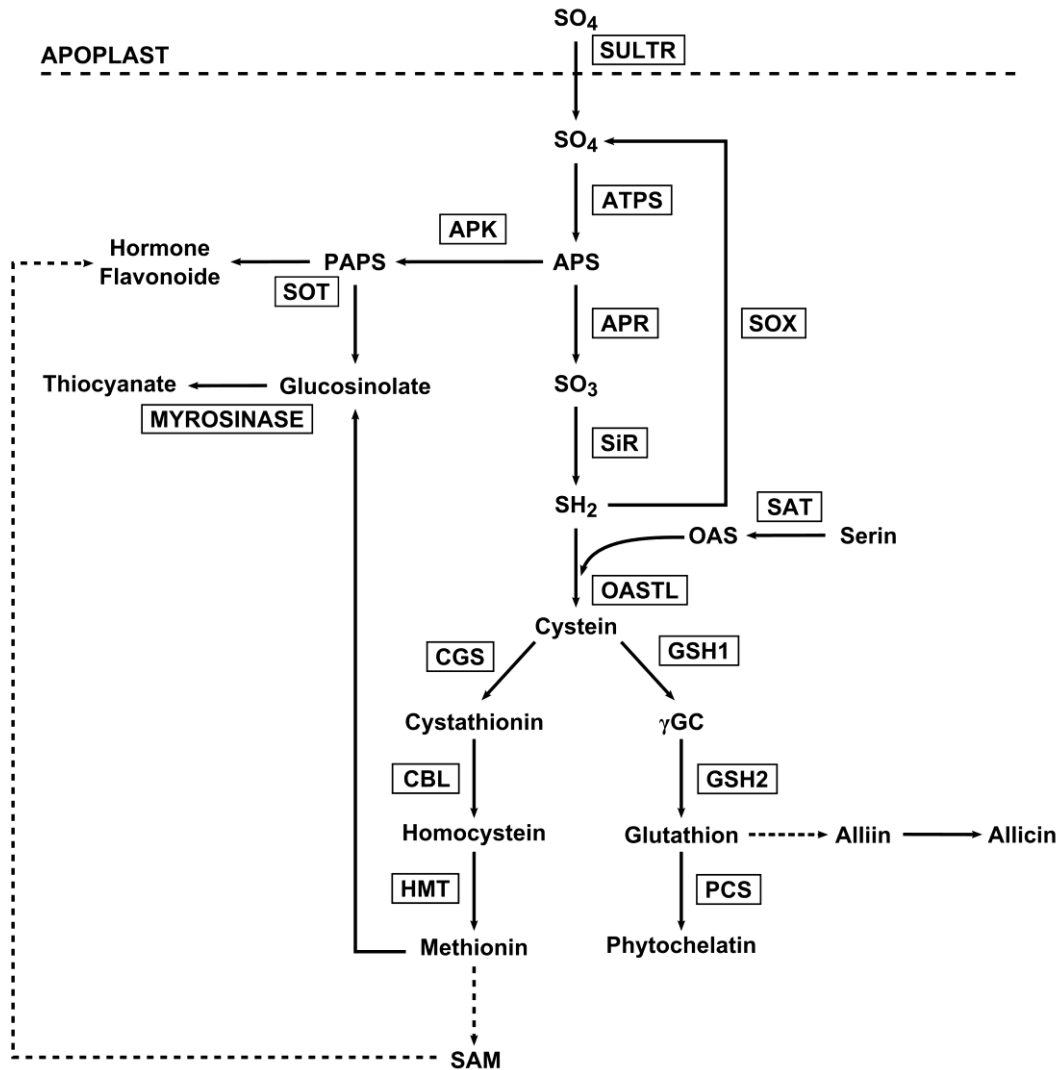


Abbildung 1.2 Reduktive Sulfatassimilation und Metabolisierung

Nach Aufnahme des löslichen Sulfats aus dem Boden durch Sulfattransporter (SULTR) wird es durch die ATP-Sulfurylase (ATPS) mittels ATP aktiviert um Adenosinphosphosulfat (APS) darzustellen. APS wird durch die APS-Reduktase (APR) zunächst zu Sulfid und anschließend mittels Sulfidreduktase (SiR) zu Sulfid reduziert. Die O-Acetylserin-Thiolyase (OASTL) vermittelt die Reaktion von O-Acetylserin und Sulfid zu Cysteine. Cysteine bildet die Vorstufe der meisten Schwefelmetaboliten in Pflanzen. Alternativ kann APS durch die APK-Kinase (APK) erneut phosphoryliert werden um PAPS bereitzustellen, welchen das Substrat für Sulfatierungsreaktionen von beispielsweise Glucosinolaten und Hormonen bildet (Sulfotransferasen – SOT). Weitere im Schwefelmetabolismus involvierte Enzyme: Serinacetyltransferase (SAT), γ -Glutamylcysteinyl-Synthetase (GSH1), Glutathion-Synthetase (GSH2), Phytochelatinsynthase (PCS), Cystathionin- γ -Synthase (CGS), Cystathionin- β -Lyase (CBL), Homocysteinmethyltransferase (HMT), Sulfinoxidase (SOX)

Für *Arabidopsis* wurden vier Plastiden-lokalisierte Isoformen der ATPS beschrieben (Leustek *et al.*, 1994; Murillo und Leustek 1995; Hatzfeld *et al.*, 2000). Demgegenüber ist in Pflanzen auch cytosolisch lokalisierte ATPS-Aktivität bekannt, wie für Spinat (*Spinacia oleracea*) und Kartoffel (*Solanum tuberosum*) (Lunn *et al.*, 1990; Renosto *et al.*, 1993; Klonus *et al.*, 1994; Rotte und Leustek 2000). Die Reduktion von Sulfat über die Zwischenstufe APS findet dennoch in allen Pflanzen ausschließlich in den Chloroplasten statt. Die Reaktion wird durch APS-Reduktasen (APR, EC 1.8.99.2) katalysiert, welche eine Schlüsselrolle in der Regulation der Sulfatassimilation spielen (Vauclare *et al.*, 2002; Kopriva und Koprivova 2004; Koprivova *et al.*, 2008). Die APRs wurden über eine deutliche Homologie mit den PAPS-Reduktasen in *Escherichia coli* und ihrer Fähigkeit zur funktionalen Komplementation der PAPS-Reduktaseaktivität identifiziert (Gutierrez-Marcos *et al.*, 1996). Der maßgebliche Unterschied zwischen den PAPS-Reduktasen von Mikroorganismen und den pflanzlichen APRs sind zwei Cysteinpaare im N-Terminus der APRs, welche einen Eisen-Schwefel-Cluster als Cofaktor binden (Kopriva *et al.*, 2001). APRs sind aus einer aminoterminalen Reduktase-Domäne und einer carboxyterminalen Thioredoxin/Glutaredoxin-ähnlichen Domäne aufgebaut. Die zur Reduktion von APS zu Sulfit benötigten Elektronen werden mittels der Glutaredoxinaktivität durch die Oxidation von Glutathion rekrutiert (Bick *et al.*, 1998; Suter *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2005). Schließlich wird Sulfit in einer Ferredoxin/NADPH-abhängigen Reaktion mittels Sulfitreduktase (SiR, EC 1.8.1.2) zu Sulfid konvertiert. Die SiR tritt als Homooligomer auf, dessen Untereinheiten jeweils Sirohäm und Eisen-Schwefel-Cluster als Cofaktoren binden (Leustek 2002). Sie weist eine hohe Sequenz- und Strukturhomologie zur Nitritreduktase auf, welche vermuten lässt, dass beide Gene aus einem Duplikationsereignis resultieren (Patron *et al.*, 2008). In *Arabidopsis* codiert lediglich ein einziges Gen für SiR, daher ist der Funktionsverlust letal (Khan *et al.*, 2010). Die endgültige Assimilation des Sulfats wird mit der Bildung von Cystein durch die Etablierung des Schwefels im Aminosäuregerüst abgeschlossen. Hierzu reagiert Sulfid mit O-Acetylserin (OAS), welches durch die Coenzym-A-abhängige Acetylierung von Serin gebildet wurde (Leustek 2002). Die Reaktion wird vermittelt durch die O-Acetylserin-Thiolyase (OASTL, EC 2.5.1.47), welche mit der Serin-Acetyltransferase (SAT, EC 2.3.1.30), die

OAS bildet, gemeinsam als Heterooligomer vorliegt. Dieser Komplex wird als Cysteinsynthase beschrieben (Romero *et al.*, 2014). In *Arabidopsis* sind die SATs mit 5 Isoformen und die OASTLs mit 9 Isoformen vertreten, welche spezifisch an der Bereitstellung unterschiedlicher subzellulärer Cysteinspeicher in Cytosol, Plastiden und Mitochondrien beteiligt sind (Jost *et al.*, 2000; Howarth *et al.*, 2003; Heeg *et al.*, 2008; Watanabe *et al.*, 2008; Romero *et al.*, 2014). Cystein ist ein wichtiges Produkt und Intermediat in der Metabolisierung von Sulfat. Die Bedeutung von Cystein und seinen Reaktionen wird vor allem durch die Thiolgruppe vermittelt. Aufgrund ihrer hohen Redoxreaktivität strebt sie die Bildung von Disulfidbrücken an, welche stabilisierende und strukturbildende Funktion in der Proteinfaltung haben (Haag *et al.*, 2012). Außerdem fungieren Disulfidbrücken als Redoxregulationsmechanismus für Enzymfunktionen oder die Katalyse enzymatischer Reaktionen (Buchanan und Balmer 2005; Richau *et al.*, 2012). Ausgehend von Cystein wird in Pflanzen eine Vielfalt von Schwefel-metaboliten gebildet, welche in zelluläre Mechanismen der Signaltransduktion, Abwehr und Homöostase involviert sind. Darunter Methionin, Glutathion, Glucosinolate, Alliine, Phytoalexine und Hydrogensulfid (Rausch und Wachter 2005; Calderwood und Kopriva 2014).

1.1.2 Methionin

Durch die Übertragung der Thiolgruppe des Cysteins auf Homoserin, wird über die Zwischenstufen Cystathionin und Homocystein, Methionin gebildet. Neben seiner proteinogenen Funktion ist Methionin Vorstufe von S-Adenosylmethionin (SAM), welches die Regulation von Genexpression durch DNA-Methylierung und die Synthese des Phytohormons Ethylen vermittelt (Bleecker und Kende 2000; Amir 2010; Sauter *et al.*, 2013). In *Arabidopsis* unterliegt die Synthese von Methionin einer Regulation der beteiligten Enzyme, wie der Cystathionin- γ -Synthase (EC 2.5.1.48), durch die Endprodukte Methionin und SAM (Giovanelli *et al.*, 1985; Kim und Leustek 2000; Chiba *et al.*, 2003). SAM ist neben ATP einer der meist verbrauchten Cofaktoren. 80 % des metabolisierten Methionins werden zu SAM konvertiert und in Methylierungsreaktionen von Nucleinsäuren, Proteinen und Phospholipiden sowie der Polyaminsynthese benötigt. Demgegenüber werden lediglich 20 % zur Proteinbiosynthese eingesetzt (Lu 2000; Jander und Joshi 2009).

1.1.3 Glutathion

Das Tripeptid Glutathion (GSH) ist aufgebaut aus den Aminosäuren Glutaminsäure, Cysteine und Glycin. Charakteristisch ist die Bindung der Glutaminsäure über die γ -Carboxylgruppe an das Cystein, welche sich von der α -Carboxyl-Peptidbindung in Proteinen unterscheidet (May *et al.*, 1998; Noctor *et al.*, 2011). Glutathion oder seine homologen Formen, welche Glycin durch andere Aminosäuren substituieren, können in allen aeroben Organismen gefunden werden (Fahey 2001) (Abbildung 1.3). Beispielsweise wird in Leguminosen neben GSH Homoglutathion gebildet, welches β -Alanin anstelle von Glycin bindet (Frendo *et al.*, 2001). Des Weiteren wurden Derivate mit Serin, in Getreiden und Glutaminsäure in Mais beschrieben (Klapheck *et al.*, 1992; Meuwly *et al.*, 1993). Die Biosynthese von GSH in Pflanzen erfolgt aus den Aminosäuren Glutaminsäure, Cysteine und Glycin in zwei ATP-abhängigen, enzymatischen Reaktionen vermittelt durch die γ -Glutamylcysteinyl-Synthetase (GSH1, EC 6.3.2.2) und die Glutathion-Synthetase (GSH2, EC 6.3.2.3). Während GSH1 ausschließlich in Chloroplasten lokalisiert ist, werden für GSH2 zwei Isoformen exprimiert, welche jeweils im Cytosol und im Chloroplasten agieren (Wachter *et al.*, 2005). Zwischen Cytosol und Chloroplast vermitteln Transporter den Austausch sowohl des Substrats γ -Glutamylcystein (γ EC), als auch des Produkts GSH (Maughan *et al.*, 2010). Die Biosynthese von GSH ist vor allem abhängig von der GSH1-Aktivität und der Cysteinverfügbarkeit (Noctor *et al.*, 1996; Noctor *et al.*, 1998; Noji und Saito 2002; Wirtz und Hell 2007). Wobei die GSH-Synthese inhibitorisch durch den endogenen GSH-Gehalt reguliert wird (Noctor *et al.*, 2002). Demgegenüber werden GSH1 sowie GSH2 induziert durch die Anwesenheit von Jasmonsäure (*jasmonic acid* – JA), Schwermetallen und oxidativen Bedingungen (Xiang und Oliver 1998; Jez *et al.*, 2004; Sung *et al.*, 2009). Ein Fehlen von GSH ist embryolethal, wie Studien zum Funktionsverlust von GSH1 zeigen (Cairns *et al.*, 2006). Pflanzen mit verringerten Syntheseraten von GSH zeigen Entwicklungsdefekte durch fehlerhafte Steuerung des Zellzyklus und erhöhte Anfälligkeit gegenüber Pathogenen und Schwermetallen (Howden *et al.*, 1995; Cobbett *et al.*, 1998; Vernoux *et al.*, 2000; Parisy *et al.*, 2007; Schlaeppli *et al.*, 2008; Diaz Vivancos *et al.*, 2010).

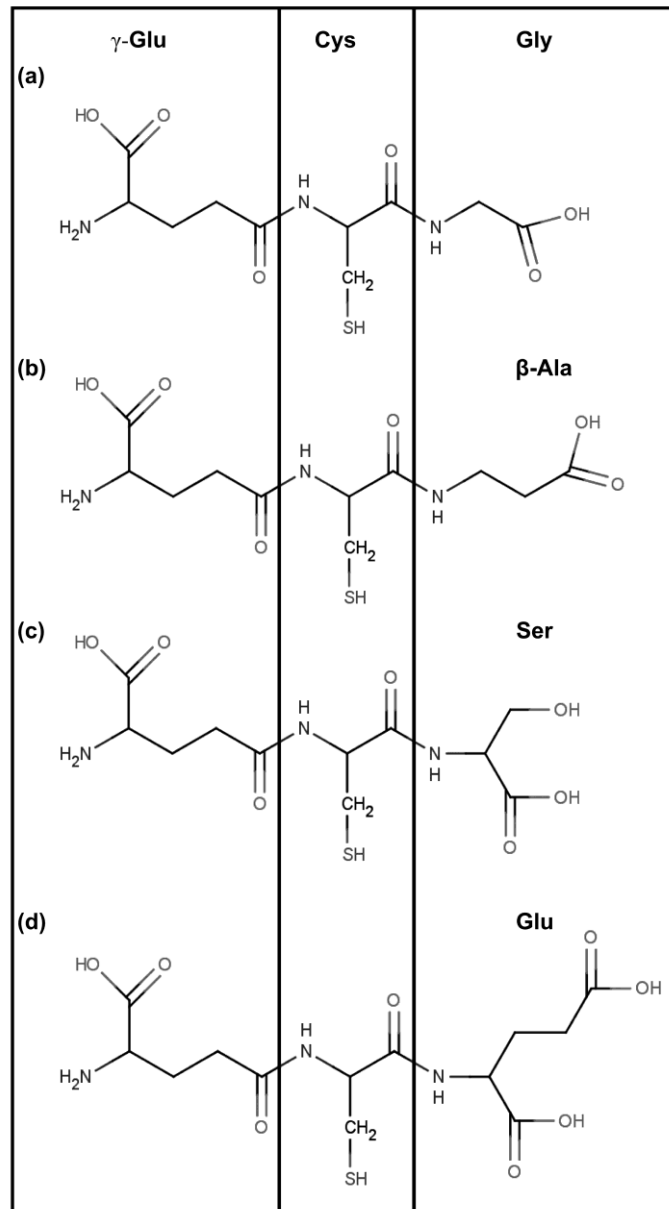


Abbildung 1.3 Struktur von GSH und häufigen, analogen Strukturen

Glutathion (a) ist in der Zelle von großer Bedeutung für die Redoxhomöostase und Prozesse der Detoxifizierung. Einige Organismen verwenden in dieser Funktion neben Glutathion auch Strukturanaloga. Hierbei ist das Glycin die variable Aminosäure. Homoglutathion (b), welches charakteristisch für Leguminosen ist verfügt an Stelle von Glycin über β -Alanin. Für Getreide wurde γ -Glutamylcysteinylserin (c) beschrieben und für Mais ist γ -Glutamylcysteinylglutaminsäure (d) bekannt.

GSH bildet den zentralen Speicher nicht proteinassozierten Schwefels und seine Transportform (Meister 1988; Mendoza-Cózatl *et al.*, 2008; Herschbach *et al.*, 2012). Die zellulären Konzentrationen für Glutathion liegen bei 6-10 mM in pflanzlichen, sowie in Säugergeweben (Akerboom *et al.*, 1982; Leustek *et al.*, 2000). GSH vermittelt ein reduzierendes Zellmilieu in seiner Funktion als Redoxpuffer. Hierbei ist die wichtigste funktionale Gruppe des GSH die Thiolgruppe, basierend auf ihrem stark nukleophilen Charakter. Sie ermöglicht

es GSH über Disulfidbrückenbindung ein Redoxgleichgewicht zwischen GSH und Glutathiondisulfid (GSSG) einzustellen, welches üblicherweise mit über 90 % auf der Seite von GSH liegt (Mullineaux und Rausch 2005; Foyer und Noctor 2011). Dieses Gleichgewicht macht GSH, neben der Ascorbatperoxidase (APX, EC 1.11.1.11) und der Katalase (CAT, EC 1.11.1.6) zu einem wirksamen Schutz gegen reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species* – ROS), welche im Kontext mit biotischem und abiotischem Stress gebildet werden (Noctor und Foyer 1998; Ruiz und Blumwald 2002). Die Aufrechterhaltung und Wiederherstellung des reduzierten Zustands von GSH erfolgt durch eine NADPH-abhängige Reaktion vermittelt durch die Glutathionreduktase (GR, EC 1.8.1.7) (Noctor *et al.*, 2002). Weiterhin gibt es Hinweise, dass das Redoxpotential der Zelle und die Biosynthese von GSH bei biotischem und abiotischem Stress unmittelbar Einfluss auf die Genexpression nehmen können und in die posttranslationale Regulation von Enzymfunktionen involviert sind (May *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1997; Ball *et al.*, 2004).

1.1.3.1 Glutathionkonjugatmetabolismus

Neben ihrer redox-assoziierten Funktion vermittelt die Thiolgruppe Verbindungen mit elektrophilen Substanzen wie Metallionen, Pestiziden oder Xenobiotika sowie endogenen Metaboliten, welche häufig toxische Wirkung auf den Organismus haben (Lamoureux *et al.*, 1973; Kreuz *et al.*, 1996). Diese Konjugation an GSH erfolgt sowohl spontan, als auch katalysiert durch Glutathiontransferasen (GSTs, EC 2.5.1.18) (Wang und Ballatori 1998; Edwards und Dixon 2005; Cummins *et al.*, 2011).

Die Entgiftung von Fremdsubstanzen wird in drei Phasen gegliedert: Transformation (I), Konjugation (II) und Kompartimentierung bzw. Exkretion (III) (Sandermann 1994). Die Transformation beschreibt die Aktivierung der Fremdsubstanzen, welche die Konjugation an Akzeptormoleküle erleichtert. Neben Glutathion können auch Glucosylreste und Aminosäuren als Akzeptoren fungieren (Sandermann 1992; Nebert und Dalton 2006). Die Konjugatbildung mit GSH hat eine zentrale Bedeutung im Entgiftungsstoffwechsel, durch sie werden die zumeist hydrophoben wie reaktiven Substanzen in eine lösliche, stabile Form überführt. Die Kompartimentierung in pflanzlichen Systemen bedeutet eine Einlagerung der Konjugate in die Vakuole, da ihnen die

unmittelbare Exkretion, wie sie in tierischen Systemen erfolgt, nicht möglich ist. Durch die Kompartimentierung bzw. Exkretion wird die Fremdsubstanz vom Zellstoffwechsel isoliert und dadurch unschädlich. Gegenüber dem tierischen System sind Pflanzen in der Lage die eingelagerten Konjugate zu remobilisieren und zu verstoffwechseln (Wolf *et al.*, 1996).

Für den Glutathionkonjugatmetabolismus in Pflanzen sind, neben den GSTs, die Phytochelatinsynthasen (PCS, EC 2.3.2.15) an Prozessen der GSH-vermittelten Detoxifizierung beteiligt. In Pflanzen treten GSTs als Proteinfamilien mit einer Vielzahl von Vertretern auf. So sind für *Arabidopsis thaliana* 55 GST-codierende *Loci* beschrieben, welche phylogenetisch in 8 Klassen unterschieden werden (Dixon und Edwards 2010a). Sie sind aufgebaut aus einer aminoterminalen, Thioredoxin-ähnlichen Domäne und einer carboxyterminalen α -Helix (Atkinson und Babbitt 2009). Die Thioredoxin-Domäne bindet spezifisch GSH oder seine γ EC-Derivate. Im Allgemeinen liegen GSTs als Homo- oder Heterodimere vor (Dixon *et al.*, 1999; Sommer und Böger 1999). Die Koordination von GSH erfolgt über eine Aminosäure im aktiven Zentrum, in der Regel Serin, welche der Thiolgruppe das Proton entzieht (Tajc *et al.*, 2004). GSH liegt somit als reaktives Thiolatanion vor, welches ein elektrophiles Substrat binden kann. Neben ihrer Funktion in der GSH-assoziierten Detoxifizierung von Xenobiotika, sind GSTs in den intrazellulären Transport von beispielsweise Flavonoiden involviert. Außerdem agieren sie in Redoxprozessen und der Glutathionylierung reaktiver Metaboliten als Schutzgruppenfunktion, wie bei Porphyrinogenen und Oxylipinen (Dixon *et al.*, 2010b).

PCSs sind ein zentraler Bestandteil der Schwermetallentgiftung in Pflanzen. Die als Dipeptidyltransferase charakterisierten Enzyme bilden Phytochelatine, welche in der Lage sind Schwermetallionen in Chelatkomplexen zu binden (Grill *et al.*, 1989; Vatamaniuk *et al.*, 1999). Phytochelatine sind aus repetitiven Einheiten von γ EC aufgebaut, die durch Polykondensation von GSH-Molekülen unter der Abspaltung des C-terminalen Glycins verknüpft werden (Vatamaniuk *et al.*, 2004). PCSs sind gegliedert in einen katalytischen N-Terminus und einen cysteinreiche C-Terminus. Die katalytische Domäne ist hoch konserviert und enthält eine charakteristische, katalytische Triade aus Cystein, Histidin und Aspartat, welche sie als Papain-ähnliche Cysteinprotease klassifiziert (Vivares *et al.*, 2005). Der C-Terminus zeigt demgegenüber nur geringe Homologie in

unterschiedlichen Spezies und ist nicht essentiell für die enzymatische Funktion. Es wurde postuliert, dass der C-Terminus als Schwermetallsensor fungiert und Einfluss auf die Regulation der PCS-Aktivität hat (Tsuji *et al.*, 2005; Vestergaard *et al.*, 2008). Die Bindung von Glutathion erfolgt über die Acylierung des Cysteins im katalytischen Zentrum, in deren Folge der Glycinrest abgespalten wird. Anschließend wird das Dipeptid auf ein GSH-Molekül oder bestehendes Phytochelatin übertragen. Dieser Prozess wird durch die Anwesenheit von Schwermetallionen induziert (Oven *et al.*, 2002; Beck *et al.*, 2003).

In Pflanzen werden GSH-Konjugate von Xenobiotika, sowie Phytochelatine üblicherweise, mittels MRP-Transportern (*multidrug resistance-associated Protein*) ATP-abhängig in die Vakuole transportiert (Martinoia *et al.*, 1993; Rea 1999; Cobbett 2000; Foyer *et al.*, 2001; Mendoza-Cózatl *et al.*, 2011). Dort erfolgt der sequentielle Abbau der Konjugate. Für Säugerorganismen wird der Abbau von GSH-Konjugaten durch die Abspaltung des γ -Glutamylrests durch γ -Glutamyltransferasen (GGT, EC2.3.2.2) initiiert (Meister 1995). Die Spaltung der γ -Glutamylbindung ist *in vivo* auf die GGTs limitiert (Martin *et al.*, 2007). Homologe Enzyme in Pflanzen vermitteln entsprechend den Konjugatabbau in der Vakuole. Für *Arabidopsis* sind drei funktionale GGTs beschrieben von denen lediglich eine, GGT4 (At4g29210), in der Vakuole lokalisiert ist (Grzam *et al.*, 2007; Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2007b). GGT1 (At4g39640) und GGT2 (At4g39650) zeigen membrangebundene, apoplastische Lokalisierung und sind nicht an der Degradation von GSH-Konjugaten beteiligt (Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2007a). Das gebildete Cysteinylglycin-Konjugat wird schließlich, durch bislang nicht beschriebene, vakuoläre Carboxypeptidase zum Cysteinkonjugat abgebaut. Der Prozess der Konjugatdegradation in Pflanzen erfolgt nicht notwendigerweise in dieser Reihenfolge. Für die Konjugate von Aalachlor und Fenchlorim wurde das γ EC-Konjugat als initiales Abbauprodukt beschrieben (Wolf *et al.*, 1996; Brazier-Hicks *et al.*, 2008). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass in Pflanzen der Abbauweg oder einzelne Prozesse des Abbaus sowohl cytosolisch, als auch vakuolär erfolgen können. Für die cytosolischen Enzyme PCS und γ -Glutamylpeptidase (GGP) konnte *in vivo* gezeigt werden, dass sie cytosolisch GSH-Konjugate C-terminal bzw. N-terminal degradieren können (Blum *et al.*, 2010; Geu-Flores *et al.*, 2011) (Abbildung 1.4).

Während Funktion und Metabolisierung von GSH-Konjugaten in tierischen Systemen ausführlich untersucht und beschrieben wurden, ist das Wissen über GSH-Konjugate in Pflanzen fragmentarisch. Zwar sind die Prozesse der Konjugatbildung und deren exogenen Substraten intensiv untersucht worden, dennoch bleibt die Kenntnis bezüglich Funktion und Abbau der Konjugate, insbesondere von endogenen Substraten rudimentär. Bekannte, endogene Kandidaten für die Konjugation an GSH in Pflanze sind Flavonoide, Phytoalexine, Derivate von Phytohormonen und oxidierten Fettsäuren. Der charakteristische Unterschied zwischen endogene Metaboliten und Xenobiotika ist der Mechanismus der Bindung. Die katalysierte, kovalente Bindung von Xenobiotika ist üblicherweise eine nukleophile Substitution einer Abgangsgruppe durch GSH. Endogene Substrate hingegen werden häufiger durch Additionsreaktionen konjugiert und sind reversibel (Dixon *et al.*, 2010b). Beispielweise findet der Transport von Anthocyanen in die Vakuole GSH-gekoppelt statt, welche im Anschluss GSH freisetzen (Marrs 1996; Alfenito *et al.*, 1998; Xiang *et al.*, 2001). Da endogene Metaboliten demnach nur temporär als GSH-Konjugat vorliegen und ihre Bildung potentiell an spezifische Bedingungen geknüpft ist wird der Nachweis solcher Konjugate erschwert. Weiterhin wurden Konjugate von OPDA in Abhängigkeit von Pathogeninfektion beschrieben (Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2011). Diese Konjugate waren instabil und zeigten eine starke Tendenz zu Eliminierung von GSH (Dixon *et al.*, 2009). Gleiches konnte für die Konjugate von Oxylipinen und Porphyrinogenen beobachtet werden (Davoine *et al.*, 2006; Dixon *et al.*, 2008). Außerdem wurden Konjugate von oxidierten, ungesättigten Verbindungen, wie Fettsäuren oder Chalkonen beschrieben. Diese Verbindungen bilden reaktive, redoxaktive Zentren, welche durch die Konjugation an GSH stabilisiert werden können (Cummins *et al.*, 2003; Mueller *et al.*, 2008). Basierend auf den beschriebenen GSH-Konjugaten endogener Metaboliten kann angenommen werden, dass die Konjugation endogener Metaboliten sowohl die Funktion der Detoxifizierung reaktiver Nebenprodukte, als auch eine Transport- und Transferfunktion erfüllt.

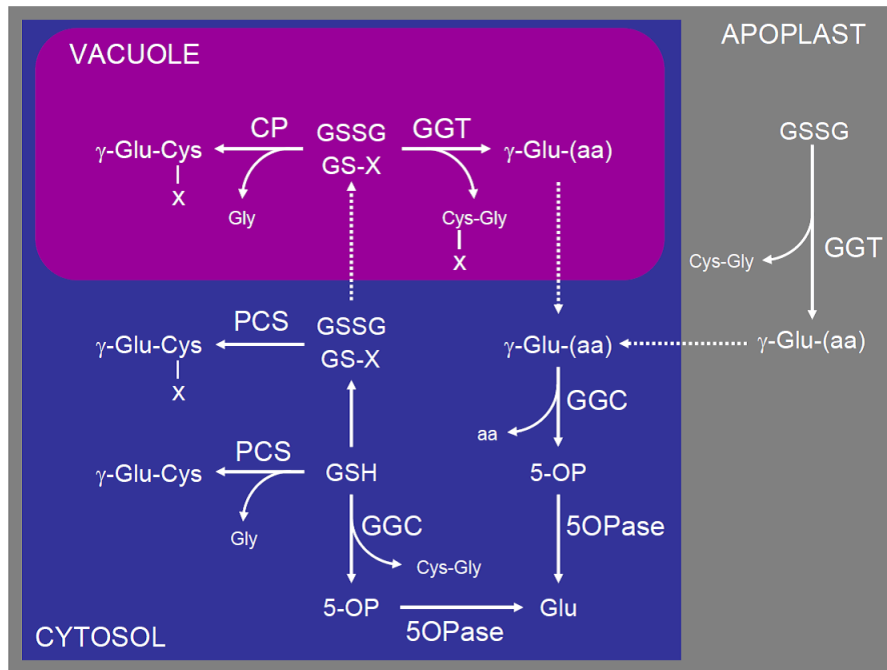


Abbildung 1.4 Abbau von Glutathionkonjugaten

Schema der Abbauewege von Glutathionkonjugaten (GS-X) in Pflanzen. Die Degradation von Glutathion (GSH) und seinen Konjugaten kann in der Vakuole durch Carboxypeptidasen (CP) und γ -Glutamyltransferasen (GGT) erfolgen. Ein analoger Abbaueweg existiert im Cytoplast. Hier können die Phytochelatin-synthasen den C-terminalen Abbau von GSH induzieren, sowie γ -Glutamylcyclotransferase (GGC) und γ -Glutamylpeptidasen den N-terminalen Abbau. GGCs sind außerdem an der Bereitstellung von freier Glutaminsäure beteiligt. Apoplastische GGTs sind für die Umsetzung von Glutathiondisulfid in Verbindung mit Redoxprozessen verantwortlich.

Republished with permission of American Society of Plant Biologists, from Glutathione, Noctor *et al.*, in *Arabidopsis* Book 9, 2011; permission conveyed through Copyrights Clearance Center, Inc.

1.1.4 Spezialisierter Schwefelmetabolismus

Pflanzen sind Produzenten einer Reihe von Metaboliten, welche seit der Prägung des Begriffs 1891 durch Albert Kössel, als sekundäre Pflanzenstoffe bezeichnet wurden. Das Kriterium für die Klassifizierung von Sekundärmetaboliten war der mangelnde Nutzen für die Bildung neuer Zellen (Hartmann 2008). Der Begriff Sekundärmetaboliten wurde als überholt erachtet, als die physiologischen Funktionen sowie die evolutionsbiologische Bedeutung dieser Pflanzenstoffe deutlich wurde. So werden diese Metaboliten angesichts ihrer spezifischen Funktionen beispielsweise in der Pathogenabwehr, als „spezialisierte Metaboliten“ bezeichnet (Pichersky und Lewinsohn 2011).

Die Verknüpfung der assimilatorischen Reduktion des Schwefels und dem spezialisierten Metabolismus in Pflanzen erfolgt ausgehend von APS und Methionin. Durch erneute Phosphorylierung von APS kann PAPS gebildet

werden. Die Phosphorylierung wird durch APS-Kinasen (APK, EC 2.7.1.25) vermittelt, welche sowohl im Chloroplasten als auch im Cytosol erfolgen kann (Mugford *et al.*, 2009; Mugford *et al.*, 2010). In Pflanzen ist PAPS kein Intermediat der reduktiven Schwefelassimilation, wie in Mikroorganismen, und steht alleinig als Substrat für Sulfatierungsreaktionen zur Verfügung. Die Sulfatierung ist eine wichtige Modifikation von beispielsweise Proteinen und Hormonen, welche Konformationsänderungen, Aktivierung oder Deaktivierung bewirken kann (Gigolashvili *et al.*, 2012). Ein wichtiges Ziel der Sulfatierung in der Familie der *Brassicaceae* sind die Glucosinolate. Glucosinolate sind abundante, schwefelhaltige Metaboliten, welche vor allem an der Abwehr von Pathogenen und Herbivoren beteiligt sind (Halkier und Gershenzon 2006). In *Brassicaceae* kann daher der Anteil von Schwefel in einigen Geweben bis zu 10 % der Trockenmasse ausmachen (Rosa *et al.*, 1997). Glucosinolate werden auf Basis von Aminosäuren synthetisiert (Abbildung 1.5). Sie können Derivate von Alanin, Leucin, Isoleucin, Valin und Methionin, sowie Phenylalanin und Tryptophan sein (siehe 2.4.4) (Fahey *et al.*, 2001; Sønderby *et al.*, 2010). In *Arabidopsis* sind die meisten Vertreter von Glucosinolaten Abkömmlinge von Tryptophan (Indolglucosinolate) und Methionin (aliphatisch Glucosinolate) (Kliebenstein *et al.*, 2001b). Während der Biosynthese werden zwei Schwefelgruppen in die Glucosinolatkernstruktur eingeführt (siehe 2.4.4). GSH ist der Schwefeldonor für die Thiolgruppe, über welche schließlich das Glucosyl gebunden wird (Schlaeppli *et al.*, 2008; Bednarek *et al.*, 2009). Im letzten Schritt der Kernsynthese erfolgt die Sulfatierung durch PAPS, wodurch das Glucosinolat seine aktive Form erhält. Die Vorstufe, die Desulfoglucosinolate verfügen über keine biologische Aktivität (Gigolashvili *et al.*, 2012). Die Funktion der Glucosinolate in der Pathogenabwehr wird durch die Myrosinase (EC 3.2.1.147) vermittelt (Wittstock und Burow 2010). Die Myrosinase ist durch Kompartimentierung von den Glucosinolaten getrennt, sie ist in Idioblasten des Phloemparenchyms lokalisiert und wird durch Gewebeverletzung beispielsweise durch Fraß freigesetzt (Andréasson *et al.*, 2001). Durch ihre Thio-glucosidaseaktivität spaltet sie das Glucosinolat in Glucosid und ein Glucosinolataglycon. Das instabile Aglycon bildet durch Umlagerung reaktive und toxische Verbindungen, wie Isothioncyanate und Nitrile (Cole 1976; Bones und Rossiter 1996; Rask *et al.*, 2000; Lambrix *et al.*, 2001) (Abbildung 1.6).

Neben Glucosinolaten werden auch Oligopeptide, wie Phytosulfokine und PSY1 sulfatiert, die an der Entwicklung und Zellproliferation beteiligt sind (Matsubayashi und Sakagami 1996; Amano *et al.*, 2007). Ebenso erfolgt die Regulation der Aktivität der Phytohormone Brassinosteroid und Jasmonsäure durch Sulfatierung (Gidda *et al.*, 2003; Marsolais *et al.*, 2007). Weiterhin ist in *Brassicaceae* das Phytoalexin Camalexin beschrieben, welches eng mit der Biosynthese der Glucosinolate verknüpft ist (siehe 2.4.4.1) (Glawischnig *et al.*, 2004).

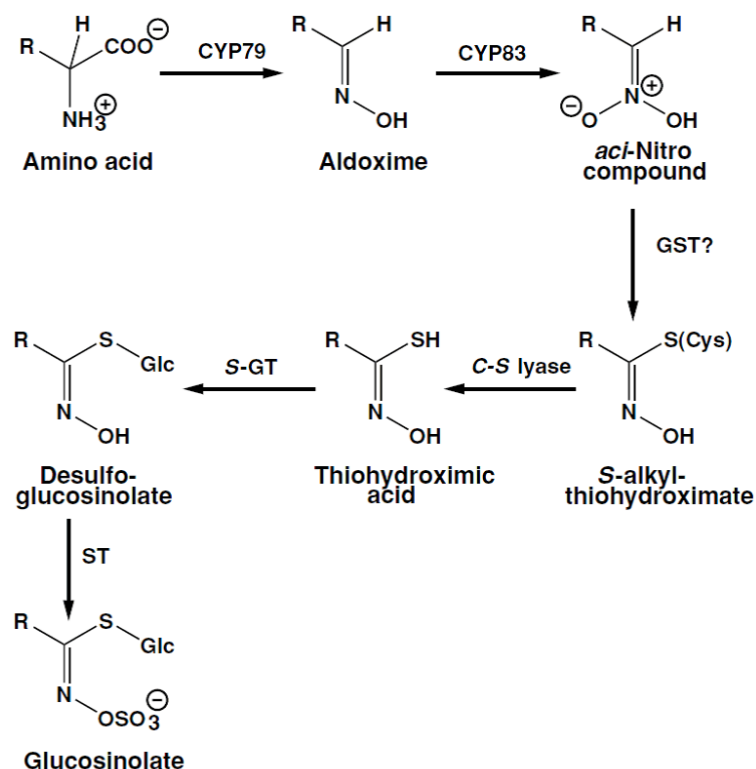


Abbildung 1.5 Biosynthese von Glucosinolaten

Die Kernstruktur von Glucosinolaten wird Basis von Aminosäuren gebildet. CYP79 Enzyme katalysieren die Konversion der Aminosäurevorstufen zu Aldoximen. Anschließend werden durch die Aktivität von CYP83-Vertretern reaktive Zwischenstufen, postuliert als aci-Nitroverbindungen oder Nitriloxide, erzeugt, welche umgehend durch den Schwefeldonor GSH gebunden werden und S-Alkylthiohydroximate bilden. Es ist noch ungeklärt ob hier eine Glutathiontransferase (GST) involviert ist. Im Folgenden wird Glutathion degradiert und der Cysteinylrest durch die Cysteinylase (C-S-Lyase) entfernt. Die entstandene Thiohydroximinsäure wird durch eine S-Glucosyltransferase (S-GT) glucosyliert und bildet das Desulfo-glucosinolat. Sulfotransferasen (ST/SOT) können nun das aktive Glucosinolate durch Sulfatierung mit PAPS darstellen.

Reproduced from Halkier und Gershenzon 2006.

In Pflanzen gibt es weitere spezialisierte Schwefelmetaboliten, welche wie Glucosinolate im Kontext mit Pathogenabwehr und Herbivorie stehen. In der Familie der *Alliaceae* treten analog S-Alkylcystein auf, welche als Alliine bekannt sind. Die Familie der *Asteraceae* bildet Thiophene und die Spezies

Glycosmis verfügt über schwefelhaltige Amide und Flavonole (Bednarek 2012) (Abbildung 1.7).

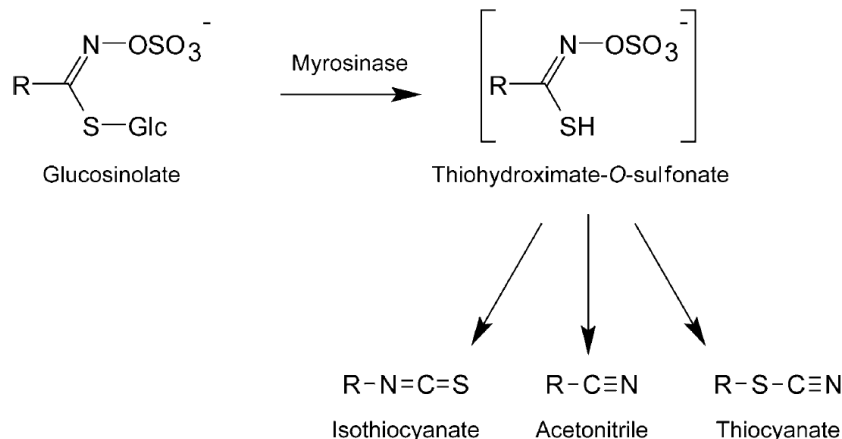


Abbildung 1.6 Abbau von Glucosinolaten

Schema des Myrosinase-induzierten Abbaus von Glucosinolaten in Brassicaceae in Folge von Gewebeverletzung und Fraß. Durch die Glucosidaseaktivität der Myrosinase wird aus dem Glucosinolat ein instabiles Aglycon (Thiohydroximat-O-sulfonat) gebildet. Einige der möglichen Endprodukte durch Umlagerung des Aglycons sind Isothiocyanate, Acetonitrile und Thiocyanate.

Republished from Sulfur-containing secondary metabolites from *Arabidopsis thaliana* and other Brassicaceae with function in plant immunity, Pawel Bednarek, Chembiochem 13, 13. Copyright © (2012) John Wiley and Sons

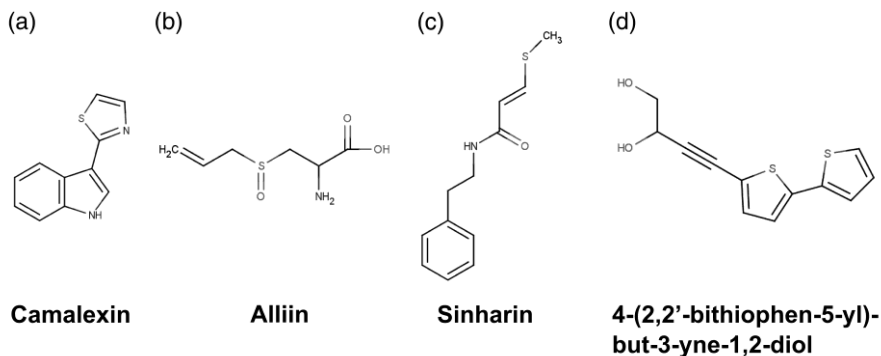


Abbildung 1.7 Spezialisierte Schwefelmetaboliten in Pflanzen

In verschiedenen Pflanzenspezies sind Schwefelmetaboliten in die Abwehr von Pathogenen und Herbivoren involviert. Das Phytoalexin Camalexin (a) ist in *Arabidopsis* zu finden. Alliine (b) sind Derivate von S-Alkylcystein und sind bekannt aus der Familie der *Alliaceae*. Sinharin (c) ist ein Vertreter aus einer Gruppe schwefelhaltiger Amide, welche in der Spezies *Glycosmis* gefunden werden können. In der Familie des *Asteraceae* sind Thiophene (d) charakteristische Verbindungen.

1.2 Metabolomics

Metabolomics sind definiert als die Analyse der Gesamtheit, der von einem Organismus synthetisierten Metaboliten (Oliver *et al.*, 1998). Es wird angenommen, dass alleine das Reich der Pflanzen über 200.000 Metaboliten hervorbringt (Dixon und Strack 2003; Oksman-Caldentey und Inzé 2004). Die Vielfalt der von Pflanzen dargestellten Metaboliten gilt häufig als Resultat ihrer Sessilität. Die spezifische Funktion der zumeist mit dem spezialisierten Metabolismus assoziierten Substanzen sind Teil ihrer Anpassung an eine ökologische Nische oder ein Habitat (Fiehn 2002; Saito und Matsuda 2010).

Das Metabolom ist der biochemische Phänotyp, welcher durch die zellulären Ereignisse von Transkription, Translation und posttranslationaler Prozessierung generiert wird. So sind metabolische Analysen direkt mit der Charakterisierung von Gen- und Proteinfunktionen assoziiert (Cornish-Bowden und Cárdenas 2000; Fiehn *et al.*, 2001; Dixon und Strack 2003). Die funktionale Verknüpfung von genomischen und metabolischen Informationen ist von großer Bedeutung für die medizinische und pharmazeutische Forschung in Bezug auf die Identifikation erkrankungsspezifischer Marker sowie neuer Arzneistoffe und deren Synthese (Farnsworth 1988; Wang 2008; Newman und Cragg 2012). Weiterhin können für die Agrarindustrie Kenntnisse über die Nährstoffversorgung und Resistenzmechanismen gewonnen werden (Fernie und Schauer 2009; Seki *et al.*, 2011; Cantrell *et al.*, 2012; Saito 2013). Die Metabolomanalyse ermöglicht außerdem die Charakterisierung von transgenen Pflanzen und deren Ausmaß an Veränderung gegenüber traditionellen Kulturformen. Dies ist bedeutend für die Etablierung gentechnisch veränderter Nutzpflanzen. Die, durch die Organisation für ökonomische Kooperation und Entwicklung (*Organization for economic cooperation and development* – OECD) veröffentlichte Leitlinie zur Beurteilung der Lebensmittelsicherheit von gentechnisch veränderten Kulturpflanzen, beinhaltet das Konzept der substanziellen Äquivalenz (*substantial equivalence* – SE) transgener Linien mit den etablierten Kulturformen (OECD 2006). Metabolit *fingerprint*-Analysen mit transgenen Kartoffeln und Weizen konnten zeigen, dass diese die geforderten SE-Kriterien erfüllen (Catchpole *et al.*, 2005; Baker *et al.*, 2006). So kann zukünftig eine Grundlage mit Argumenten für die Etablierung transgener

Kulturpflanzen geschaffen und deren öffentliche Akzeptanz gestärkt werden (Dixon und Strack 2003).

1.2.1 Analytische Methoden

Metabolomanalysen bedienen sich der Methoden der analytischen Chemie. Hierbei sind Metabolit-*profiling*, Metabolit-*fingerprint*-Analysen und Metabolomics zu unterscheiden. Das Metabolit *profiling* untersucht üblicherweise Stoffwechselwegspezifisch einige ausgewählte Metaboliten in Quantität und Qualität, welche zuvor selektiv extrahiert werden. Die *fingerprint*-Analyse ist dem gegenüber ein Klassifizierungsverfahren mit hohem Durchsatz, welches Metabolitmuster zur Charakterisierung von Probenclustern einsetzt. Die Identifikation der Metaboliten ist nicht Teil dieser Analyse. Metabolomics ist ein umfassendes, qualitatives und quantitatives Abbild der Metaboliten eines Probenclusters ohne vorherige Selektion. Es beinhaltet die Charakterisierung und Annotation der detektierten Metaboliten (Fiehn 2002; Hall 2006).

Massenspektrometrie (MS) ist, aufgrund von Geschwindigkeit, Sensitivität und des breiten Anwendungsspektrums die Methode der Wahl für metabolische Analysen (Theodoridis *et al.*, 2012). In Abhängigkeit der Auflösung des Massenspektrometers und der Art der Extrakte können die Metaboliten vor der massenspektrometrischen Analyse mit elektrophoretischen oder chromatographischen Methoden vereinzelt werden. Voraussetzung für die Analyse mittels Massenspektrometrie ist die Ionisierbarkeit der zu analysierenden Substanzen. Die Trennung mittels Gaschromatographie (GC) ist geeignet für die Analyse temperaturstabiler, flüchtiger Substanzen, wie Alkoholen und Monoterpenen. Nicht flüchtige, polare Substanzen müssen vor der Analyse derivatisiert werden, dies kann zu unspezifischen Nebenprodukten führen (Asres und Perreault 1997). Für die selektive Trennung ionischer Substanzen findet die Kapillarelektrophorese (*capillary electrophoresis* – CE) Anwendung. Die meisten Metaboliten des Kohlenstoff- und Energieäquivalentmetabolismus, wie Carboxylsäuren, Nukleotide und CoA-Derivate liegen im Organismus als Ionen vor (Soga *et al.*, 2009). So ist CE in Kombination mit MS eine effiziente Methode für das *profiling* von Primärmetaboliten (Sato *et al.*, 2004). Universeller ist die Separation mittels Flüssigchromatographie (*liquid chromatography* – LC). Sie wird vor allem bei der Analyse von semipolaren Metaboliten, wie

spezialisierten Metaboliten und Lipiden eingesetzt (Iijima *et al.*, 2008; Matsuda *et al.*, 2009b; Matsuda *et al.*, 2010). In Verbindung mit sehr hochauflösenden Massenspektrometern kann auf die vorgeschaltete Trennung der Metaboliten verzichtet werden, hierbei werden die Extrakte direkt mit kontinuierlichem Fluss in die Ionisierungsquelle injiziert (*direct injection/flow injection* – DI/FI). Hierbei ist der Vorteil, dass die Ionen des gesamten Spektrums angereichert werden können und dadurch eine höhere Massenpräzision erreicht werden kann. Der Nachteil des Verzichts auf Separation ist die fehlende Unterscheidbarkeit isomerer Strukturen sowie häufiger auftretende Ionensuppression und Matrixeffekte (Ohta *et al.*, 2010).

Eine Alternative zur massenspektrometrischen Metabolomanalyse bietet die Kernspinresonanzspektroskopie (*nuclear magnetic resonance* – NMR). Gegenüber der Massenspektrometrie liefert NMR zusätzliche Informationen zur Struktur der analysierten Substanzen, allerdings ist die Sensitivität gegenüber der Massenspektrometrie gering (Dunn *et al.*, 2005; Eisenreich und Bacher 2007; Ward *et al.*, 2007).

Wie aktuelle Studien zeigen ist keine Methode allein im Stande die globale Information eines Metaboloms zu erfassen. Basierend auf differentieller Löslichkeit und Ionisierbarkeit werden zunehmend komplementäre Methoden der Extraktion und Detektion parallel eingesetzt (Hirai *et al.*, 2004b; Hirai *et al.*, 2005; Tohge *et al.*, 2005; Tohge *et al.*, 2011).

1.2.1.1 Ultrahochauflösende Massenspektrometrie durch Ionen-Zyklotronresonanz Fouriertransformation

Das Alleinstellungsmerkmal der Ionenzyklotronresonanz-Fouriertransformations-Massenspektrometrie (ICR-FT/MS) sind hohe Auflösung, Massenpräzision und Sensitivität (Okazaki und Saito 2012). Wobei die Auflösung die Fähigkeit der Separation zweier Massensignale unterschiedlicher chemischer Komposition mit ähnlicher monoisotoper Masse beschreibt und die Massenpräzision durch die Übereinstimmung der, anhand der chemischen Komposition determinierten Masse mit der experimentellen Masse charakterisiert ist. ICR-FT/MS-Analysen ermöglichen die definitive Unterscheidung zweier Massensignale, welche eine Abweichung von 0,1 ppm ihrer monoisotopen Massen zeigen (Marshall und Hendrickson 2008). Die Detektion der Masse eines Ions erfolgt

basierend auf seiner Beschleunigung, Kreisbahn und deren Radius im statischen Magnetfeld des Zyklotrons. Hierbei ist die Auflösung der Ionen direkt proportional zur Stärke des Magnetfeldes und der Breite des analysierten Spektrums (Schmid *et al.*, 2000). Diese Eigenschaften qualifizieren die ICR-FT/MS als geeignete Methode für die Analyse komplexer, chemischer Gemische. Die Pionierarbeit der Anwendung von ICR-FT/MS in Metabolomics zeigte in vergleichenden Analysen der Reifestadien von Erdbeeren, dass die Methode durch simultane Detektion von knapp 6000 Ionenspezies die Charakterisierung von metabolischen Unterschieden in Rohextrakten erlaubt und die Annotation von Summenformeln und Substanzidentitäten ermöglicht (Aharoni *et al.*, 2002). Durch die fortschreitende Entwicklung der massenspektrometrischen Technologien kann inzwischen die simultane Detektion von über 12.000 Ionenspezies in pflanzlichen Rohextrakten realisiert werden (Gläser *et al.*, 2014).

1.2.2 Identifikation von Metaboliten

Die Herausforderung der Metabolomanalyse ist die Selektion und Identifikation der organischen Substanzen, basierend auf massenspektrometrischen Daten. Zur Charakterisierung des Grades der Identifikation von Metaboliten in massenspektrometrischen Untersuchungen hat die Metabolomics Standards Initiative (MSI) einen Leitfaden zur Einstufung des Identifikationslevels herausgegeben (Sumner *et al.*, 2007).

Level 1, Identifizierte Substanzen: Die Identifikation erfordert die Korrelation von mindestens zwei unabhängigen Parametern aus Retentionszeit, NMR-Spektren, akkurater monoisotoper Masse, Fragmentierungsmuster und Isotopenmuster mit dem analytischen Standard der zu annotierenden Substanz anhand eigener experimenteller Daten.

Level 2, putativ annotierte Substanzen: Annotation erfolgt auf Basis physikochemischer Eigenschaften ohne Referenzstandard, durch Korrelation einer Substanz mit Literatur- und Datenbankinformationen.

Level 3, putativ charakterisierte Substanzklassen: Klassifikation von unbekannt Substanzen auf Basis physikochemischer Eigenschaften ohne Referenzstandard, durch Korrelation mit Substanzklassen aus Literatur und Datenbankinformation

Level 4, Unbekannte Substanzen: Substanzen werden als unbekannt bezeichnet, wenn nicht genügend Argumente für eine Charakterisierung nach Level 1 bis 3 vorliegen.

So ist die Level-1-Identifikation eines Metaboliten stets an einen analytischen Standard gebunden (Böcker und Rasche 2008). Dies erschwert häufig die Annotation von Pflanzenmetaboliten, welche zwar bekannt sind aber häufig nicht als Standardsubstanzen zur Verfügung stehen (Matsuda *et al.*, 2009b). Der erste Schritt zur Charakterisierung einer Substanz ist die Bestimmung ihrer elementaren Zusammensetzung, welche auf Basis monoisotoper Massen berechnet werden kann (Hegeman *et al.*, 2007; Matsuda *et al.*, 2009a; Saito und Matsuda 2010). Die Komposition organischer Moleküle folgt chemischen sowie physikalischen Parametern, wie beispielsweise der Gültigkeit der Oktettregel für Hauptgruppenelemente. Durch die Formulierung der *Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas* von Kind und Fiehn (2007) wurde eine Grundlage zur Berechnung und Selektion möglicher Summenformeln, basierend auf akkuraten monoisotopen Massen, geschaffen. Die Bestätigung selektierter Summenformeln kann durch die Erfassung natürlicher Isotopenmuster gestärkt werden. Die natürliche Abundanz der stabilen Isotope von 1,1 % für ^{13}C , 0,4 % für ^{15}N , 0,2 % für ^{18}O und 4,2 % für ^{34}S ist entsprechend in den organischen Metaboliten zu finden (Rosman und Taylor 1998) (Abbildung 1.8). Es wurde gezeigt das die korrekte Zuordnung von Summenformeln, bestehend aus den Elementen C, H, N, S, O, P, F, Cl und Br für unbekannte Kandidatenmassen mit einer Wahrscheinlichkeit von wenigstens 65 % gelingt. Die Voraussetzungen hierfür sind hohe Massenpräzision und Auflösung sowie eine Korrelation mit dem natürlichen Isotopenmuster (Kind und Fiehn 2007).

Zusätzlich zu akkuraten monoisotopen Massen und Korrelation des Isotopenmusters mit der annotierten Summenformel, können massenspektrometrische

Fragmentierungsanalysen grundlegende Informationen über strukturelle Gruppen liefern und die chemische Komposition untermauern (Konishi *et al.*, 2007). Die Fragmentierung der Ionen in der Massenspektrometrie erfolgt durch Erhöhung ihrer internen Energie, die durch Spaltung kovalenter Bindungen wieder abgegeben wird. Die Energetisierung der Ionen erfolgt beschleunigungsinduziert durch Kollision mit Gasphaseionen (Stickstoff oder Argon) in einer Kollisionszelle. Hierbei zeichnet sich die Abgangsgruppe für gewöhnlich durch die geringste Bindungsstärke aus. Daher zeigt jede Struktur charakteristische Fragmentierungsmuster, welche Summenformelzuordnung und Strukturhypothesen stützen können (Dunn *et al.*, 2013).

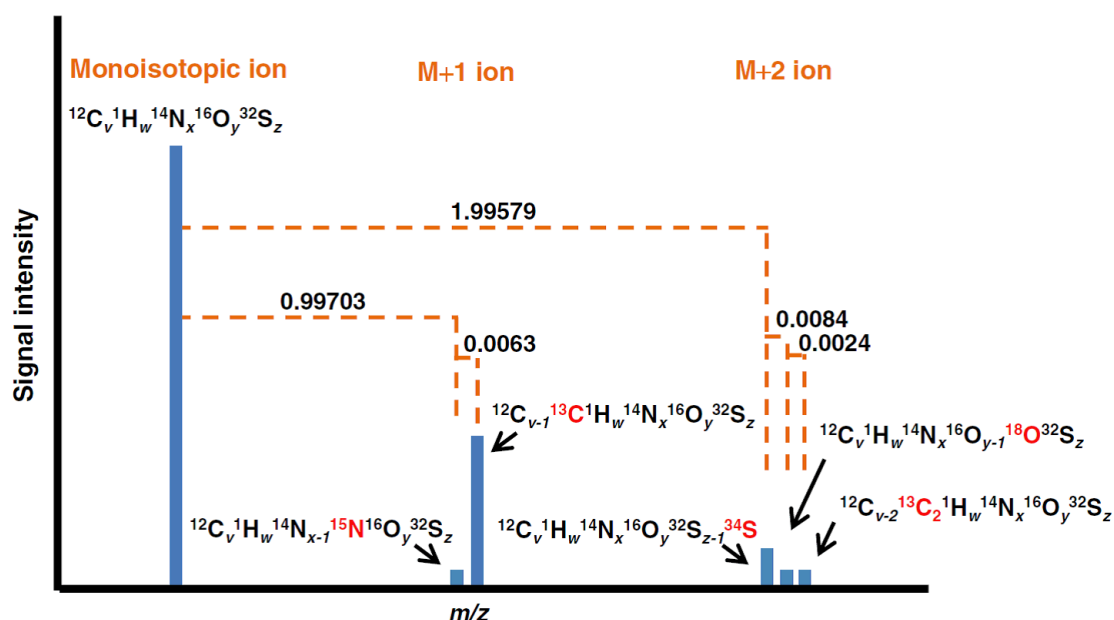


Abbildung 1.8 Massenspektrum der stabilen Isotope einer organischen Verbindung

Das theoretische Isotopenmuster organischer Metaboliten zeigt die isotopenspezifischen Massenverschiebungen und deren natürliche Abundanz im Spektrum. Die Massendifferenz ist dabei in atomaren Masseneinheiten (*atomic mass units* – amu) angegeben.

Springer Berlin Heidelberg, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405, 2013, 5007, *Metabolomics for unknown plant metabolites*, Ryo Nakabayashi and Kazuki Saito, Figure 3 © with kind permission from Springer Science and Business Media.

1.2.3 Markierung mit stabilen Isotopen

Isotope eines Elements zeichnen sich durch gleiche Ordnungszahl aber eine unterschiedliche Anzahl von Neutronen aus. So zeigen zwei Isotope einander gegenüber eine Massenverschiebung entsprechend ihrer Neutronendifferenz. Hierbei wird zwischen stabilen und instabilen, radioaktiven Isotopen

unterschieden. Stabile Isotope sind charakterisiert durch identische physikochemische Eigenschaften. Daher eignen sie sich für die Markierung organischer Substanzen *in vivo* (siehe 2.1). Die Markierung mit stabilen Isotopen von Metaboliten stärkt Metabolomanalysen auf drei Ebenen: Metabolitidentifikation, Metabolitquantifizierung sowie Metabolitfluss und Konversion (Chokkathukalam *et al.*, 2014). Die Isotopenmarkierung ist außerdem ein Selektionskriterium von Metaboliten gegenüber Artefakten und Kontamination der Analyse.

Metabolische Studien in Verbindung mit stabiler Isotopenmarkierung haben gezeigt, dass die Annotation der elementaren Komposition unbekannter Metaboliten durch die Markierung deutlich gefördert wird (Giavalisco *et al.*, 2009; Giavalisco *et al.*, 2011; Hsieh *et al.*, 2012; Nakabayashi *et al.*, 2013b). Die Anzahl von rechnerisch möglichen Summenformeln eines Metaboliten von 1000 amu beträgt etwa 350 Millionen (Meringer 2004). Durch die Isotopenmarkierung kann die Anzahl des Elements innerhalb der Verbindung eindeutig bestimmt werden, dies führt in der Regel zu einer Eingrenzung der chemischen Kompositionen auf wenige Kandidaten (Giavalisco *et al.*, 2011). Bei Ionen kleiner als 500 amu ist die isotopengestützte Annotation häufig eindeutig, für Ionen größer als 500 amu ist die Anzahl der Kandidaten geringer als 20 (Kind und Fiehn 2006).

Absolute Metabolitquantifizierung ist stets nur in Verbindung mit einem analytischen Standard möglich, da die massenspektrometrischen Daten lediglich Auskunft über die relative Abundanz geben können. So erfolgt die Quantifizierung von Metaboliten in massenspektrometrischen Daten häufig durch Zugabe teurer, isotoper Standards (Chokkathukalam *et al.*, 2014). Eine Alternative hierzu kann durch Etablierung einer vollständig isotopenmarkierten Referenzkultur geschaffen werden. Das Extrakt der Referenzkultur kann mit Hilfe regulärer Standardsubstanzen kalibriert werden und schließlich selbst als isotopenmarkiertes Standardgemisch zu Quantifizierung verwendet werden (Kiefer *et al.*, 2008). Dennoch bleibt die absolute Quantifizierung bekannten Metaboliten, mit Verfügbarkeit analytischer Standards, vorbehalten.

Der Fluss und die Verteilung von Metaboliten und deren Derivaten kann auf Basis stabiler Isotopen verfolgt werden. Hierzu erfolgt die Fütterung eines Organismus mit isotopem Substrat, welches spezifische für den zu

untersuchenden Stoffwechselweg ist. Beispielsweise konnte durch die Fütterung von isotoper Glucose der zentrale Kohlenstoffmetabolismus in humanen Krebszellen analysiert werden und es gelangt die Charakterisierung von Glukoseabkömmlingen in *Trypanosoma Brucei* (Fan *et al.*, 2009; Chaneton *et al.*, 2012; Creek *et al.*, 2012).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Der Weg des assimilatorischen Schwefelstoffwechsels ist gut erforscht, dennoch sind viele Zusammenhänge des Netzwerks von Nährstoffmetabolismus und spezialisiertem Metabolismus nicht geklärt (Nikiforova *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2012; Omranian *et al.*, 2012). So hat beispielsweise Schwefelmangel, insbesondere für Nutzpflanzen, umfassende Auswirkungen auf deren Stickstoffversorgung, einhergehend mit Einbußen in Wachstum, Nährstoffgehalt und Ertrag (Blake-Kalff *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 1999; Maruyama-Nakashita *et al.*, 2003; Nikiforova *et al.*, 2005b). Erste umfassende Metabolomanalysen von *Arabidopsis thaliana* konnten zeigen das eine Vielzahl der gefundenen, endogenen Metaboliten nicht charakterisierte Verbindungen darstellen (Giavalisco *et al.*, 2008). Besonders im Bereich des spezialisierten Metabolismus wird mit vielen Unbekannten gerechnet. Im Kontext des Schwefelmetabolismus sind die Kandidaten für nicht beschriebene Substanzen vor allem neue Glucosinolate und deren Derivate, sowie endogene Konjugate von Glutathion (Kliebenstein *et al.*, 2001b; Dixon *et al.*, 2010b).

Das Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung einer analytischen Methode zur Bestimmung des Schwefelmetaboloms von *Arabidopsis thaliana*. Die Analyse der Metaboliten soll mittels ICR-FT/MS durchgeführt werden. Um eine weitreichende, simultane Detektion aller Schwefelmetaboliten zu gewährleisten, soll ein möglichst universelles Verfahren erarbeitet werden. Mit Hilfe der Erfassung aller beschriebenen und experimentell bestätigten Schwefelmetaboliten aus *Arabidopsis* in einer Schwefeldatenbank sollen deren physikochemische Eigenschaften charakterisiert werden. Gestützt von diesen Informationen soll die Selektion und Etablierung der Extraktionsmethode und der instrumentellen Analyseparameter erfolgen. Die etablierte Methode soll zur routinierten Metabolomanalyse geeignet sein, welche reproduzierbar und spezifisch das Schwefelmetabolom aus massenspektrometrischen Daten

selektieren kann. Im Ergebnis soll das Schwefelmetabolom von *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia-0 dargestellt und charakterisiert werden. Aufbauend auf der Methode zur Identifikation des Schwefelmetaboloms, soll diese für vergleichende Analysen von Mutanten angewendet und deren Einfluss auf das Schwefelmetabolom beschrieben werden. Mit den untersuchten, transgenen Linien sollen vor allem Kandidaten für nicht beschriebene Glucosinolate und endogene GSH-Konjugate adressiert werden.

2 Ergebnisse

2.1 Etablierung von Nährmedien zur Markierung von *Arabidopsis*-Keimlingen mit isotopem Schwefel

Isotopenmarkierung von Zellkultur eu- und prokaryotischer Organismen wurde seit Mitte der neunziger Jahre als eine bewährte Methode zur quantitativen Proteomanalyse etabliert (SILAC) (Schnölzer *et al.*, 1996; Shevchenko *et al.*, 1997). Klassischer Weise wird das Medium der Zellkultur mit einer essentiellen Aminosäure, jeweils als leichtes und schweres Isotop, supplementiert. Diese Kulturen werden unterschiedlichen Bedingungen ausgesetzt. Deren Einfluss auf das Proteom kann anschließend mittels massenspektrometrischer Analyse der vereinigten Kulturen, basierend auf dem Isotopenverhältnis der detektierten Peptide, bestimmt werden (Ong *et al.*, 2002; Ong und Mann 2006). Hierzu ist eine vollständige Markierung der Kultur notwendig. Aufgrund der Autotrophie von Pflanzen ist eine spezifische und vollständige Markierung einzelner Aminosäuren durch Fütterung nicht möglich und wird daher häufig durch metabolische, *in-vivo*-Isotopenmarkierung mit z.B. $K^{15}NO_3$ als einziger Stickstoffquelle abgelöst, welche allerdings zu einer erheblich höheren Komplexität der zu analysierenden Daten führt (Gruhler *et al.*, 2005; Thelen und Peck 2007; Schütz *et al.*, 2011). Die zur Proteomanalyse angewendeten Methoden der *in-vivo*-Isotopenmarkierung können leicht auf die Markierung von niedermolekularen Metaboliten in Pflanzen übertragen werden (Bindschedler *et al.*, 2008; Lewandowska *et al.*, 2013). Durch spezifische Substitution mit stabilen Isotopen können gezielt metabolische Wege beobachtet werden (Liu *et al.*, 2012; Nakabayashi *et al.*, 2013b).

Die primäre Assimilation von Sulfat in Pflanzen ist aufgrund ihrer Schlüsselrolle als Produzenten organischer Schwefelverbindungen intensiv untersucht und beschrieben worden (Leustek *et al.*, 2000). Dennoch zeigen uns bioinformatische Studien, dass im globalen Netzwerk des Nährstoffmetabolismus viele Zusammenhänge ungeklärt sind, wie beispielsweise die umfassende systemische Antwort auf Schwefelmangel (Nikiforova *et al.*, 2005a; Omranian *et al.*, 2012).

Zur spezifischen Analyse des Schwefelmetaboloms von *Arabidopsis* sollten Metaboliten mit den stabilen Schwefelisotopen ^{32}S und ^{34}S markiert werden. Hierzu wurden modifizierte Nährmedien benötigt, welche gezielt mit dem jeweiligen Schwefelisotop supplementiert werden konnten. Die unterschiedlich markierten Metaboliten sollten schließlich massenspektrometrisch detektiert und unterschieden werden. Die Basis der meist verwendeten Mineralsalzkompositionen für Pflanzenanzucht und Zellkultur sind Murashige-Skoog-Medium (M-S) und Hoagland-Medium. Hoagland-Medium ist ein niedrigsalz Medium für die hydroponische Kultivierung von Pflanzen. Hydroponische Kulturen erfordern üblicher Weise eine Belüftung des Mediums sowie den regelmäßigen Austausch der Nährsalze (Hoagland und Arnon 1950). M-S findet Anwendung in der Zellkultur und der Anzucht von Pflanzen in Flüssig- und Agarkulturen (Murashige und Skoog 1962). In Zellsuspensions- und Flüssigkulturen wird die Belüftung des Medium in der Regel durch kontinuierliches Schütteln der Kultur gewährleistet. Maßgeblicher Unterschied der beiden Medien ist die Konzentration der Makrosalze. Außerdem wird M-S-Medium üblicherweise mit Saccharose versetzt und für Zellkultur zusätzlich mit entsprechenden Hormonen und Vitaminen, wie Kinetin (K) und Naphthyl-essigsäure (NAA) ergänzt (Tabelle 2.1). Vielfältige Ansätze zur Analyse von Nährstoffmangel in Pflanzen und zur Isotopenmarkierung haben gezeigt, dass die beschriebenen Nährmedien einfach für diese Zwecke modifiziert und sowohl für hydroponischen, als auch für Agar-basierte Kultivierung angewendet werden können (Sauter *et al.*, 2004; Hirai *et al.*, 2004b; Giavalisco *et al.*, 2011; Hsieh *et al.*, 2012).

Zur Isotopen Schwefelmarkierung schien hier M-S-Medium geeignet zu sein, da dieses sowohl für Keimlingsanzucht, als auch für Zellkultur etabliert ist und somit vergleichbare Bedingungen geschaffen werden können. Die Zusammensetzung von M-S-Nährmedium wurde zur Isotopenmarkierung adaptiert und alle sulfathaltigen Nährsalze durch sulfatfreie Salze, vorzugsweise Chloridsalze, substituiert (Tabelle 2.1 und Tabelle 4.3). In Anzuchtversuchen mit diesem schwefelfreien Nährmedium konnte sowohl für *Arabidopsis*-Zellkultur als auch für Keimlinge ein Schwefelmangel gezeigt werden. Das Wachstum von Zellkultur in schwefelfreiem Medium war erheblich beeinträchtigt (Abbildung 2.1a). Hingegen entwickelte die Kultur mit Sulfat supplementiertem Medium ein

ERGEBNISSE

leicht verstärktes Wachstum gegenüber dem unmodifizierten MS-Kontrollmedium. Um eine differentielle Isotopenmarkierung von *Arabidopsis*-Keimlingen zu realisieren, wurde das Medium spezifisch mit $\text{Na}_2^{32}\text{SO}_4$ und $\text{Na}_2^{34}\text{SO}_4$ supplementiert. Das hierzu verwendete isotope Natriumsulfat wurde aus kristallinem Schwefel, $^{32}\text{S}_8$ und $^{34}\text{S}_8$, mittels Oxidation synthetisiert (siehe 4.2.9). In Wachstumsversuchen mit Zellkultur wurde die vergleichbare Qualität des synthetisierten, isopten Natriumsulfats getestet und untersucht ob grundlegende Einflüsse durch die unterschiedlichen Schwefelisotope vorlagen. Wachstumsversuche zeigten, dass sich die Zellkultur mit jeweils $\text{Na}_2^{32}\text{SO}_4$ - und $\text{Na}_2^{34}\text{SO}_4$ -supplementiertem Medium vergleichbar zum M-S-Kontrollmedium entwickelten (Abbildung 2.1b). Wie schon in den vorangegangenen Versuchen zu erkennen war sorgten die supplementierten Nährmedien eher für ein verstärktes Wachstum der Zellkultur.

Tabelle 2.1 Mineralnährsalzmedien zur Kultivierung von Pflanzen

Hoagland	Murashige-Skoog		modifiziertes Medium		
Makronährelemente	mM		mM	mM	
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1	NH_4NO_3	20	NH_4NO_3	20
KNO_3	6	KNO_3	19	KNO_3	19
		KH_2PO_4	1.25	KH_2PO_4	1.25
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	4	CaCl_2	3	CaCl_2	3
MgSO_4	2	MgSO_4	1.5	MgCl_2	1.5
				Na_2SO_4	1.5
FeSO_4	0.17	FeSO_4	120	FeCl_2	120
Mikronährelemente	μM		μM	μM	
H_3BO_3	46	H_3BO_3	50	H_3BO_3	50
MnCl_2	8	MnSO_4	100	MnCl_2	100
ZnSO_4	0.8	ZnSO_4	37	$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})$	37
		KI	5	KI	5
H_2MoO_4	0.1	Na_2MoO_4	1	Na_2MoO_4	1
CuSO_4	0.3	CuSO_4	0.1	$\text{Cu}(\text{H}_3\text{COO})_2$	0.1
		CoCl_2	0.1	CoCl_2	0.1
Hormone	μM		μM	μM	
-	-	Kinetin	2.7	Kinetin	2.7
-	-	NAA	0.5	NAA	0.5

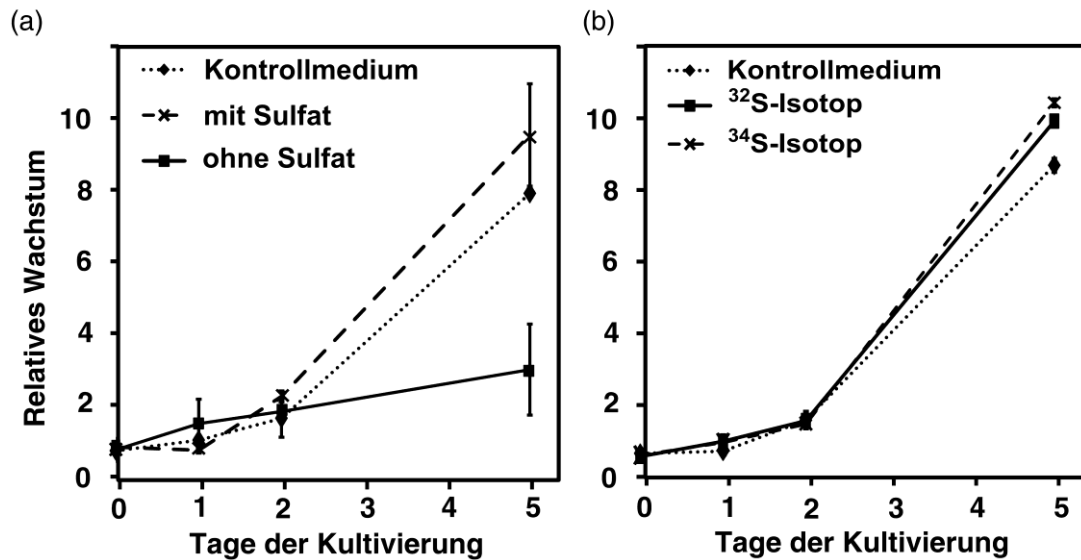


Abbildung 2.1 Wachstum von *Arabidopsis*-Zellkultur in modifiziertem Anzuchtmedium.

Das Wachstum wurde als relative Zunahme der Kultur wiedergegeben. 1 entspricht 0,02 g ($\pm 5\%$) Trockengewicht der Startkultur. Die Sulfatsupplementierung erfolgte mit 1,5 mM Na_2SO_4 , entsprechend der Sulfatkonzentration im Kontrollmedium. Gezeigt werden Mittelwerte aus drei biologischen Wiederholungen mit SD.

(a) Wachstum der Zellkultur in modifiziertem Medium mit und ohne Sulfatsupplementierung im Vergleich zum unmodifizierten Kontrollmedium

(b) Wachstum der Zellkultur in modifiziertem Medium mit Supplementation von $\text{Na}_2^{32}\text{SO}_4$ und $\text{Na}_2^{34}\text{SO}_4$ im Vergleich zum unmodifizierten Kontrollmedium.

Republished from Exploring the *Arabidopsis* sulfur metabolome, Gläser *et al.*, The Plant Journal 77, 1. Copyright © (2014) John Wiley and Sons.

Nach erfolgreichen Versuchen in Zellkultur wurde das modifizierte Nährmedium für die Kultivierung von *Arabidopsis*-Keimlingen getestet. Die angezogenen Keimlinge wurden mittels semi-quantitativer RT-PCR auf Schwefelmangel untersucht. Hierzu wurde die Expression der APR1 (*aps reductase 1*), welche in Folge von Schwefelmangel hochreguliert wird, analysiert (Takahashi *et al.*, 1997). Die Transkriptmenge wurde relativ zur *house-keeping*-Kontrolle Aktin untersucht (Abbildung 2.2). APR1 zeigte in den Keimlingen, welche auf schwefelfreiem Medium angezogen wurden eine etwa doppelt so hohe Transkriptmenge verglichen mit dem Kontrollmedium. Die Anzucht auf mit Sulfat supplementiertem Medium hingegen wies eine eher erhöhte Versorgung mit Schwefel gegenüber dem Kontrollmedium auf. Hier war die Transkriptmenge reduziert. Dies korrelierte auch mit den Ergebnissen des Zellkulturwachstums.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass das schwefelfreie Nährmedium zum einen für die Anzucht von *Arabidopsis*-Zellkultur und Keimlingen geeignet ist und zum anderen der Schwefelgehalt hinreichend

reduziert ist, dass eine erfolgreiche Markierung mittels isotopem Schwefel durch die Supplementation des Mediums gewährleistet werden kann. Für alle folgenden Versuche wurde das modifizierte Nährmedium verwendet (Tabelle 2.1 und Tabelle 4.3). Aufgrund hoher Kosten für den isotonen ^{34}S Schwefel und die mögliche Interferenz, die hohe Salzkonzentrationen in ESI-MS-Analysen bewirken können, wurden die Nährmedien auf den für uneingeschränkte Entwicklung der Keimlinge benötigten Nährsalzgehalt und insbesondere den Schwefelgehalt optimiert. *Arabidopsis*-Keimlinge wurden auf unterschiedlichen Nährsalzkonzentrationen und unterschiedlicher Sulfatsupplementation angezogen und deren Vitalität anhand von Wurzelwachstum, Fotopigment- und Thiolgehalt sowie Schwefelmangelindikation beurteilt.

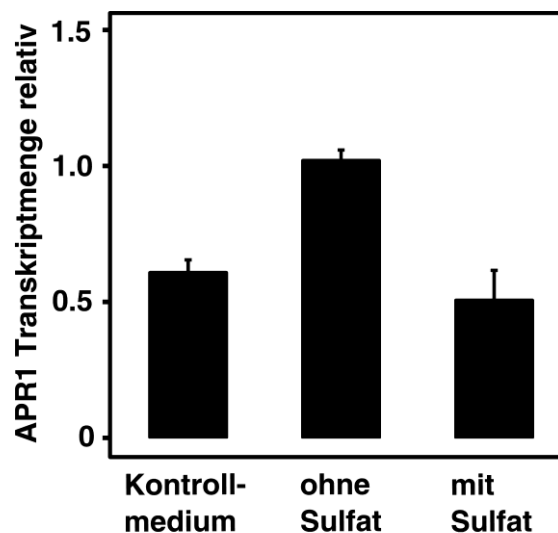


Abbildung 2.2 Bestimmung des Schwefelmangels in *Arabidopsis*-Keimlingen.

Semi-quantitative RT-PCR auf APR1 zur Untersuchung des Schwefelmangels. Die Keimlinge zur RNA-Extraktion wurden auf den Testmedien ausgebracht und nach der Stratifikation für 7 Tage kultiviert. Die RNA wurde aus 50 mg ($\pm 5\%$) Keimlingen extrahiert. Die relative Transskriptmenge von APR1, bezogen auf die *house-keeping*-Kontrolle Aktin wurde densitometrisch bestimmt. 1 entspricht der Transkriptmenge von Aktin. Die Daten zeigen Mittelwerte einer Dreifachbestimmung mit SD.

Der Nährsalzgehalt wird relativ zum modifizierten Vollmedium, welches einfach konzentriert ist beschrieben (Tabelle 2.1). Die verwendeten Konzentrationsstufen des Nährsalzgehalts sind 0,5-fach (1/2), 0,25-fach (1/4), 0,125-fach (1/8), 0,0625-fach (1/16) und 0,03125-fach (1/32).

Das Wurzelwachstum nahm mit geringer werdender Nährsalzkonzentration zu. Die Wurzellänge für 1/4 konzentriertes Nährmedium war um ein Viertel länger

im Vergleich zum Vollmedium bei einem Kultivierungszeitraum von 5 Tagen (Abbildung 2.3a). Gleiches gilt für 1/8, 1/16 und 1/32 konzentriertes Anzuchtmedium. 1/2 konzentriertes Medium zeigte nur eine geringfügige Änderung gegenüber dem Vollmedium.

Die Bestimmung des Fotopigmentgehalts der Keimlinge von unterschiedlich konzentrierten Anzuchtmedien zeigte eine kontinuierliche Abnahme von Chlorophyll a, Chlorophyll b und der Carotinoide (Abbildung 2.3b). Die Keimlinge wurden zunehmend chlorotisch. Der Fotopigmentgehalt bei 1/4 und 1/8 war um etwa ein Viertel reduziert, 1/16 etwa um die Hälfte und 1/32 um zwei Drittel. Die Keimlinge auf 1/2 konzentriertem Nährmedium zeigten keine Veränderung im Fotopigmentgehalt.

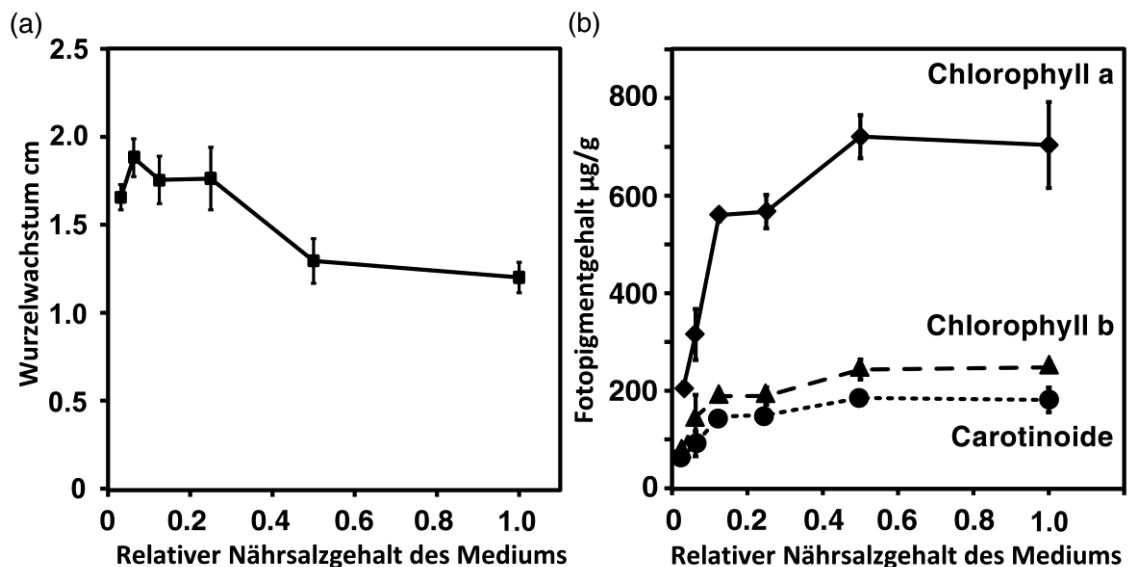


Abbildung 2.3 Einfluss des Nährsalzgehalts im Anzuchtmedium auf die Entwicklung von *Arabidopsis*-Keimlingen

(a) Abhängigkeit des Wurzelwachstums von der Nährsalzkonzentration des Anzuchtmediums. Die Keimlinge wurden auf 1-fach konzentriertem Nährmedium ausgebracht und nach der 48h Stratifikation für vier Tagen angezogen. Die Keimlinge wurden auf die unterschiedlich konzentrierten Nährmedien umgesetzt und drei weitere Tagen bis zur Bestimmung des absoluten Wurzelwachstums kultiviert. Die Mittelwerte beziehen sich auf jeweils 50 Keimlinge mit SD.

(b) Bestimmung des Fotopigmentgehalts von *Arabidopsis*-Keimlingen. Die Keimlinge für die Analyse wurden auf den unterschiedlich konzentrierten Nährmedien für 14 Tage angezogen. Analysiert wurden je 50 mg ($\pm 5\%$) Frischgewichteinwaage der Keimlinge. Die gezeigten Mittelwerte zeigen drei biologische Wiederholungen mit SD.

Analog zu den Fotopigmenten wurde der Thiolgehalt der Keimlinge bestimmt um direkte Effekte der Nährstoffversorgung auf den Schwefelmetabolismus zu erkennen. Der Thiolgehalt variierte zwischen den unterschiedlichen Nährsalzkonzentrationen nur geringfügig und zeigte auch bei sehr niedriger Nährstoff-

versorgung keine signifikante Abnahme (Abbildung 2.4a). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass der Thiolhaushalt, als maßgebliche Komponente der Redoxhomöostase der Pflanze, auch noch bei sehr widriger Nährstoffversorgung aufrechterhalten werden kann und nicht als Zeiger für Schwefelknappheit geeignet ist (Meyer und Hell 2005; Foyer und Noctor 2011). Dies wurde auch durch die Expressionsanalyse des schwefelmangelinduzierten Gens SDI1 (*sulfur deficiency induced 1*) unterstützt. SDI1 wird gegenüber APR1 erst bei akutem Schwefelmangel exprimiert und ist somit ein geeigneter Marker für zu geringe Schwefelversorgung des Mediums (Howarth *et al.*, 2009). So war in *Arabidopsis*-Keimlingen nach Anzucht auf Medien mit unterschiedlichen Nährsalzkonzentrationen lediglich für 1/8, 1/16 und 1/32 ein Transkript für SDI1 zu detektieren (Abbildung 2.4b). Bei Vollmedium, 1/2 und 1/4 konzentriertem Medium lag demnach kein akuter Schwefelmangel vor.

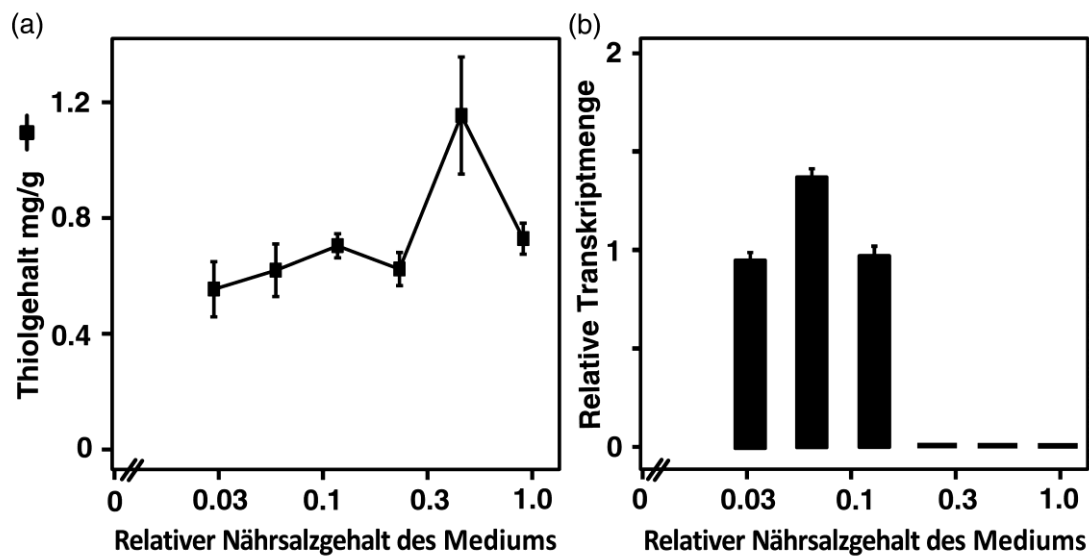


Abbildung 2.4 Einfluss des Nährsalzgehalts im Anzuchtmedium auf den Schwefelhaushalt von *Arabidopsis*-Keimlingen.

Die Keimlinge für die Analysen wurden auf den unterschiedlich konzentrierten Nährmedien für 14 Tage angezogen. Analysiert wurden jeweils 50 mg ($\pm 5\%$) Frischgewichteinwaage der Keimlinge.

(a) Der Thiolgehalt wurde im Keimlingsextrakt durch spezifische Derivatisierung mit Ellman's Reagenz photometrisch bei 410 nm gemessen. Die Mittelwerte zeigen drei biologische Wiederholungen mit SD.

(b) Mittels semi-quantitativer RT-PCR auf SDI1, wurde akuter Schwefelmangel in den Keimlingen bestimmt. Die relative Transkriptmenge von SDI1, bezogen auf die *house-keeping*-Kontrolle Aktin wurde densitometrisch bestimmt. 1 entspricht der Transkriptmenge von Aktin. Die gezeigten Mittelwerte beziehen sich auf drei Wiederholungen mit SD.

Um abschließend die Zusammensetzung des Anzuchtmediums zur stabilen Isotopenmarkierung von *Arabidopsis*-Keimlingen zu bestimmen wurde

ERGEBNISSE

schwefelfreies 1/4 konzentriertes Nährmedium, welches die geringste Nährsalzkonzentration ohne Schwefelmangel war, mit unterschiedlichen Konzentrationen von Sulfat supplementiert und der Schwefelhaushalt erneut mittels Thiolgehalt und Expressionsanalyse von SDI1 untersucht. Wie schon im vorangegangenen dargestellt wurde war auch hier der Thiolgehalt von den unterschiedlichen Sulfatkonzentration nicht erkennbar beeinträchtigt (Abbildung 2.5a). Die Expressionsanalyse von SDI1 zeigte, dass unabhängig von der Nährsalzkonzentration des Mediums, eine Konzentration von 150 μM Sulfat eine Induktion der Expression von SDI1 zur Folge hat, dies entspricht etwa der Konzentration von Sulfat im 1/8 konzentrierten Nährmedium (Abbildung 2.5b).

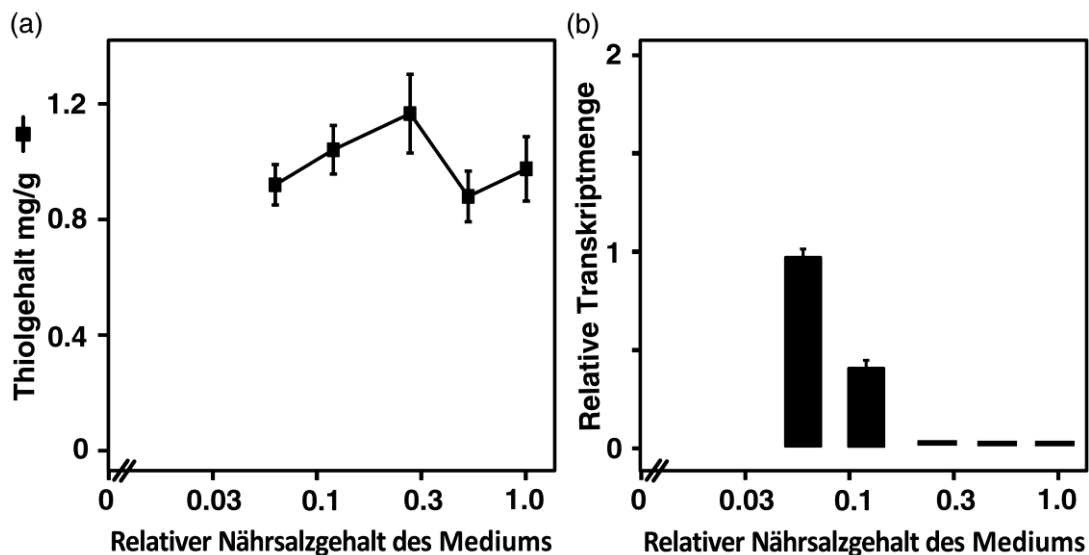


Abbildung 2.5 Einfluss unterschiedlicher Sulfatkonzentration im Anzuchtmedium auf den Schwefelhaushalt von *Arabidopsis*-Keimlingen.

Die Anzucht erfolgte auf schwefelfreiem, 1/4 konzentriertem Nährmedium supplementiert mit unterschiedlichen Sulfatkonzentrationen für 14 Tage. Analysiert wurden jeweils 50 mg ($\pm 5\%$) Frischgewichtseinwaage der Keimlinge.

(a) Der Thiolgehalt wurde im Keimlingsextrakt durch spezifische Derivatisierung mit Ellman's Reagenz photometrisch bei 410 nm gemessen. Die Mittelwerte zeigen drei biologische Wiederholungen mit SD.

(b) Mittels semi-quantitativer RT-PCR auf SDI1, wurde akuter Schwefelmangel in den Keimlingen bestimmt. Die relative Transkriptmenge von SDI1, bezogen auf die *house-keeping*-Kontrolle Aktin wurde densitometrisch bestimmt. 1 entspricht der Transkriptmenge von Aktin. Die gezeigten Mittelwerte beziehen sich auf drei Wiederholungen mit SD.

Zusammenfassend kann aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass ein auf 1/4 reduzierter Sulfatgehalt, entsprechend 375 μM im Medium ausreichend ist. Allerdings zeigte sich bei 1/4 konzentriertem Nährmedium schon ein leichter Einfluss auf Wurzelwachstum und den Fotopigmentgehalt, daher wurde für nachfolgende Versuche 1/2 konzentriertes Medium bevorzugt.

Da hohe Salzkonzentrationen Einfluss auf die Auflösung von massenspektrometrischen Daten haben können wurden methanolische Rohextrakte aus Keimlingen vor der Etablierung der massenspektrometrischen Methode auf ihren Salzgehalt, in Abhängigkeit vom Nährsalzgehalt des Anzuchtmediums, untersucht. Hierzu wurde die Leitfähigkeit als Maß für den Salzgehalt verwendet. Als Referenz für die Leitfähigkeit dienten 70 % Methanol, welches über eine Basisleitfähigkeit von $0,73 \mu\text{S}/\text{cm}^3$ verfügte. Das Extraktionsmittel 70 % Methanol mit 0,1 % Ameisensäure hatte eine Leitfähigkeit von $95 \mu\text{S}/\text{cm}^3$. Die Leitfähigkeit wurde für die konzentrierten Extrakte und für Verdünnungen von 1:25 gemessen. Die Leitfähigkeit der Extrakte lag bei $490 \mu\text{S}/\text{cm}^3$ für 1/32 konzentriertes Medium und bei $1080 \mu\text{S}/\text{cm}^3$ für das Vollmedium (Abbildung 2.6). Dem gegenüber zeigten die verdünnten Extrakte nur noch eine Leitfähigkeit von $30 \mu\text{S}/\text{cm}^3$ für 1/32 konzentriertes Medium und $70 \mu\text{S}/\text{cm}^3$ für das Vollmedium. Anhand dieser Daten wurde deutlich, dass die Auswirkungen der Nährsalzkonzentration des Mediums auf den Salzgehalt in der Probe nur gering sind. Demnach ist die Salzkonzentration der Probe bei der Auswahl des Anzuchtmediums zu vernachlässigen.

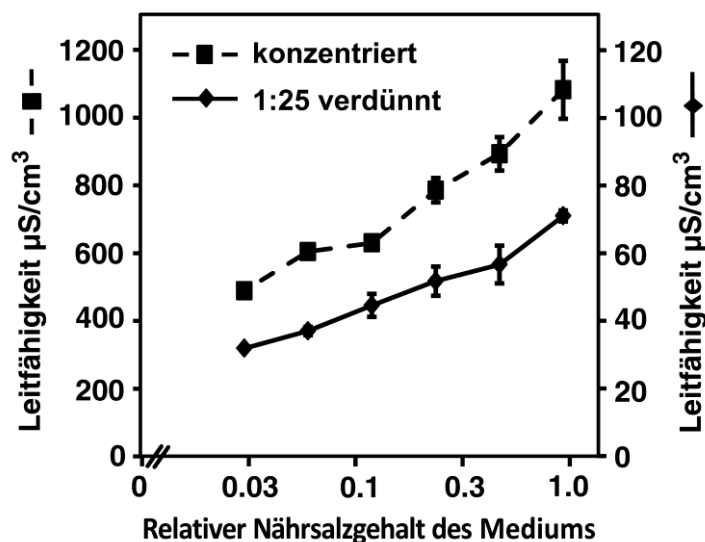


Abbildung 2.6 Einfluss des Nährsalzgehalts im Anzuchtmedium auf den Salzgehalt der Extrakte zur ICR-FT/MS-Analyse.

Als Maß für den Salzgehalt wurde die Leitfähigkeit der konzentrierten und zur Massenspektrometrie verdünnten Rohextrakte gemessen. Die Keimlinge für die Analysen wurden auf den unterschiedlich konzentrierten Nährmedien für 14 Tage angezogen. Es wurden jeweils 50 mg ($\pm 5 \%$) Frischgewichteinwaage der Keimlinge extrahiert. Analysiert wurden die Keimlingsrohextrakte in 70 % Methanol ($5 \mu\text{l}/\text{mg}$) und in 1:25 Verdünnung. Die Mittelwerte beziehen sich auf drei biologische Replikate mit SD.

Zur Bestimmung des benötigten Sulfatgehalts im Anzuchtmedium ist außerdem die Effizienz des Einbaus des isotopen Schwefels in organische Metaboliten der Keimlinge und die hierfür benötigte Dauer der Kultivierung zu berücksichtigen.

Diese Parameter sollten massenspektrometrisch mittels Ionen-Zyklotronresonanz-Fouriertransformations Massenspektrometrie (ICR-FT/MS) ermittelt werden. Die ICR-FT/MS erlaubt die relative, semi-quantitative Bestimmung des spezifischen Metabolitgehalts bei vergleichbarer Probenmatrix (Walker *et al.*, 2011; Krajewski *et al.*, 2012). Um sicher zu stellen, dass dies für die zur Analyse der verwendeten Rohextrakte gültig ist, wurden diese jeweils mit Konzentrationsreihen von Glutathion (GSH), Coenzym A (CoA), Glucobrassicin (I3M) und Benzylglucosinolat (BG), welches kein *Arabidopsis*-assoziierter Metabolit ist, versetzt und analysiert. In Abbildung 2.7 ist der jeweils lineare Zusammenhang zwischen Konzentration und Intensität in der ICR-FT/MS-Analyse dargestellt. So können die Unterschiede eines jeden Massensignals zweier vergleichbarer Proben als Differenz in der Metabolitabundanz beschrieben werden. Weiterhin konnten anhand dieser Daten das Detektionslimit und die probeninterne Konzentration des Extrakts bestimmt werden. Die Schwelle der Detektion wurde bei einer Intensität von 10^6 festgesetzt. Für GSH lag die Nachweisgrenze im Rahmen dieser Analyse bei 7 nM, für CoA bei 10 nM und für die Glucosinolate I3M und BG bei 8 nM (Abbildung 2.7a-d). Dies entspricht für diese Analyse, bei einer Injektionsgeschwindigkeit von 2 μ l/min und einer Injektionsdauer von 1 min (50 Scans), einer absolut injizierten Menge von 14 fmol GSH, 20 fmol CoA und jeweils 16 fmol I3M und BG. Der Gehalt der Rohextrakte für die untersuchten Metaboliten konnte für GSH mit 50 nMol/g Frischgewicht, CoA mit 7,5 nMol/g und I3M 49 nMol/g bestimmt werden. Diese Daten sind vergleichbar mit veröffentlichten, quantitativen Daten dieser Metaboliten im Pflanzengewebe (May und Leaver 1993; Petersen *et al.*, 2002; Mugford *et al.*, 2009).

Zur Analyse der Metabolisierung isotopen Schwefels aus modifiziertem Anzuchtmedium wurde 1/2 konzentriertes Nährmedium mit unterschiedlichen Konzentrationen $\text{Na}_2^{34}\text{SO}_4$ supplementiert und der Einbau des isotopen Schwefels in Schwefelmetaboliten mittels massenspektrometrischer Analyse der Rohextrakte bestimmt. Der Schwefeleinbau wurde für die Schwefelmetaboliten GSH, S-Ribosylhomocystein (RHC) und Methoxygluco-

brassicin (MOI3M) nach 14 Tagen Kultivierung bestimmt. Für die Schwefelmangelsituationen bei 75 μM und 150 μM war der Anteil an ^{34}S -Isotopen auf 30 % bzw. 40 % limitiert (Abbildung 2.8a). Bei 375 μM hingegen zeigten GSH und RHC einen relativen Einbau von bis zu 60 % und MOI3M von 75 %. Ab einer Supplementierung von 750 μM erreichte der Einbau ein konstantes Niveau von etwa 80 % für GSH und RHC sowie 95 % für MOI3M.

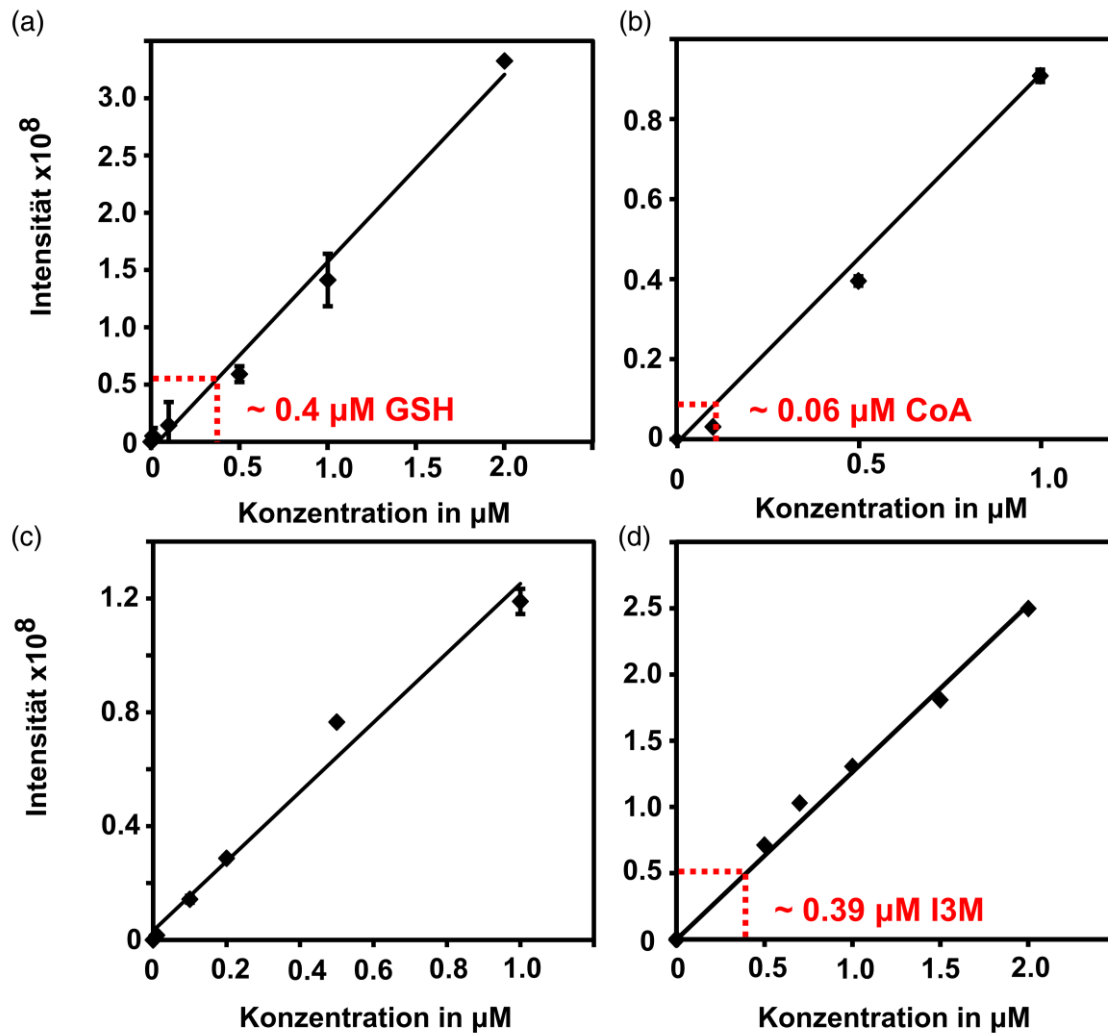


Abbildung 2.7 Quantitative Analyse von Schwefelmetaboliten mittels ICR-FT/MS.

Massenspektrometrische Messung einer Standardreihe unterschiedlicher Schwefelmetaboliten in der Matrix des Keimlingsextrakts. Anhand der Standardkurve wurde die endogene Metabolitkonzentration bestimmt, markiert durch die rote Linie. Die analysierten Metaboliten waren Glutathion (GSH; a), Coenzym A (CoA; b), Benzylglucosinolat (c) und Glucobrassicin (I3M; d). Die Datenaufnahme erfolgte mit 50 Scans bei negativer Ionisierung. Die Mittelwerte zeigen fünf technische Replikate mit SD. Republished from Exploring the *Arabidopsis* sulfur metabolome, Gläser *et al.*, The Plant Journal 77, 1. Copyright © (2014) John Wiley and Sons.

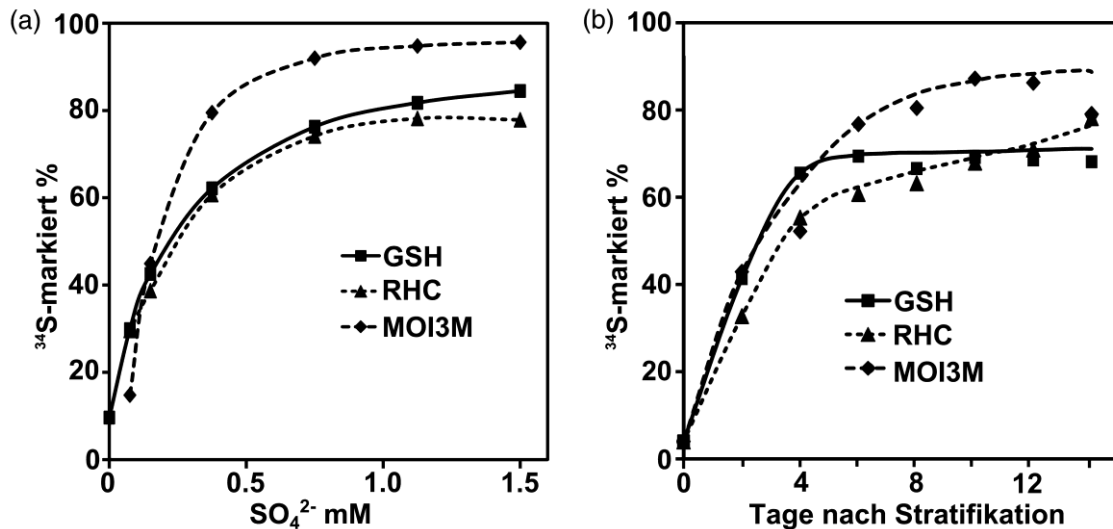


Abbildung 2.8 Effizienz der ³⁴S-Isotopenmarkierung in *Arabidopsis*-Keimlingen.

Die Markierungseffizienz wurde durch den prozentualen Anteil von ³⁴S-Isotopologen in den Schwefelmetaboliten Glutathion (GSH), S-Ribosylhomocystein (RHC) und Methoxyglucobrassicin (MOI3M) gezeigt. Analysiert wurden Extrakte aus jeweils 100 mg (\pm 5 %) Frischgewichteinwaage der Keimlinge.

(a) Einfluss der Sulfatkonzentration auf die Markierung der Schwefelmetaboliten. Die Anzucht erfolgte für 14 Tage auf schwefelfreiem, 0,5-fach konzentriertem Nährmedium, supplementiert mit unterschiedlichen Sulfatkonzentrationen.

(b) Abhängigkeit der Markierungseffizienz vom Kultivierungszeitraum. Die Anzucht der Keimlinge erfolgte auf schwefelfreiem, 0,5-fach konzentriertem Nährmedium supplementiert mit 375 μ M Na₂³⁴SO₄.

Republished from Exploring the *Arabidopsis* sulfur metabolome, Gläser *et al.*, The Plant Journal 77, 1. Copyright © (2014) John Wiley and Sons.

Die Zunahme der Assimilation von ³⁴S über den Kultivierungszeitraum ist in Abbildung 2.8b dargestellt. Zur Anzucht der Keimlinge wurde 1/2 konzentriertes Medium mit 375 μ M Na₂³⁴SO₄ supplementiert. Die Probenahme der Keimlinge erfolgte alle zwei Tage. Bereits nach sechs Tagen der Kultivierung stagnierte die Zunahme des ³⁴S-Isotopologs und ein Gleichgewicht stellte sich ein, welches für GSH und RHC bei etwa 60 % Markierung lag, für MOI3M bei 80 %.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse war die Entwicklung der *Arabidopsis*-Keimlinge nur für die Kultivierung auf 1/2 konzentriertem Nährmedium vergleichbar zum Vollmedium. Bereits bei 1/4 konzentriertem Medium waren deutliche Unterschiede in Wurzelwachstum und Fotopigmentgehalt zu beobachten. Schwefelmangel konnte allerdings erst für 1/8 konzentriertes Nährmedium festgestellt werden. Das veränderte Wurzelwachstum in Abhängigkeit von der Nährsalzkonzentration des Anzuchtmediums hat maßgebliche Bedeutung für Ergebnisse der Metabolitanalyse. Für eine Analyse von vollständigen Keimlingen musste berücksichtigt werden, dass die relative Zunahme der Wurzellänge sich auf das Verhältnis von Spross zu Wurzel

auswirkt, da das Sprosswachstum weitgehend unverändert blieb. Somit kann die Metabolitzusammensetzung des Extrakts verändern sein, sofern diese in Spross und Wurzel für einzelne Metaboliten unterschiedlich ist.

Wie die Zeitabhängigkeit der Isotopenmarkierung zeigte, ist hier eine Anzuchtperiode von 6 Tagen ausreichend. Für die Metabolitanalyse wurde jedoch vorzugsweise aufgrund der größeren Biomasse ein Kultivierungszeitraum von 14 Tagen angewendet. Der Grad der Markierung erreichte lediglich ein Niveau von 60-80 %. Dies ist auf eine mögliche, geringfügige ^{32}S -Kontamination der verwendeten Nährsalze, aber in erster Linie auf das endogene Sulfat im eingesetzten Saatgut zurückzuführen. Das Saatgut enthält das natürliche ^{32}S -Isotop mit 96 % Abundanz, welches durch die Nährstoffmobilisierung bei der Keimung im Metabolismus des Keimlings etabliert und wiederverwertet wird (Larsson *et al.*, 1991; Sunarpi und Anderson 1996; Sunarpi und Anderson 1998).

Als Anzuchtmedium für die Keimlinge wurden basierend auf der vergleichbaren Vitalität der Keimlinge zu den Keimlingen auf Vollmedium und der, anhand der Daten ausreichenden Schwefelversorgung und Metabolisierung, 1/2 konzentrierte Nährsalze und 375 μM Sulfatsupplementation gewählt.

2.2 Extraktion von Schwefelmetaboliten und deren Analyse mit Ionenzyklotronresonanz Fouriertransformations Massenspektrometrie

Analysen des Metaboloms beschreiben ein statisches Abbild der gegenwärtigen Metabolitzusammensetzung eines Organismus, stets in Abhängigkeit von Anzucht- und Umweltbedingungen (Dixon und Strack 2003). Die Metabolomanalyse gliedert sich in Probenvorbereitung (Probennahme und Extraktion), Datenaufnahme und Datenauswertung (Kim und Verpoorte 2010). Da sich Metaboliten im Fluss befinden müssen diese drei Ebenen sorgfältig etabliert werden um reproduzierbare Daten gewährleisten zu können. Besonders kritisch ist hierbei die Extraktion der Metaboliten. Sie entscheidet welche Metabolitinformationen schließlich einer Probe zugeordnet werden können. Zum einen ist die Wahl des Extraktionsmittels von Bedeutung, zum anderen die Methode von Aufschluss und Extraktion der Probe (Huie 2002).

Aufbauend auf den Ergebnissen zur Anzucht von isotoopenmarkierten *Arabidopsis*-Keimlingen sollten mittels ICR-FT/MS Schwefelmetaboliten detektiert und anhand der Isotoopenmarkierung identifiziert werden. Zu diesem Zweck musste ein Protokoll für die effiziente Extraktion der Schwefelmetaboliten entwickelt werden. Des Weiteren sollten die massenspektrometrischen Messparameter bestimmt werden.

Bei der Entwicklung der Extraktionsmethode war zu berücksichtigen, dass alle Proben für die Analyse mittels ICR-FT/MS in 70 % Methanol aufgenommen oder verdünnt werden um gute Ionisierungseigenschaften während der Analyse zu gewährleisten (Janz *et al.*, 2010). Darauf basierend wurden unterschiedliche Extraktionsmittelkombinationen und Extraktionsmethoden untersucht und anhand des Extraktionsvermögens gegenüber den ausgewählten Schwefelmetaboliten γ EC, RHC, Pantethein (PAN), CoA, GSH, I3M und MOI3M beurteilt. Da Thiole abundante Schwefelmetaboliten sind, die in einem Redoxgleichgewicht zueinander stehen können, wurden alle Extraktionsmittel jeweils mit 0,1 % Ameisensäure angesäuert um oxidative Prozesse zu hemmen (Cotgreave und Moldéus 1986; Chen *et al.*, 2008). Die Extraktionseffizienz der analysierten Metaboliten wurde anhand der Peakintensität ihrer ^{32}S -Masse im Massenspektrum gezeigt.

Zunächst wurde in einer vergleichenden Analyse von Zellkultur- und Keimlingsrohextrakten in 70 % Methanol die Korrelation dieser beiden Systeme untersucht. Die Abundanz der Testmetaboliten zeigte, dass die unterschiedlichen Kulturen grundlegend verschieden in ihrem Schwefelmetabolitgehalt waren (Abbildung 2.9). Die Zellkultur zeigte gegenüber den Keimlingen nur geringe Signale für die Glucosinolate I3M und MOI3M, hingegen aber höhere Abundanz für die niedermolekularen Metaboliten γ EC, RHC und PAN. Diese Unterschiede im Metabolitverhältnis zeigen eine Diskrepanz der Metabolitabundanz in Abhängigkeit von der Kulturform (Fukusaki *et al.*, 2006; Lehmann *et al.*, 2009). Aufgrund des hohen Saccharosegehalts der Zellkulturproben, welcher abundante Signale für Saccharose und Saccharosederivate erzeugt, können außerdem Ionensuppressionseffekte, welche das Missverhältnis der Metaboliten noch zusätzlich verstärken, nicht ausgeschlossen werden, (Ohta *et al.*, 2010). Die Massenspektren von Zellkultur und Keimlingen und die daraus resultierende Metabolitverteilung konnten nicht verglichen werden. In Folge

dieser Ergebnisse wurden für die Analysen zum Schwefelmetabolom ausschließlich Keimlinge untersucht.

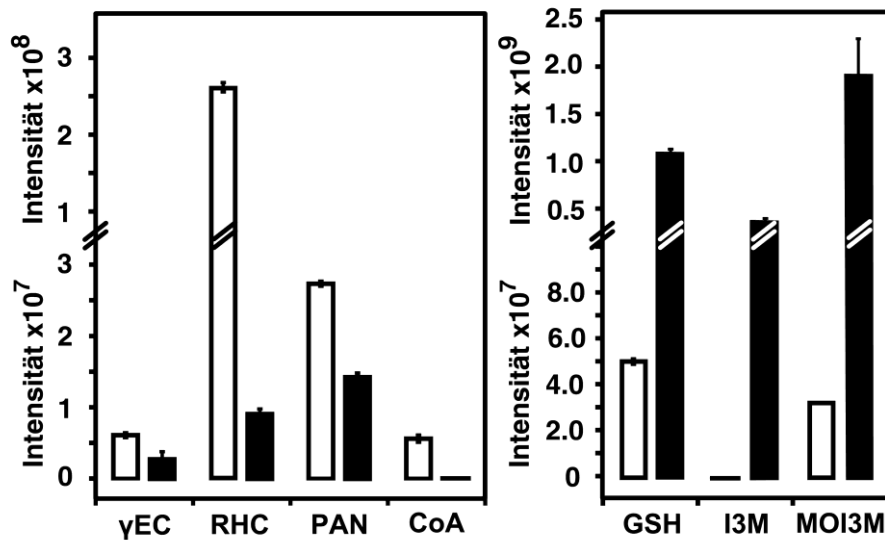


Abbildung 2.9 Extraktion von Schwefelmetaboliten aus *Arabidopsis*-Zellkultur und Keimlingen. Die Extraktion der Schwefelmetaboliten γ -Glutamylcystein (γ EC), S-Ribosylhomocystein (RHC), Pantetheine (PAN), Coenzym A (CoA), Glutathion (GSH), Glucobrassicin (I3M) und Methoxyglucobrassicin (MOI3M) erfolgte in 70 % Methanol (5 μ l/mg). Die Anzucht von Zellkultur (weiße Balken) erfolgte in modifiziertem Vollmedium supplementiert mit 375 μ M Na_2SO_4 für 7 Tage. Die Keimlinge (schwarze Balken) wurden auf 0,5-fach konzentriertem, mit Agar verfestigtem Medium, supplementiert mit 375 μ M Na_2SO_4 für 14 Tage angezogen. Gezeigt werden Mittelwerte des ^{32}S -Isotops [m-H] aus jeweils zwei biologischen und zwei technischen Replikaten mit SD. Die Datenaufnahme erfolgte mit 300 Scans in einer 1:25 Verdünnung der Pflanzenextrakte.

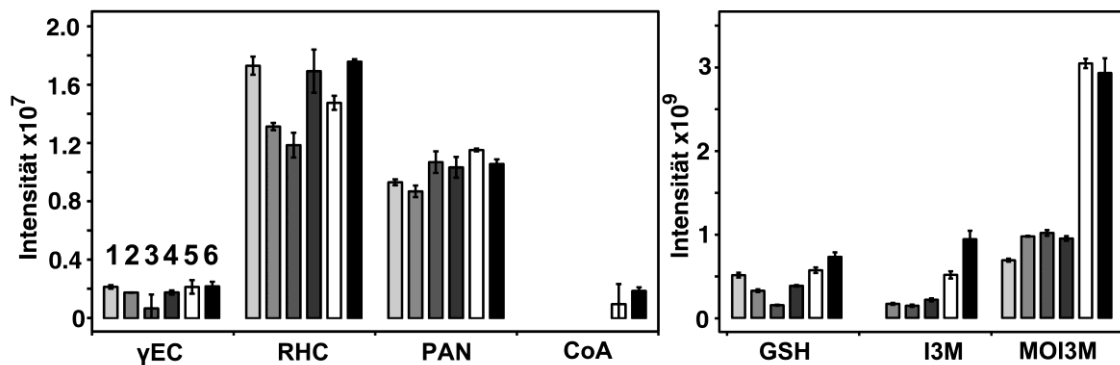


Abbildung 2.10 Extraktionseffizienz von Schwefelmetaboliten. Extraktion der Schwefelmetaboliten γ -Glutamylcystein (γ EC), S-Ribosylhomocystein (RHC), Pantethein (PAN), Coenzym A (CoA), Glutathion (GSH), Glucobrassicin (I3M) und Methoxyglucobrassicin (MOI3M) in Abhängigkeit von Extraktionsmittel und Extraktionsmethode. Gezeigt werden Mittelwerte des ^{32}S -Isotops [m-H] aus jeweils zwei biologischen und zwei technischen Replikaten mit SD. Die Datenaufnahme erfolgte mit 300 Scans in einer 1:25 Verdünnung der Pflanzenextrakte.

1: Wasser (5 μ l/mg), Ultraschallaufschluss 2-fach; 2: 50 % Methanol (5 μ l/mg), Ultraschallaufschluss 2-fach; 3: Methanol (5 μ l/mg), Ultraschallaufschluss 2-fach; 4: 70 % Methanol (5 μ l/mg), Ultraschallaufschluss 2-fach; 5: 50 % Methanol/Methanol (je 2,5 μ l/mg), Ultraschallaufschluss 1-fach, serielle Extraktion; 6: 70 % Methanol (5 μ l/mg), Ultraschallaufschluss 2-fach, Inkubation 10 min bei 60 $^{\circ}\text{C}$.

Es wurden, angelehnt an metabolische Studien mit Mikroorganismen und Pflanzen sechs Extraktionsmethoden ausgewählt, die für die Extraktion von Schwefelmetaboliten geeignet waren. Basierend auf den Testanalyten sollte das Extraktionsmittel polare Metaboliten extrahieren können und nach Möglichkeit in 70 % Methanol löslich sein. Die Extraktionsmethoden 1 bis 6 sind in entsprechender Reihenfolge je Analyt dargestellt (Abbildung 2.10).

- 1 – Wasser (5 µl/mg), Ultraschallaufschluss 2-fach (Vos *et al.*, 2007)
- 2 – 50 % Methanol (5 µl/mg), Ultraschallaufschluss 2-fach (Leon *et al.*, 2009)
- 3 – Methanol (5 µl/mg), Ultraschallaufschluss 2-fach (Oikawa *et al.*, 2006)
- 4 – 70 % Methanol (5 µl/mg), Ultraschallaufschluss 2-fach (Janz *et al.*, 2010)
- 5 – 50 % Methanol/Methanol (je 2,5 µl/mg), Ultraschallaufschluss 1-fach, serielle Extraktion (Krajewski *et al.*, 2012)
- 6 – 70 % Methanol (5 µl/mg); Ultraschallaufschluss 2-fach; Inkubation 10 min bei 60 °C (Malitsky *et al.*, 2008)

Die Überstände wurden nach der Zentrifugation der Extraktionsansätze jeweils in 1:25-Verdünnung mittels ICR-FT/MS bei negativer Ionisierung analysiert. Das Massenspektrum wurde hierbei aus 300 Einzelscans des Gesamtspektrums zwischen 123 und 1000 m/z aufsummiert. Die Analyse zeigte, dass die Extraktionen mit reinem Methanol (3) und mit Wasser (1) aufgrund ihrer Lösungseigenschaften nicht für alle Testanalyten geeignet sind. 50 % Methanol (2) und 70 % Methanol (4) waren in der Lage die meisten Testanalyten unterschiedlich effizient zu extrahieren, dabei war die Extraktion mit 70 % besser. Die Analyse zeigte deutlich, dass die Methode des Aufschlusses die Extraktionseffizienz und die Vielfalt der extrahierten Metaboliten maßgeblich beeinflusst. Eine vergleichbar gute Extraktion aller Testanalyten zeigten der serielle Aufschluss (5) und die 60 °C-Inkubation (6), beide in 70 % Methanol.

In der Literatur zu metabolischen Analysen, vor allem im Kontext mit spezialisierten Metaboliten, werden außerdem häufig fraktionierende Flüssig-Flüssig-Extraktionsmethoden beschrieben, welche eine polare und eine organische, apolare Phase verwenden (Saint Paul *et al.*, 2011; Giavalisco *et al.*, 2011). Eine Fraktionierung kann sich vorteilhaft auf die massenspektrometrische Analyse auswirken, da eine Ausdünnung der Matrix die

ERGEBNISSE

Auflösung erhöhen oder aber durch die Fraktionierung die Ausbeute an Zielmetaboliten verbessert werden kann (Kim und Verpoorte 2010). Die fraktionierte Extraktion der homogenisierten Keimlinge erfolgte mit einem Gemisch von 2:1:1 (v/v/v) von Chloroform, Methanol und Wasser. Die Chloroformfraktion wurde abgedampft und anschließend zur massenspektrometrischen Analyse in 70 % Methanol aufgenommen und analog zur methanolischen Fraktion verdünnt. Im Vergleich zu Methode 5 aus der vorangegangenen Analyse zeigte die fraktionierte Extraktion keine verbesserte Anreicherung der Testanalyten in der methanolischen (M) oder der Chloroformfraktion (C) (Abbildung 2.11).

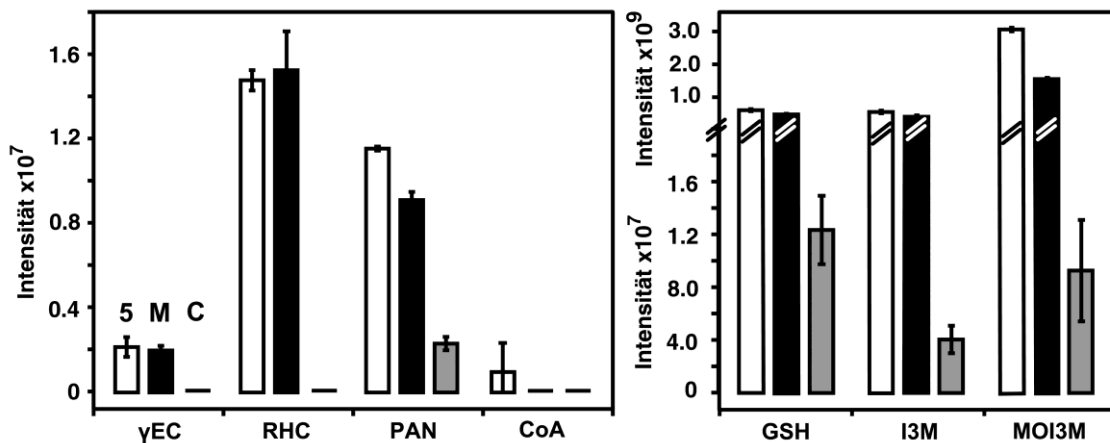


Abbildung 2.11 Fraktionierte Extraktion von Schwefelmetaboliten mit Chloroform.

Die fraktionierte Extraktion der Schwefelmetaboliten γ -Glutamylcystein (γ EC), S-Ribosylhomocystein (RHC), Pantethin (PAN), Coenzym A (CoA), Glutathion (GSH), Glucobrassicin (I3M) und Methoxyglucobrassicin (MOI3M) erfolgte in 1:1:2 (v/v/v) in Wasser:Methanol:Chloroform (M: Methanolfraktion; C: Chloroformfraktion) und 70 % Methanol (5 – 50 % Methanol/Methanol, serieller Aufschluss). Die Keimlinge wurden auf 0,5-fach konzentriertem, mit Agar verfestigtem Medium, supplementiert mit 375 μ M Na_2SO_4 für 14 Tage angezogen. Gezeigt werden Mittelwerte des ^{32}S -Isotops [m-H] aus jeweils zwei biologischen und zwei technischen Replikaten mit SD. Die Datenaufnahme erfolgte mit 300 Scans in einer 1:25 Verdünnung der Pflanzenextrakte.

Alle folgenden Metabolitanalysen wurden mit Extrakten aus dem seriellen Aufschluss durchgeführt. Die 60 °C-Inkubation wurde nicht gewählt, da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass aufgrund erhöhter Reaktivität bei 60 °C das Metabolitspektrum verändert wird und dadurch, ungerichtete Analysen von Schwefelmetaboliten erschwert werden.

Neben der Extraktion der Metaboliten beeinflussen außerdem die Probenkonzentration und die instrumentellen Messparameter die Auflösung der ICR-FT/MS-Analyse (Schmid *et al.*, 2000). Zur Optimierung der analytischen

Methode wurde eine Verdünnungsreihe des Rohextraktes injiziert und mit 250 Scans gemessen (Abbildung 2.12a). Als Maß für die Qualität der Analyse wurde zum einen die mittlere Peakintensität des Gesamtspektrums, zum anderen die Anzahl der reproduzierbaren Massen innerhalb von fünf technischen Replikaten verwendet. Es sind eine hohe Anzahl reproduzierbarer Massen verknüpft mit hoher mittlerer Peakintensität erstrebenswert um eine zuverlässige Detektion zu gewährleisten. Dennoch musste berücksichtigt werden, dass ein hochkonzentrierter Extrakt die Möglichkeit der nachhaltigen Kontamination des Systems und somit der anschließenden Probe erhöhte und daher ein größeres Waschvolumen erforderlich war.

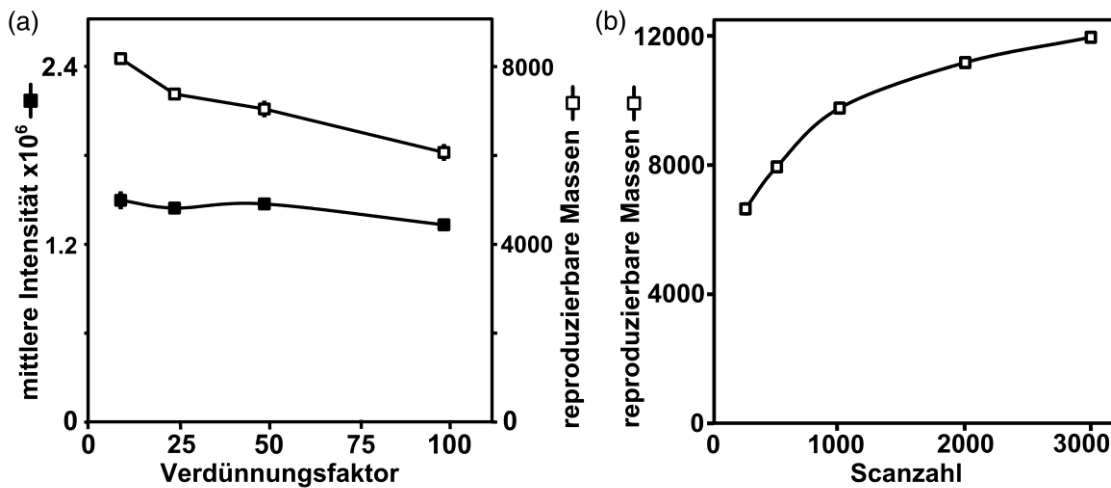


Abbildung 2.12 Optimierung der Messparameter zur ICR-FT/MS-Analyse

(a) Einfluss der Verdünnung der Probe auf die Anzahl der reproduzierbaren Massen und die mittlere Peakintensität.

(b) Verhältnis der Anzahl der akkumulierten Scans einer Messung zur Anzahl der reproduzierbaren Massen bei einer Verdünnung von 1:25 der Pflanzenextrakte. Massen wurden als reproduzierbar erachtet, wenn sie mindestens zweimal innerhalb von fünf technischen Replikaten gefunden wurden. Es wurden je Messung 250 Scans bei negativer Ionisierung akkumuliert.

Republished from Exploring the *Arabidopsis* sulfur metabolome, Gläser *et al.*, The Plant Journal 77, 1. Copyright © (2014) John Wiley and Sons.

Wie die Verdünnungsreihe zeigte, sank mit zunehmender Verdünnung die Anzahl der reproduzierbaren Massen von 8000 bei einer 1:10 Verdünnung auf 6000 bei einer 1:100 Verdünnung. Dem gegenüber war die Abnahme der mittleren Peakintensität mit der Verdünnung gering. Um eine Überladung des Systems zu vermeiden wurde für alle folgenden Analysen eine Verdünnung von 1:25 gewählt, die in dieser Analyse etwa 7300 reproduzierbare Massen zeigte.

Ein Kriterium für eine zuverlässige Identifikation einer Schwefelmasse ist neben der Detektion der Verschiebung des Isotopenverhältnisses durch die Isotopenmarkierung, die Detektion der korrespondierenden $^{13}\text{C}_1$ -Masse, deren Abundanz 1,1 % je C-Atom der Verbindung beträgt. Für GSH, mit der Summenformel $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$, entspricht das etwa 10 % der Peakintensität der monoisotopen ^{12}C -Masse. Die Peakintensität ist vor allem für wenig abundante oder schlechter ionisierende Massen von Bedeutung. Durch eine Erhöhung der Anzahl der aufsummierten Scans einer Analyse kann in der Regel ein Signal deutlicher von der Hintergrundmatrix abgesetzt werden. Durch die erhöhte Scanzahl wird eine lineare Zunahme der Peakintensität erreicht, nicht aber der Matrix (Payne *et al.*, 2009). Mit steigender Scanzahl stieg die Anzahl der reproduzierbaren Massen deutlich (Abbildung 2.12b). Konnten bei 250 Scans lediglich 6500 reproduzierbare Massen detektiert werden, waren es bei 1000 Scans 10.000 und bei 3000 Scans 12.000. Die Zunahme der reproduzierbaren Massen von 1000 auf 3000 Scans steht allerdings in einem ungünstigen Verhältnis zu der hierfür erforderlichen Messzeit, welche für 3000 Scans 60 min beträgt im Vergleich zu lediglich 20 min für 1000 Scans.

Aufbauend auf dieser analytischen Methode wurde die Isotopenmarkierung in den Extrakten mittels des Isotopenmusters der bereits beschriebenen Testanalyten γEC , RHC, PAN, CoA, GSH, I3M und MOI3M untersucht (Abbildung 2.13). Aufgrund der hohen Auflösung und Massengenauigkeit können die Massensignale eindeutig einer spezifischen Summenformel zugeordnet werden. Die Summenformel basierte Simulation von GSH und des korrespondierenden, natürlichen $^{13}\text{C}_1$ -Isotops stimmten mit den experimentellen Daten, innerhalb einer Abweichung von 0,02 ppm mit den simulierten Massen überein und zeigten die ^{34}S -spezifische Isotopenverschiebung (Abbildung 2.13a, b). Die Markierungseffizienz von etwa 60 % hat den Vorteil, dass beide Isotopen Peaks detektiert werden können. Bei weniger abundanten Massen als Glutathion kann es vorkommen, dass im ^{32}S -markierten Zustand die ^{34}S -Masse mit der natürlichen Abundanz von 4 % nicht mehr erfasst werden kann, wie es für die ^{32}S -Markierung von PAN, I3M und MOI3M zu beobachten war (Abbildung 2.13c; Abbildung 2.14b, c, d). Metaboliten mit mehreren Schwefelatomen, wie I3M und MOI3M, zeigten außerdem einen heteroisotopen Zustand bei dem jeweils ein Schwefel als ^{32}S und als ^{34}S vorlag, welcher durch die Isotopenmarkierung in

ERGEBNISSE

vergleichbarer Abundanz zum monoisotopen ^{34}S -Zustand auftrat (Abbildung 2.13c; Abbildung 2.14c, d).

Die Analysen mit einer Verdünnung von 1:25 und einer Scanzahl von 1000 zeigten eine gute Auflösung aller untersuchten Testanalyten und ihrer Isotope. Für hochauflösende Analysen, wie beispielsweise ungerichtete Metabolomaufnahmen war die Anwendung von 1000 Scans unter den hier etablierten Bedingungen empfehlenswert. Für gerichtete Analysen oder Vorversuche genügten bereits 250-500 Scans.

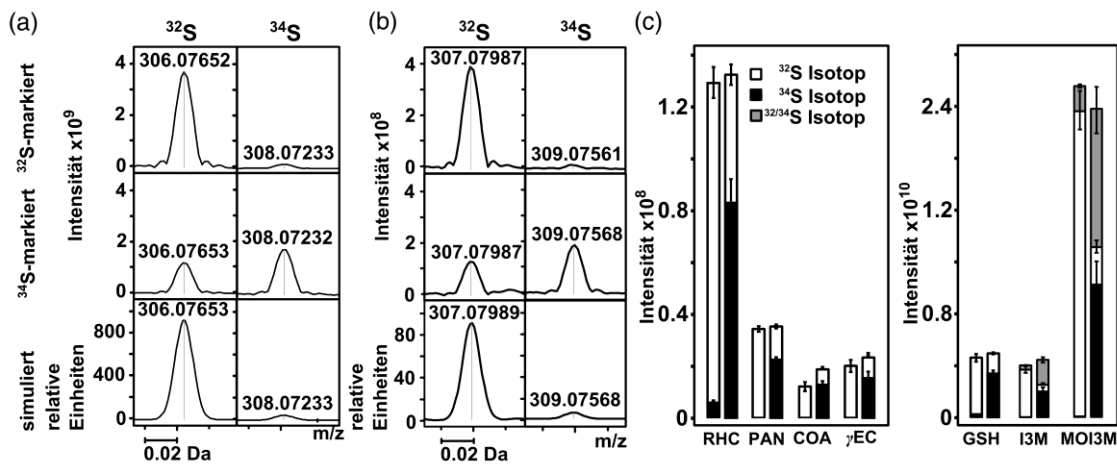


Abbildung 2.13 Detektion von Schwefelmetaboliten in Rohextrakten von *Arabidopsis*-Keimlingen.

Für die Messung wurden die Pflanzenextrakte 1:25 verdünnt und bei negativer Ionisierung mit 1000 Scans aufgezeichnet.

(a) Isotopenverhältnis von ^{32}S - (oben) und ^{34}S -markiertem Glutathion (mittig). Die Massenverschiebung beträgt für die ^{34}S -monoisotope Masse 1.995796 amu. Das simulierte Isotopenmuster von Glutathion (unten) stimmt mit den experimentellen Daten überein, die Abweichung beträgt 0,02 ppm.

(b) $^{13}\text{C}_1$ -Isotop von Glutathion der in (a) gezeigten Analyse. Die 10-fach geringere Signalintensität korrelierte mit der natürlichen Wahrscheinlichkeit von $^{13}\text{C}_1$ mit 1,1 % je C-Atom der Verbindung.

(c) Isotopenverteilung der Schwefelmetaboliten γ -Glutamylcystein (γEC), S-Ribosylhomocystein (RHC), Pantethein (PAN), Coenzym A (CoA), Glutathion (GSH), Glucobrassicin (I3M) und Methoxyglucobrassicin (MOI3M) innerhalb der in (a) gezeigten Analyse.

Republished from Exploring the *Arabidopsis* sulfur metabolome, Gläser *et al.*, The Plant Journal 77, 1. Copyright © (2014) John Wiley and Sons.

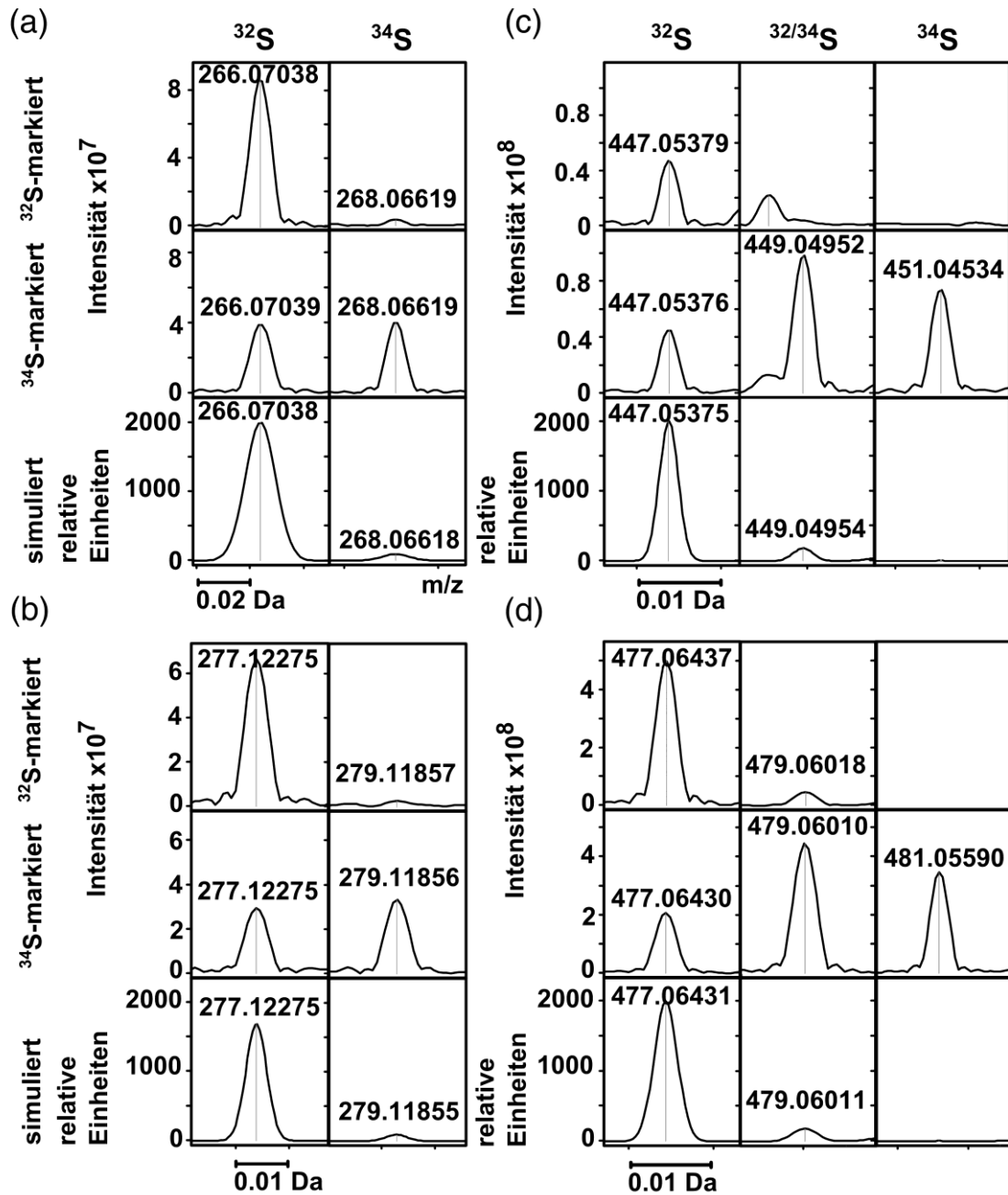


Abbildung 2.14 Isotopenverhältnis von Schwefelmetaboliten in ³²S- und ³⁴S-markierten *Arabidopsis*-Keimlingen

Isotopenverhältnis von den ³²S- (oben) und ³⁴S-markierten (mittig) Schwefelmetaboliten S-Ribosylhomocystein (a), Pantethein (b), Glucobrassicin (c) und Methoxyglucobrassicin (d). Die Massenverschiebung beträgt je ³⁴S-Isotope der Verbindung 1.995796 amu. Die Datenaufnahme erfolgte mit 500 Scans bei negativer Ionisierung in einer 1:25 Verdünnung der Pflanzenextrakte.

Republished from Exploring the *Arabidopsis* sulfur metabolome, Gläser *et al.*, The Plant Journal 77, 1. Copyright © (2014) John Wiley and Sons.

2.3 Identifikation, Charakterisierung und Verifizierung von Schwefelmetaboliten auf Basis massenspektrometrischer Daten

Hochauflösende Massenspektrometrie in Kombination mit stabiler Isotopenmarkierung hat die Möglichkeiten der Proteom- und Metabolomanalyse grundlegend gewandelt (Smith 2000; Allwood *et al.*, 2012). Die Methode ermöglicht die simultane Analyse einer komplexen Probenmatrix ohne vorhergehende, chromatographische Trennung. Die akkurate Detektion monoisotoper Massen organischer Ionen erlaubt die Zuordnung von singulären Summenformeln, welche die Identifikation bekannter sowie unbekannter Metaboliten unterstützen (Hegeman *et al.*, 2007; Matsuda *et al.*, 2009a; Saito und Matsuda 2010). Zur systematischen Auswertung der experimentellen, massenspektrometrischen Daten wurde eine Routine zur Selektion der Kandidatenmassen aus den Massenspektren benötigt. Hierbei ist die Charakterisierung von bekannten und unbekanntem Schwefelmetaboliten zu unterscheiden. Zur Annotation bekannter Schwefelverbindungen wurde eine Schwefelbiomarkerliste erstellt, welche mit den massenspektrometrischen Daten abgeglichen werden konnte. Hierzu wurden bekannte *Arabidopsis*-assoziierte Schwefelmetaboliten mit Hilfe von *open-source*-Datenbanken gesammelt und zusammengestellt. Zur Ermittlung unbekannter Schwefelmetaboliten wurde ein Algorithmus zur spezifischen Suche von Schwefelmassen, basierend auf den Charakteristika der etablierten Isotopenmarkierung, entwickelt.

2.3.1 *Open-source*-Datenbanken

Die genutzten Datenbankressourcen wurden unterschieden in organismisch orientierte Stoffwechselweg-Datenbanken, Metabolit-Annotationsdatenbanken und chemische Strukturdatenbanken.

Stoffwechselweg-Datenbanken stellen Organismen-spezifisch Informationen zu bekannten Stoffwechselwegen zur Verfügung und beinhalten metabolische Reaktionen sowie deren Substrate und Produkte. Basierend auf spezifischen Suchkriterien können hier schwefelhaltige Metaboliten, welche postuliert, beschrieben oder nachgewiesen sind ausgelesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Datenbanken KEGG, KNApSAcK und AraCyc zur

Zusammenstellung der bekannten, *Arabidopsis*-assoziierten Schwefelmetaboliten verwendet.

KEGG ist eine umfassende Datenbank zu post-Genom-Analyse, welche vor allem für die systematische Analyse von Genfunktionen und deren Netzwerken entwickelt wurde (<http://www.genome.jp/kegg/>; Goto *et al.*, 1997; Kanehisa 1997). Die Datenbank ist in die Teilbereiche systemische, genomische, chemische und medizinische Informationen gegliedert. Die systemischen Informationen umfassen die Darstellung der Netzwerke von interagierenden Molekülen. Genomische Informationen sind alle Gene, welche auf der Basis sequenzierter Genome identifiziert wurden. Die chemischen Informationen sind die Zusammenstellung aller chemischer Substanzen, welche an den Reaktionen der beschriebenen Organismen beteiligt sind und die medizinischen Information befassen sich gezielt mit Erkrankungen und Arzneistoffen (Kanehisa *et al.*, 2010). Im Kontext dieser Arbeit war die Datenbank der chemischen Informationen von vorrangigem Interesse. Die Datenbank ermöglicht die Suche spezifischer Substanzen und bietet Informationen zu Struktur und assoziierten Reaktionen. Es ist allerdings kein Auslesen der vollständigen Datenbankinhalte oder eine organismenspezifische Einschränkung innerhalb der Metabolitsuche möglich (Goto *et al.*, 1998, Goto *et al.*, 2000). Die Datenbankinhalte werden aus dem weitreichenden Datenbanknetzwerk von DBGET und DBLink rekrutiert (Fujibuchi *et al.*, 1998). Aktuell enthält die Datenbank Informationen zu über 16.000 Substanzen, welche über 2.100 Schwefelmetaboliten beinhalten (Altman *et al.*, 2013). Da sich KEGG vorwiegend auf die Analyse von systemischen Zusammenhängen in Organismen auf enzymatischer Ebene spezialisiert hat, war die Datenbank zur Identifikation von *Arabidopsis* zugeordneten Schwefelmetaboliten nur sehr eingeschränkt nutzbar.

KNApSAcK wurde zur Assoziation von Organismen mit deren endogenen Metaboliten, insbesondere für Arznei- und Nutzpflanzen, auf der Basis von wissenschaftlicher Literatur entwickelt (<http://kanaya.naist.jp/KNApSAcK/>; Shinbo *et al.*, 2006). In der Datenbank werden über 20.000 Spezies und über 50.000 publizierte Metaboliten geführt (Afendi *et al.*, 2012). Die Datenbankinhalte können beispielsweise anhand von Organismen, Molekularmassen, molekularer Komposition und Metabolitnamen durchsucht werden. Die

vollständigen Inhalte der Datenbank können außerdem unabhängig in tabellarischer Form abgespeichert werden. Für *Arabidopsis* sind 625 Metaboliten gelistet, davon 88 Schwefelmetaboliten.

MetaCyc ist eine Referenzdatenbank für metabolische Stoffwechselwege, diese katalogisiert involvierte Enzyme, Substrate und Produkte basierend auf experimentell bestätigten Daten aus der Literatur für gegenwärtig mehr als 2500 Organismen (<http://metacyc.org/>; Krieger *et al.*, 2004). Die Datenbankinhalte können in Abhängigkeit der Spezifikation der Metabolitsuche, wie Name, molekularer Komposition oder monoisotoper Masse ausgelesen werden. Die Datenbank umfasst etwa 12.000 nicht redundante Metaboliten (Krieger *et al.*, 2004; Altman *et al.*, 2013).

Als Ableger von MetaCyc ist eine Familie von organismenspezifischen Datenbanken entstanden, welche unabhängig von MetaCyc gepflegt werden. AraCyc wurde als *Arabidopsis*-spezifische Datenbank auf der Basis der Daten aus MetaCyc aufgebaut und ergänzt. AraCyc umfasst über 2600 *Arabidopsis*-assoziierte Metaboliten (<http://www.plantcyc.org/>; Mueller *et al.*, 2003).

Metabolit-Annotationsdatenbanken verfügen über eine integrierte Suchroutine mit der Massenlisten direkt mit der Datenbank abgeglichen werden können. Sie greifen auf externe Datenbankquellen zur Massenannotation zu. Die Datenbankinhalte können nicht ausgelesen werden. Für die Metabolitannotation der massenspektrometrischen Daten wurden die Datenbanken Metlin und MassTRIX eingesetzt.

Metlin beinhaltet strukturelle und physikalische Informationen zu biologischen Substanzen, innerhalb eines Massenbereichs von 100-1200 amu verknüpft mit experimentellen, massenspektrometrischen Daten (Smith *et al.*, 2005; <http://metlin.scripps.edu/index.php>). Bei der Annotation von Massensignalen können Ionisierungsprodukte berücksichtigt werden und es besteht die Möglichkeit metabolitspezifische Fragmentierungsanalysen einzusehen und abzugleichen. Die Metabolitinformationen sind außerdem unmittelbar mit KEGG verknüpft und können so in einen biologischen Kontext gesetzt werden. Da die Suche auf 500 Massensignale beschränkt ist eignet sich Metlin nicht zur Analyse von Rohdaten.

MassTRIX wurde 2008 entwickelt um die Verknüpfung massenspektrometrischer Daten mit biologischen Prozessen zu erleichtern (<http://masstrix3.helmholtz-muenchen.de/masstrix3/start.html>; Suhre und Schmitt-Kopplin 2008). MassTRIX ermöglicht die direkte Annotation massenspektrometrischer Rohdaten basierend auf den Inhalten der Datenbanken KEGG, HMDB, Lipidmaps und MetaCyc (Kanehisa und Goto 2000; Krieger *et al.*, 2004; Sud *et al.*, 2007; Wishart *et al.*, 2009). Die Annotation erfolgt organismenspezifisch basierend auf den in KEGG und MetaCyc zugeordneten Metabolitinformationen. Außerdem ist es möglich die Daten mit eigenen Massenlisten abzugleichen und ausgewählte Ionisierungsaddukte in die Auswertung mit einzubeziehen.

Chemische Strukturdatenbanken bieten vielfältige Informationen zu bekannten und beschriebenen, chemischen Substanzen, nicht nur biologischer Natur. Hier können Suchen anhand von Summenformeln, systematischen Namen und Trivialnamen, aber auch von Strukturen durchgeführt werden. Diese Datenbanken sind vor allem für die Charakterisierung unbekannter Massen mit determinierten Summenformeln interessant.

ChemSpider ist eine Strukturdatenbank der Royal Society of Chemistry, welche 30 Millionen Substanzinformationen aus 470 Quellen mit ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften sammelt und zur Verfügung stellt (<http://www.chemspider.com/>). Mit Hilfe der Suchfunktion können einzelne Massen unter Berücksichtigung von elementarer Komposition, Ladung, Ionisierungsaddukten sowie weiterer physikalischer und chemischer Parameter mit der Datenbank abgeglichen werden. Im Kontext mit der Literatur erleichtern so chemische Strukturdatenbanken die Annotation von, im organismischen Rahmen nicht beschriebener Kandidatenmassen aus hochauflösenden, massenspektrometrischen Daten (Little *et al.*, 2012).

2.3.2 Schwefelbiomarker in *Arabidopsis thaliana*

Die Zusammenstellung *Arabidopsis*-spezifischer Schwefelbiomarker erfolgte zur gezielten Annotation von Schwefelmetaboliten zu den massenspektrometrischen Daten. Eine eigene Biomarker-Datenbank hatte den Vorteil, dass sie gezielt auf die Bedürfnisse des Projekts angepasst werden konnte.

Wenngleich die Annotationsleistung von MassTRIX und Metlin sehr umfassend war, sollte die Zuordnung insbesondere für die Schwefelmarkierung um ^{34}S -heteroisotope und –monoisotope Massen, sowie für das $^{13}\text{C}_1$ -Isotop und Ionisierungsaddukte ergänzt werden (Matsuda *et al.*, 2009a).

Mit Hilfe der Datenbanken der MetaCyc-Familie und KNApSAcK konnten 436 *Arabidopsis*-assoziierte Schwefelmetaboliten gefunden werden. Da die Datenbanken zum Teil Massen und Summenformeln ionisierter Verbindungen beinhalten, mussten alle Verbindungen überprüft werden und zu neutralen Summenformeln umgewandelt werden, damit eine korrekte Annotation der Massen möglich war und isomere Strukturen identifiziert werden konnten. Hierzu erfolgte außerdem ein Abgleich mit den Strukturinformation aus ChemSpider. Die gefundenen Schwefelmetaboliten repräsentierten in der Biomarkerliste 359 nicht redundante Summenformeln, 77 Substanzen sind Isomere. 157 der gefundenen Verbindungen, inklusive 42 Isomeren, sind Derivate von CoA, welche ausschließlich in einem Massenbereich von 680 bis 1200 amu liegen. Die Mehrheit der nicht-CoA-assoziierten Schwefelmetaboliten ist dem gegenüber niedermolekular.

Auf Basis der Datenbankinhalte wurde das bekannte *Arabidopsis*-Schwefelmetabolom mit Trivialnamen und Synonymen sowie Summenformel, monoisotoper Masse, Strukturformel und Isomeren katalogisiert (Anhang 8.1). Darauf aufbauend wurde eine Biomarkerliste, jeweils für negative und positive Ionisierung zum systematischen Abgleich mit den Massenspektren isotopenmarkierter Keimlinge erstellt. Zur Annotation der massenspektrometrischen Daten musste berücksichtigt werden, dass zum einen isomere Strukturen nicht unterschieden werden können und zum anderen nicht alle gesammelten Metaboliten zu jedem Zeitpunkt im Schwefelmetabolom vorhanden sind, wie es beispielweise für Glucosinolate gezeigt wurde (Petersen *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2003). Außerdem enthält die Liste mitunter publizierte Vorstufen und Derivate von Schwefelmetaboliten, wie Desulfoglucosinolate, welche in bestimmten Mutanten akkumulieren nicht aber im Wildtyp (siehe 2.4.2.3 und 2.4.4) (Mugford *et al.*, 2009; Mugford *et al.*, 2010). Die Biomarkerliste enthält neben den monoisotopen Massen der gesammelten Schwefelmetaboliten für positive und negative Ionisierung in der ICR-FT/MS-Analyse, auch deren $^{13}\text{C}_1$ - und $^{34}\text{S}_{1-n}$ -Isotope jeweils für ein- bis dreifache Ladung sowie häufige Addukte

ERGEBNISSE

der Ionisierung (Tabelle 2.2 und Tabelle 2.3). Insbesondere die Suche nach heteroisotopen Zuständen von ^{34}S wird in den Metabolit-Annotationsdatenbanken nicht unterstützt, diese sind aber erforderlich um zwischen einer zufälligen Übereinstimmung der Masse und einer markierten Schwefelmasse zu unterscheiden. Die Biomarkerlisten umfassen 9300 Massen in negativer Ionisierung und 10.016 Massen in positiver Ionisierung welche mit den Massenspektren abgeglichen werden.

Tabelle 2.2 Massenberechnung der Addukte von Schwefelmetaboliten bei negativer Ionisierung

Ladung	C-Isotop	S-Isotop	Addukt	m/z
-1	12	32	m-H	m-1.00728
-1	12	34 ₁	m-H	m+0.98852
-1	12	34 ₂	m-H	m+2.98431
-1	12	34 ₃	m-H	m+4.98011
-2	12	32	m-2H	(m-2.01456)/2
-2	12	34 ₁	m-2H	(m-0.01876)/2
-2	12	34 ₂	m-2H	(m+1.97703)/2
-2	12	34 ₃	m-2H	(m+3.97283)/2
-3	12	32	m-3H	(m-3.02184)/3
-3	12	34 ₁	m-3H	(m-1.02604)/3
-3	12	34 ₂	m-3H	(m+0.96975)/3
-3	12	34 ₃	m-3H	(m+2.96555)/3
-1	13	32	m-H	m-0.00393
-1	13	34 ₁	m-H	m+1.99187
-1	13	34 ₂	m-H	m+3.98767
-1	13	34 ₃	m-H	m+5.98346
-2	13	32	m-2H	(m-1.01130)/2
-2	13	34 ₁	m-2H	(m+0.98450)/2
-2	13	34 ₂	m-2H	(m+2.98030)/2
-2	13	34 ₃	m-2H	(m+4.97609)/2
-3	13	32	m-3H	(m-2.01849)/3
-3	13	34 ₁	m-3H	(m-0.02269)/3
-3	13	34 ₂	m-3H	(m+1.97311)/3
-3	13	34 ₃	m-3H	(m+3.96890)/3
-1	12	32	m-H ₂ O-H	m-19.01839
-1	12	32	m+Na-2H	m+20.97467
-1	12	32	m+Cl	m+34.96940
-1	12	32	m+K-2H	m+36.94861
-1	12	32	m+FA-H	m+44.99820
-1	12	32	m+Hac-H	m+59.01385
-1	12	34	m-H ₂ O-H	m-17.02259
-1	12	34	m+Na-2H	m+22.97047
-1	12	34	m+Cl	m+36.96520
-1	12	34	m+K-2H	m+38.94440
-1	12	34	m+FA-H	m+46.99400
-1	12	34	m+Hac-H	m+61.00964

ERGEBNISSE

Tabelle 2.3 Massenberechnung der Addukte von Schwefelmetaboliten bei positiver Ionisierung

Ladung	C-Isotop	S-Isotop	Addukt	m/z
+1	12	32	m+H	m+1.00728
+1	12	34 ₁	m+H	m+3.00308
+1	12	34 ₂	m+H	m+4.99887
+1	12	34 ₃	m+H	m+6.99467
+2	12	32	m+2H	(m+2.01456)/2
+2	12	34 ₁	m+2H	(m+4.01036)/2
+2	12	34 ₂	m+2H	(m+6.00615)/2
+2	12	34 ₃	m+2H	(m+8.00195)/2
+3	12	32	m+3H	(m+3.02184)/3
+3	12	34 ₁	m+3H	(m+5.01764)/3
+3	12	34 ₂	m+3H	(m+7.01342)/3
+3	12	34 ₃	m+3H	(m+9.00923)/3
+1	13	32	m+H	m+2.01064
+1	13	34 ₁	m+H	m+4.00644
+1	13	34 ₂	m+H	m+6.00223
+1	13	34 ₃	m+H	m+7.99803
+2	13	32	m+2H	(m+3.01792)/2
+2	13	34 ₁	m+2H	(m+5.01372)/2
+2	13	34 ₂	m+2H	(m+7.00951)/2
+2	13	34 ₃	m+2H	(m+9.00531)/2
+3	13	32	m+3H	(m+4.02519)/3
+3	13	34 ₁	m+3H	(m+6.02100)/3
+3	13	34 ₂	m+3H	(m+8.01678)/3
+3	13	34 ₃	m+3H	(m+10.01259)/3
+1	12	32	m+NH ₄	m+18.03382
+1	12	32	m+Na	m+22.98922
+1	12	32	m+CH ₃ OH+H	m+33.03349
+1	12	32	m+K	m+38.96316
+1	12	32	m+2Na-H	m+44.97116
+1	12	32	m+Ac	m+59.01330
+1	12	32	m+2K+H	m+76.91904
+1	12	34	m+NH ₄	m+20.02962
+1	12	34	m+Na	m+24.98502
+1	12	34	m+CH ₃ OH+H	m+35.02929
+1	12	34	m+K	m+40.95896
+1	12	34	m+2Na-H	m+46.96696
+1	12	34	m+Ac	m+61.00910
+1	12	34	m+2K+H	m+78.91483

Durch Anwendung der Schwefelbiomarker auf die massenspektrometrischen Daten konnte eine Zuordnung von Schwefelmetaboliten zu den detektierten Massen erfolgen. Der Abgleich der Massenspektren mit den Schwefelbiomarkern wurde mittels eines MATLAB-Programms (MathWorks GmbH, Ismaning), programmiert und zur Verfügung gestellt von B. Kanawati (Analytische Biogeochemie, Helmholtz Zentrum München), durchgeführt. Hierbei wurde eine Massenvarianz von 1 ppm toleriert.

Um die Zuordnung eines Schwefelmetaboliten zu einer experimentellen Masse zu bestätigen musste gezeigt werden, dass die experimentelle Masse biologischen Ursprungs ist und den folgenden chemischen Parametern des

Biomarkers entspricht. Demzufolge mussten Schwefelmarkierung sowie bestenfalls natürliche Isotope Zustände vorhanden sein. Die Zuordnung eines Schwefelbiomarkers wurde angenommen, wenn die experimentellen Daten die Anwesenheit der Monoisotopen ^{32}S -Masse im ^{32}S - und im ^{34}S -markierten Spektrum sowie jeweils die $^{34}\text{S}_{1-n}$ -Masse im ^{34}S -markierten Spektrum zeigten. Die Anwesenheit der $^{13}\text{C}_1$ -Masse konnte die Zuordnung zusätzlich untermauern. Die korrespondierenden Massenspektren wurden mit 1000 Scans bei positiver und negativer Ionisierung aufgezeichnet und zur Verifizierung der Isotopenverschiebung der annotierten Schwefelbiomarker herangezogen.

In *Arabidopsis*-Keimlingen des Wildtyps Columbia (Col-0) konnten 31 Schwefelbiomarker bei negativer Ionisierung und 18 bei positiver Ionisierung gefunden werden (Tabelle 2.4 und Tabelle 2.5). Wobei unter den negativ ionisierten Metaboliten drei der 25 Massen mit isomeren Verbindungen assoziiert werden konnten und 17 der annotierten Massen Glucosinolate waren. Bei positiver Ionisierung waren wiederum 12 der zugeordneten Metaboliten Glucosinolate oder deren Derivate. Für die bestätigten, annotierten Massen war die absolute Abweichung von den Monoisotopen Massen bei negativer und positiver Ionisierung kleiner 0,6 ppm.

ERGEBNISSE

Tabelle 2.4 Annotierte Schwefelbiomarker in *Arabidopsis*-Extrakten bei negativer Ionisierung

Schwefelmetabolit	Addukt	Monoisotope Masse	Detektierte Masse	Ladung	Varianz [ppm]	Summenformel
Alliin	m+FA-H	222.04417	222.04426	-1	0.42739	C6H11NO3S
	m+Hac-H	236.05982	236.05981	-1	0.02161	C6H11NO3S
S-Methyl-5-thio-D-Ribose	m+Hac-H	239.05948	239.05948	-1	0.00335	C6H12O4S
γ -Glutamylcystein (γ EC)	m-H	249.05506	249.05505	-1	0.04979	C8H14N2O5S
2-(2-methylthio)ethylmalat	m+FA-H	253.03875	253.03876	-1	0.05770	C7H12O5S
	m+Hac-H	267.05440	267.05440	-1	0.01723	C7H12O5S
S-Ribosyl-L-Homocystein (RHC)	m-H	266.07038	266.07039	-1	0.04473	C9H17NO6S
2-(3-methylthio)propylmalat	m+FA-H	267.05440	267.05439	-1	0.02022	C8H14O5S
	m+Hac-H	281.07005	281.07006	-1	0.05194	C8H14O5S
Pantethein (PAN)	m-H	277.12275	277.12274	-1	0.02923	C11H22N2O4S
2-(4-methylthio)butylmalat	m+FA-H	281.07005	281.06999	-1	0.19746	C9H16O5S
Glutathiondisulfid (GSSG)	m-H	305.06870	305.06871	-2	0.02917	C20H32N6O12S2
Glutathion (GSH)	m-H	306.07653	306.07653	-1	0.01274	C10H17N3O6S
	m+Na-2H	328.05847	328.05848	-1	0.02408	C10H17N3O6S
	m+K-2H	344.03241	344.03241	-1	0.00610	C10H17N3O6S
Homoglutathion	m-H	320.09218	320.09221	-1	0.10560	C11H19N3O6S
Dephospho-CoA	m-H	342.56716	342.56722	-2	0.17807	C21H35N7O13P2S
Coenzyme A	m-H	382.55032	382.55022	-2	0.27238	C21H36N7O16P3S
Acetyl-CoA	m-H	403.55561	403.55558	-2	0.06591	C23H38N7O17P3S
Glucoiberverin (3MTP)	m-H	406.03056	406.03055	-1	0.03448	C11H21NO9S3
Glucoerucin (4MTB)	m-H	420.04621	420.04625	-1	0.08547	C12H23NO9S3
Glucoiberin (3MSOP)	m-H	422.02548	422.02566	-1	0.42983	C11H21NO10S3
Gluconasturtiin (2PE)	m-H	422.05849	422.05828	-1	0.50467	C15H21NO9S2
Glucoberteroin (5MTP)	m-H	434.06186	434.06192	-1	0.12855	C13H25NO9S3
Indolylmethylglutathion	m-H	435.13438	435.13438	-1	0.01080	C19H24N4O6S
Glucoraphanin (4MSOB)	m-H	436.04113	436.04118	-1	0.11765	C12H23NO10S3
Glucobrassicin (I3M)	m-H	447.05374	447.05379	-1	0.10737	C16H20N2O9S2
	m+Na-2H	469.03569	469.03595	-1	0.55859	C16H20N2O9S2
	m+K-2H	485.00963	485.00960	-1	0.05773	C16H20N2O9S2
	m+FA-H	493.05922	493.05880	-1	0.85791	C16H20N2O9S2
Glucolesquerellerin (6MTH)	m-H	448.07751	448.07759	-1	0.16917	C14H27NO9S3
	m+Hac-H	508.09865	508.09863	-1	0.02992	C14H27NO9S3
Glucoalyssin (5MSP)	m-H	450.05678	450.05685	-1	0.15820	C13H25NO10S3
7-methylthioheptylglucosinolat (7MTH)	m-H	462.09316	462.09321	-1	0.09890	C15H29NO9S3
	m+FA-H	508.09865	508.09863	-1	0.03011	C15H29NO9S3
Hydroxyglucobrassicin (OHIMG)	m-H	463.04866	463.04865	-1	0.01296	C16H20N2O10S2
Glucohesperin (6MSOH)	m-H	464.07243	464.07249	-1	0.13188	C14H27NO10S3
8-Methylthiooctylglucosinolat (8MTO)	m-H	476.10881	476.10881	-1	0.00903	C16H31NO9S3
Methoxyglucobrassicin (MOI3M)	m-H	477.06431	477.06431	-1	0.00692	C17H22N2O10S2
Glucoibarin (7MSH)	m-H	478.08808	478.08811	-1	0.06505	C15H29NO10S3
Glucohirsutin (8MSOO)	m-H	492.10373	492.10376	-1	0.06320	C16H31NO10S3

ERGEBNISSE

Tabelle 2.5 Annotierte Schwefelbiomarker in *Arabidopsis*-Extrakten bei positiver Ionisierung

Schwefelmetabolit	Addukt	Monoisotope Masse	Detektierte Masse	Ladung	Varianz [ppm]	Summenformel
5-Methylthiopentanonitriloxid	m+K	184.01929	184.01932	+1	0.14727	C6H11NOS
9-Methylthiononanonitriloxid	m+H	202.12602	202.12604	+1	0.12270	C10H19NOS
	m+Na	224.10795	224.10792	+1	0.14814	C10H19NOS
	m+K	240.08189	240.08191	+1	0.06998	C10H19NOS
S-Acetyldihydroliipoamid	m+H	234.09809	234.09809	+1	0.01623	C10H19NOS2
	m+Na	256.08002	256.08006	+1	0.13980	C10H19NOS2
	m+K	272.05396	272.05401	+1	0.16835	C10H19NOS2
S-Methyl-5-thioadenosin	m+H	298.09684	298.09687	+1	0.09963	C11H15N5O3S
Glutathion (GSH)	m+H	308.09109	308.09108	+1	0.01980	C10H17N3O6S
	m+Na	330.07302	330.07307	+1	0.13906	C10H17N3O6S
	m+2Na+H	352.05497	352.05497	+1	0.01108	C10H17N3O6S
Pantethein (PAN)	m+K	317.09319	317.09328	+1	0.29613	C11H22N2O4S
Glucoraphanin (4MSOB)	m+K	476.01157	476.01131	+1	0.53927	C12H23NO10S3
	m+2K+H	513.96745	513.96733	+1	0.23095	C12H23NO10S3
Glucoerucin (4MTB)	m+2K+H	497.97253	497.97249	+1	0.08856	C12H23NO9S3
Glucoiberin (3MSOP)	m+2K+H	499.95180	499.95193	+1	0.26283	C11H21NO10S3
Glucoberteroin (5MTP)	m+2K+H	511.98818	511.98807	+1	0.22305	C13H25NO9S3
Glucobrassicin (I3M)	m+2K+H	524.98006	524.97996	+1	0.19429	C16H20N2O9S2
Glucosquerellerin (6MTH)	m+2K+H	526.00383	526.00353	+1	0.57832	C14H27NO9S3
7-Methylthioheptylglucosinolat (7MTH)	m+2K+H	540.01948	540.01941	+1	0.13759	C15H29NO9S3
Glucosesperin (6MSOH)	m+2K+H	541.99875	541.99873	+1	0.03469	C14H27NO10S3
8-Methylthiooctylglucosinolat (8MTO)	m+2K+H	554.03513	554.03495	+1	0.33265	C16H31NO9S3
Methoxyglucobrassicin (MOI3M)	m+2K+H	554.99063	554.99047	+1	0.28235	C17H22N2O10S2
Glucoibarin (7MSH)	m+2K+H	556.01440	556.01420	+1	0.35773	C15H29NO10S3
Glucohirsutin (8MSOO)	m+2K+H	570.03005	570.02981	+1	0.41910	C16H31NO10S3

2.3.3 Massenspektren basierte Identifikation unbekannter Schwefelmassen

Die hohe Auflösung der ICR-FT/MS resultierte in Spektren mit über 12.000 Signalen in Rohextrakten von *Arabidopsis*-Keimlingen. Diese große Menge an Daten erfordert effiziente Filter um die, für die Analysen, relevante Information auszulesen. Eine nützliche Methode für den Vergleich zweier Probengruppen, wie ³²S- und ³⁴S-isotopenmarkierter Extrakte, ist die hierarchische Clusteranalyse (HCA). Mit ihrer Hilfe können die Massen innerhalb eines Probenclusters in relativen Bezug zueinander gesetzt werden und ein charakteristisches Profil bilden, welches mit dem Profil des anderen Clusters verglichen werden kann (Janz *et al.*, 2010). So werden die spezifischen Unterschiede beider Probengruppen herausgestellt, wie im Fall der Isotopenmarkierung die ³⁴S-assoziierten Massen, welche in den markierten Proben eine höhere

Abundanz zeigen (Abbildung 2.15a). Hierzu wurden alle reproduzierbaren Massen zweier Probencluster aus ^{32}S - und ^{34}S -Markierung mit jeweils zwei biologischen und zwei technischen Replikaten in einer Matrix zusammengefasst.

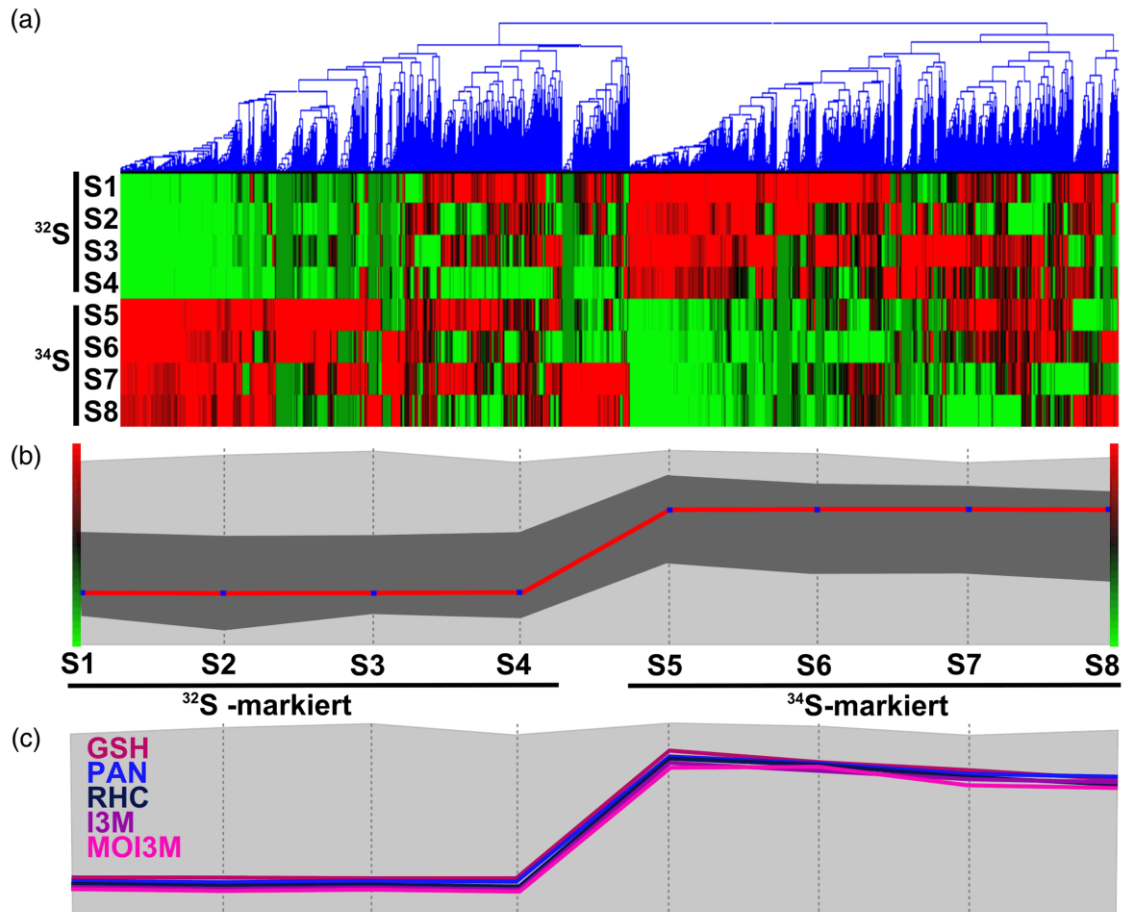


Abbildung 2.15 Hierarchische Clusteranalyse reproduzierbarer Massen in Keimlingsextrakten
 (a) Dendrogramm der hierarchischen Clusteranalyse (HCA), basierend auf dem euklidischen Abstand der reproduzierbaren Massen zweier Probencluster aus ^{32}S - und ^{34}S -Markierung. Die zugrunde liegende Matrix erlaubt eine Abweichung von bis zu 1 ppm in der Massenzuordnung und enthält 12.199 reproduzierbare Massen. Hochabundante Massen sind in rot dargestellt, geringe Abundanz in grün.
 (b) Profilbasierte Suche innerhalb der Clusteranalyse aus (a). ^{34}S -spezifische Massen werden mit einem Profil von niedriger zu hoher Signalintensität im ^{34}S -markierten Probencluster selektiert, gezeigt durch die rote Linie. 1534 Massen entsprechen mit einer Pearsonschen Korrelation von 0.9 dem vorgegebenen Profil, gezeigt durch die dunkelgraue Fläche.
 (c) Spezifische Profile der Schwefelmetaboliten Glutathion (GSH), Pantethein (PAN), S-Ribosylhomocystein (RHC), Glucobrassicin (I3M) und Methoxyglucobrassicin (MOI3M) in der HCA.
 Republished from Exploring the *Arabidopsis* sulfur metabolome, Gläser *et al.*, The Plant Journal 77, 1. Copyright © (2014) John Wiley and Sons.

Die Matrix wurde innerhalb eines Toleranzbereichs von 1 ppm Massenübereinstimmung erstellt. Wenngleich die Varianz einzelner Massen bei der Analyse deutlich kleiner als 1 ppm war bestand die Möglichkeit, dass innerhalb

eines Probenclusters bei einer restriktiveren Matrix eine Trennung zueinander gehörender Massen auftrat. Die verwendete Matrix zur Identifikation aller Schwefelmassen des Probenclusters umfasste in einem Versuchsansatz rund 12.200 reproduzierbare Massen. Innerhalb einer HCA ist es möglich durch ein vorgegebenes Profil Massen, die mit diesem Profil übereinstimmen zu ermitteln. Die ^{34}S -spezifischen Massen konnten demnach mit einem Profil von niedriger Abundanz in den ^{32}S -assoziierten Proben zu hoher Abundanz in den ^{34}S -assoziierten Proben gefunden werden (Abbildung 2.15b). Die Profilsuche selektierte 1534 Massen aus den 12.200 erfassten Signalen, welche charakteristisch für den ^{34}S -Probencluster waren. Am Beispiel von erwarteten, bekannten Schwefelmassen konnte die Effizienz der Profilsuche überprüft werden. Abbildung 2.15c zeigt das Profil der Schwefelmetaboliten GSH, PAN, RHC, I3M und MOI3M, welche in der Profilsuche gefunden werden konnten. Zur weiteren Eingrenzung der 1534 Kandidaten als Schwefelmassen musste für diese zunächst die Massenverschiebung von ^{34}S zu ^{32}S berechnet werden. Hierbei wurde eine mögliche Anzahl von bis zu drei Schwefelatomen berücksichtigt. Auf Basis der bekannten Schwefelverbindungen aus *Arabidopsis* wurde keine höhere Anzahl von Schwefelatomen innerhalb einer Verbindung erwartet (siehe Anhang 8.1). Die berechneten ^{32}S -Massen wurden mit dem ^{32}S -Spektrum abgeglichen. 520 der 1534 Massen konnten im Spektrum als putative Schwefelmetaboliten, basierend auf der Isotopenmassenverschiebung des Schwefels, bestätigt werden (Abbildung 2.16a). Diese Schwefelmassen können sowohl Isotope, als auch Addukte der Ionisierung enthalten. Durch die Ionisierung kann ein einzelner Metabolit in vielfachen Addukten oder auch Fragmenten im Massenspektrum auftreten (Draper *et al.*, 2009; Bowen und Northen 2010; Krue *et al.*, 2013). Um diese Abkömmlinge der Schwefelmetaboliten zu isolieren ist eine Zuordnung einer organischen Summenformel notwendig. Ausgehend von einer Verbindungskomposition von $\text{C}_{0-100}\text{H}_n\text{N}_{0-6}\text{O}_{0-80}\text{P}_{0-4}\text{S}_{1-3}$ bei einfacher Ladung und negativer Ionisierung wurden chemische Summenformeln für gültig erachtet, die eine Übereinstimmung mit der Masse im Rahmen von 0,5 ppm aufwiesen. Hierdurch konnten 231 Massen der Matrix mit Summenformeln verknüpft werden. Die Summenformelberechnung erstellt mögliche, molekulare Kompositionen der Elemente C, H, N, O, P und S basierend auf den experimentellen Massen, der Bindigkeit der

Elemente und der tolerierten Abweichung. Diese errechneten Summenformeln erheben nicht den Anspruch natürliche oder mögliche Kompositionen zu sein. Die „seven golden rules“ beschreiben einen Maßstab zur Bewertung organischer Summenformeln und ihrer Wahrscheinlichkeit (siehe 1.2.2) (Kind und Fiehn 2007). Die Regeln wurden auf der Grundlage von über 68.000 reellen, organischen Summenformeln entwickelt und ermöglichen die Selektion und Zuordnung von existierenden Kompositionen. Die „seven rules“ wurden im Folgenden zur Auswahl der Summenformeln mit möglicher, organischer Zusammensetzung angewendet. Durch anschließende Überprüfung der Isotopenmuster und der Anzahl der im Spektrum vorhandenen Schwefelisotope konnte die Summe der Kandidaten auf 121 eingegrenzt werden. Diese beinhalteten 21 bekannte Schwefelmetaboliten die bereits auf Basis der Schwefelbiomarker identifiziert wurden.

Alternativ zur matrixbasierten Identifikation des Schwefelmetaboloms mittels HCA wurde eine Methode für den paarweisen Vergleich zweier ^{32}S - und ^{34}S -markierter Spektren entwickelt, welche die spezifische Massenverschiebung des Schwefels verwendet. Zur automatisierten Identifikation der Schwefelmassen wurde der S-CALC Algorithmus in MATLAB programmiert (Gläser *et al.*, 2014). Basierend auf der Isotopenverteilung von ^{32}S und ^{34}S in markierten Keimlingen wurden stabile Parameter selektiert, durch welche die biologischen Schwefelmassen charakterisiert werden. Diese Parameter wurden in den folgenden Formeln zusammengefasst. Wobei die Signale des ^{32}S -Isotops ($signal^{32\text{S}}$) und des ^{34}S -Isotops ($signal^{34\text{S}}$) einer detektierten Masse i jeweils im ^{32}S - und ^{34}S -markierten Spektrum, $[]_{32\text{S}}$ bzw. $[]_{34\text{S}}$ verglichen werden.

Formel 2.1 Auswahl der ^{32}S -Signale putativer Schwefelmassen

$$0 < [signal_i^{32\text{S}}]_{34\text{S}} < [signal_i^{32\text{S}}]_{32\text{S}}$$

Formel 2.2 Verifikation der Isotopenmassenverschiebung durch ^{34}S

$$[signal_i^{32\text{S}}]_{34\text{S}} < [signal_i^{34\text{S}}]_{34\text{S}}$$

Mit Hilfe des Algorithmus findet ein Vergleich eines korrespondierenden Paares zweier Massenspektren, jeweils mit ^{32}S - und ^{34}S -Markierung, statt. Die zur

Berechnung der Schwefelmassenverschiebung verwendeten Daten sind alle Massen, die in beiden Spektren vorhanden sind und deren Intensität im ^{32}S -Spektrum größer ist als im ^{34}S -Spektrums (Formel 2.1). Dies muss aufgrund der beobachteten Isotopenverteilung für jede ^{32}S -monoisotope Masse gültig sein. So können beide Analysen auch gleichzeitig als biologische Replikate angesehen werden. Der Abgleich der Massen miteinander berücksichtigt hier sowie im Folgenden eine Abweichung der Massen von 1 ppm. Für jede der selektierten Massen wird die Massenverschiebung des Schwefels für $^{34}\text{S}_{1-3}$ berechnet. Die berechneten Massen werden nun mit dem ^{34}S -markierten Spektrum verglichen und alle gefundenen Massen und deren korrespondierende Intensitäten werden selektiert. Schließlich werden die ^{34}S -selektierten Massen im ^{32}S -Spektrum gesucht und die Intensitäten verglichen. Für eine Schwefelmasse gilt, dass die Intensität im ^{34}S -Spektrum für die ^{34}S -Masse größer sein muss als im ^{32}S -Spektrum (Formel 2.2). Des Weiteren gilt für alle markierten Massen, die mehr als eine Massenverschiebung zeigen, dass alle heteroisotopen Zustände vorhanden sein müssen. Hier wird auf die Detektion von $^{34}\text{S}_1$ selektiert. Da die Auswahl der Massen keinen strikten Vergleich der Intensitäten anhand der zu erwartenden, anteiligen Verhältnisse zwischen ^{32}S und ^{34}S führt können in den Ergebnissen falsch-positive enthalten sein. Allerdings ist das Risiko Kandidaten zu übergehen aufgrund zu strenger Selektion noch weniger wünschenswert.

Für die gleichen Proben die zuvor mit HCA analysiert wurden, wurde S-CALC zur Berechnung der Schwefelmassen angewendet. Dabei wurden 648 Massen identifiziert, welche die durch die Formeln beschriebenen Voraussetzungen erfüllten (Abbildung 2.16b). Zur weiteren Charakterisierung der Kandidatenmassen wurde hier, analog zur HCA, die Berechnung von Summenformeln, resultierend in 306 Kandidaten und deren Verifizierung durch die „seven rules“, durchgeführt. Abschließend konnten 136 Massen Schwefelverbindungen zugeordnet werden (Tabelle 2.6). So konnten durch Analyse mit S-CALC gegenüber der HCA 15 zusätzliche Kandidatenmassen als Schwefelmetaboliten identifiziert werden.

Mit einem Kontrollversuch sollte der zu erwartenden Anteil von Schwefelmassen in der Summe der detektierten Massen bestimmt werden um die Vollständigkeit der vorangegangenen Analysen zu bewerten. Hierzu wurden aus

allen reproduzierbaren Massen eines ^{32}S -Spektrums jeweils 1000 zufällig gewählte Massen auf die Charakteristika einer Schwefelmasse untersucht.

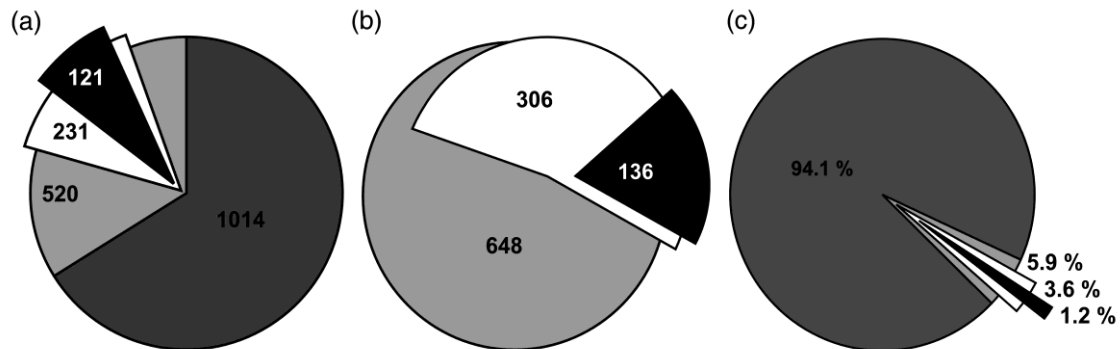


Abbildung 2.16 Identifikation von Schwefelmassen in Keimlingsextrakten von *Arabidopsis*.

(a) Basierend auf einer hierarchischen Clusteranalyse (HCA) wurden 1534 aus 12.199 reproduzierbaren Massen als charakteristisch für einen Probencluster mit ^{34}S -Markierung gegenüber der ^{32}S -Markierung selektiert. Von diesen zeigten 520 eine Massenverschiebung des Schwefelisotops von 1,995796 amu (hellgrau). 231 der 520 gefundenen Massen können durch eine organische Summenformel beschrieben werden (weiß), welche sich im Originalspektrum für 121 Massen anhand der, mit der Anzahl der Schwefelatome korrespondierenden Massenverschiebung und durch die Abundanz von $^{13}\text{C}_1$ bestätigen ließen.

(b) Bestimmung der Schwefelmassen allein durch Berechnung der Massenverschiebung von ^{32}S zu ^{34}S innerhalb eines Probenpaares. 648 übereinstimmende Massen aus Berechnung und Massenspektrum wurden aus 12.199 reproduzierbaren Massen selektiert. Die Annotation von Summenformeln resultierte in 306 Kandidaten aus 648, von denen 136 in ihrer Komposition mit den Massenspektren übereinstimmten.

(c) Häufigkeit und Verteilung von Schwefelmassen durch Untersuchung einer fünffachen Zufallsauswahl von jeweils 1000 Massen einer ICR-FT/MS-Analyse von Pflanzenextrakten. Für die zufällig selektierten Massen aus den ^{32}S -Spektrums wurde die Massenverschiebung für $^{34}\text{S}_{1-3}$ berechnet und im ^{34}S -Spektrum abgeglichen. 94,1 % der überprüften Massen zeigen keine Übereinstimmung der berechneten Massen (dunkelgrau). Für 59 Massen konnte eine entsprechende Massenverschiebung zugeordnet werden (hellgrau). Bei visueller Prüfung der Spektren bezüglich der Intensitätsverteilung der korrespondierenden Massen konnte das schwefelspezifische Isotopenmuster für 3,6 % ($\pm 0,6$ %, weiß) gefunden werden. Durch die abschließende Errechnung zugehöriger Summenformeln wurden 120 Schwefelverbindungen unter 1000 Massen ($1,2$ % $\pm 0,2$ %, schwarz) identifiziert.

Republished from Exploring the *Arabidopsis* sulfur metabolome, Gläser *et al.*, The Plant Journal 77, 1. Copyright © (2014) John Wiley and Sons.

Für alle 1000 Massen wurde die Schwefelmassenverschiebung von 1,9958 amu berechnet und mit den detektierten Massen des entsprechenden ^{34}S -Spektrums abgeglichen. Die zufällige Selektion von 1000 Massensignalen aus derselben Matrix und deren Auswertung wurden in fünffacher Wiederholung durchgeführt. Für 5,9 % ($\pm 0,6$ %) der berechneten ^{34}S -Massen konnte eine korrespondierende Masse innerhalb einer Toleranz von 1 ppm zugeordnet werden. Die visuelle Prüfung des Isotopenmusters der Schwefelmassenpaare ergab, dass nur 3,6 % ($\pm 0,6$ %) die markierungsspezifischen Merkmale der Massenverschiebung zeigten, wie sie durch Formel 2.1 und Formel 2.2 beschrieben wurden. Analog zu den vorangegangenen Versuchen wurden Summenformeln für die Kandidatenmassen berechnet. Daraus resultierte ein

Anteil an Schwefelverbindungen von 1,2 % (\pm 0,2 %). Dies entspricht 146 echten Schwefelmassen aus einer Matrix von rund 12.200 untersuchten Massen (Abbildung 2.16c). Dieser Anteil der Schwefelmassen zeigte, dass sowohl die HCA mit 121 Massen (1 %), als auch die Berechnung mit s-CALC von 136 Massen (1,1 %) aus 12.200 Massen mindestens 80 % der vorhandenen Schwefelmassen identifizieren konnten. Schwefelmassen, welche anhand der Filtermethoden nicht selektiert wurden, zeigten niedrige Intensitäten im Massenspektrum ($< 10^8$) und vor allem eine geringe Signifikanz in der HCA, so dass eine automatisierte Selektion nicht eindeutig möglich war. Analog wurde diese Analyse auch mittels positiver Ionisierung durchgeführt, wobei 55 Massen als Schwefelverbindungen beschrieben werden konnten (Tabelle 2.7).

Zur Identifikation von Schwefelmassen wurde für alle folgenden Analysen die s-CALC Methode angewendet, da diese direkt Datensätze von Rohdaten verarbeiten kann. Hierbei war zu beachten, dass die Schwefelmassen jeweils aus einem korrespondierenden Paar von ^{32}S - und ^{34}S -Spektrum resultieren. Des Weiteren wurde durch die s-CALC-Berechnung eine höhere Spezifität in der Selektion der Kandidatenmassen erreicht, so dass die Anzahl der manuell zu verifizierenden Signale erheblich geringer war als für die HCA. Die selektierten Schwefelmassen wurden als Massenliste aus dem ^{32}S -Spektrum selektiert und konnten für vergleichende Analysen weiterverarbeitet werden.

ERGEBNISSE

Tabelle 2.6 Verifizierte Schwefelmassen aus *Arabidopsis thaliana* mit zugeordneten Summenformeln (< 5 ppm) bei negativer Ionisierung.

Dargestellt ist die Summenformel mit der geringsten Abweichung, bei Verfügbarkeit von alternativen Summenformeln wurde diese mit einem Stern markiert.

Republished from Exploring the *Arabidopsis* sulfur metabolome, Gläser *et al.*, The Plant Journal 77, 1. Copyright © (2014) John Wiley and Sons

ID	Detektierte Masse [m-H]	Varianz [ppm]	Summenformel	ID	Detektierte Masse [m-H]	Varianz [ppm]	Summenformel
1	195.03326	0.01128	C6H12O5S	69	437.04102	0.34917	C16H14N4O9S
2	209.04891	0.01866	C7H14O5S	70	438.13410	0.15064	C19H25N3O7S
3	210.00780	0.10762	C5H9NO6S	71	439.07643	0.02801	C17H22N4O4P2S
4	218.01287	0.04633	C7H9NO5S	72	442.10255	0.04252	C20H23N5O2P2S*
5	223.02821	0.12465	C7H12O6S	73	444.13683	0.20129	C16H31NO9S2
6	233.02379	0.11015	C7H10N2O5S	74	447.05380	0.14204	C16H20N2O9S2
7	234.04415	0.04615	C8H13NO5S	75	448.07760	0.19148	C14H27NO9S3
8	236.02343	0.00678	C7H11NO6S	76	450.05686	0.17776	C13H25NO10S3
9	236.05983	0.08472	C8H15NO5S	77	450.99483	0.33881	C14H8N6O10S
10	237.04383	0.02573	C8H14O6S	78	451.07041	0.04582	C20H20O10S
11	238.05436	0.10866	C11H13NO3S	79	458.15245	0.13140	C17H33NO9S2
12	239.02308	0.05104	C7H12O7S	80	460.13174	0.19429	C16H31NO10S2
13	239.05948	0.02886	C8H16O6S	81	462.09324	0.16577	C15H29NO9S3
14	247.02817	0.02915	C9H12O6S	82	463.04874	0.18033	C16H20N2O10S2
15	248.05980	0.03023	C9H15NO5S	83	464.07252	0.21182	C14H27NO10S3
16	249.05507	0.03252	C8H14N2O5S	84	465.01035	0.17261	C25H11N2O4P5S
17	251.05947	0.02231	C9H16O6S	85	465.14511	0.37064	C20H26N4O7S
18	252.05473	0.00000	C8H15NO6S	86	474.99562	0.44527	C18H15N4O4P3S
19	253.03874	0.02529	C8H14O7S	87	476.10882	0.01554	C16H31NO9S3
20	254.07037	0.01653	C8H17NO6S	88	477.06427	0.07483	C17H22N2O10S2
21	260.02355	0.47457	C9H11NO6S	89	478.00488	0.17678	C16H20NO8P3S
22	264.05473	0.00000	C9H15NO6S	90	478.08808	0.01903	C15H29NO10S3
23	265.03874	0.00415	C9H14O7S	91	478.15410	0.00648	C23H29NO8S
24	266.07039	0.04059	C9H17NO6S	92	488.03368	0.20921	C13H26N5O3P3S3
25	268.08602	0.03133	C9H19NO6S	93	492.10379	0.13696	C16H31NO10S3
26	271.04930	0.02988	C8H16O8S	94	493.11742	0.07787	C23H26O10S
27	271.07178	0.01869	C6H16N4O6S	95	493.97884	0.50184	C14H21N5O4P4S3
28	272.00567	0.00515	C10H11NO4S2	96	493.99985	0.07490	C16H20NO9P3S
29	277.12275	0.04078	C11H22N2O4S	97	496.97712	0.06238	C19H15O10P5S2
30	280.97622	0.26835	C11H6O7S	98	504.00761	0.08690	C16H22N5O2P3S3*
31	281.03370	0.15514	C9H14O8S	99	504.02855	0.28689	C13H26N5O4P3S3
32	285.01868	0.00526	C10H10N2O6S	100	505.02384	0.20098	C12H25N6O4P3S3
33	288.06597	0.02430	C10H15N3O5S	101	505.06338	0.19087	C27H26P4S*
34	289.06126	0.18197	C9H14N4O5S	102	509.97377	0.06765	C20H10N5O6P5S2*
35	304.06089	0.05591	C10H15N3O6S	103	510.19157	0.04253	C23H33N3O8S
36	305.04490	0.03475	C10H14N2O7S	104	514.16540	0.12661	C25H29N3O7S
37	306.07653	0.01732	C10H17N3O6S	105	520.00261	0.24769	C16H22N5O3P3S3
38	307.08569	0.00488	C12H20O7S	106	520.89041	0.02419	C15H9O13P3S
39	309.06490	0.16922	C11H18O8S	107	520.99785	0.21958	C15H21N6O3P3S3
40	314.99462	0.34985	C8H13O9PS	108	521.01884	0.03167	C12H25N6O5P3S3
41	315.02926	0.07079	C11H12N2O7S	109	521.03743	0.31456	C20H21N4O5P3S
42	320.09219	0.06592	C11H19N3O6S	110	522.86143	0.02397	C14H8O12P4S
43	326.07038	0.01779	C14H17NO6S	111	534.06759	0.07153	C21H22N5O6P5S2*
44	337.92653	0.21129	C14H4N3P3S	112	535.02305	0.28896	C16H24N6O3P4S2*
45	338.04861	0.03195	C10H17N3O6S2	113	536.02602	0.24327	C21H19N3O8S3
46	341.08472	0.22516	C11H22N2O6S2	114	536.87704	0.05588	C15H10O12P4S
47	343.01062	0.13411	C11H15N4OP3S	115	536.99279	0.25959	C15H21N6O4P3S3
48	343.97185	0.18693	C11H7NO10S	116	537.92384	0.22829	C19H13NO8P4S
49	352.07079	0.06135	C12H19NO9S	117	544.09642	0.22128	C22H29NO9P2S
50	358.98448	0.09722	C14H11N4P3S	118	545.01992	0.33210	C28H10N4O7S*
51	367.07043	0.00409	C13H20O10S	119	545.05187	0.01284	C18H25N6O4P3S2*
52	368.00591	0.01014	C12H14N5OP3S	120	547.07086	0.11260	C31H21N2O2P5S2*
53	376.89965	0.35553	C14H5O5P3S	121	548.00542	0.28595	C16H27NO8P4S2*
54	378.95311	0.11664	C16H7N4P3S	122	550.96501	0.10188	C16H13N2O16PS*
55	390.02907	0.41458	C17H13NO8S	123	550.99700	0.12123	C17H23N4O5P3S3
56	402.08988	0.21637	C13H25NO9S2	124	552.85090	0.07850	C18H6O11P4S
57	406.03061	0.11305	C11H21NO9S3	125	560.07036	0.35174	C20H30N5O2P3S3
58	407.01914	0.15921	C16H12N2O9S	126	561.02583	0.25667	C18H30O8P4S2*
59	416.10550	0.14492	C14H27NO9S2	127	561.08654	0.00451	C16H33N6O4P3S3
60	416.91799	0.47707	C20H4O5P2S	128	562.04209	0.47025	C14H33NO10P4S2
61	418.08477	0.16623	C13H25NO10S2	129	571.97407	0.10000	C21H12N5O9P5S2*
62	420.04625	0.08737	C12H23NO9S3	130	575.00949	0.19652	C34H15N2P3S*
63	422.02555	0.16800	C11H21NO10S3	131	577.06055	0.16081	C16H38O8P4S3*
64	425.08068	0.12656	C13H22N4O8S2	132	578.01604	0.17024	C17H29NO9P4S2*
65	430.12113	0.08974	C15H29NO9S2	133	593.05562	0.06273	C33H22O5S3*
66	434.06194	0.17855	C13H25NO9S3	134	612.04180	0.19607	C36H15N5S3*
67	435.13446	0.20476	C19H24N4O6S	135	612.99734	0.23817	C34H15O6P5S2*
68	436.04119	0.13577	C12H23NO10S3	136	636.13937	0.02924	C33H29N5O3P2S*

ERGEBNISSE

Tabelle 2.7 Verifizierte Schwefelmassen aus *Arabidopsis thaliana* mit zugeordneten Summenformeln (< 5 ppm) bei positiver Ionisierung.

Dargestellt ist die Summenformel mit der geringsten Abweichung, bei Verfügbarkeit von alternativen Summenformeln wurde diese mit einem Stern markiert.

Republished from Exploring the *Arabidopsis* sulfur metabolome, Gläser *et al.*, The Plant Journal 77, 1. Copyright © (2014) John Wiley and Sons

ID	Detektierte Masse [m+H]	Varianz [ppm]	Summenformel
1	234.09809	0.04119	C10H19NOS2
2	258.03830	0.39061	C7H16NO3PS2
3	298.09683	0.02020	C11H15N5O3S
4	302.11694	0.12819	C12H19N3O4S
5	306.04085	0.48323	C7H16NO8PS
6	308.09106	0.07229	C10H17N3O6S
7	309.09445	0.24149	C19H16O2S
8	320.94662	0.45946	C9H5O9PS
9	330.06052	0.24677	C10H22NO3P3S
10	346.03804	0.15477	C16H11NO6S
11	365.06676	0.49003	C10H21O10PS
12	399.14452	0.01959	C15H22N6O5S
13	400.14792	0.28662	C24H21N3OS
14	436.14020	0.28267	C14H30NO10PS
15	437.07787	0.12704	C15H21N2O9PS
16	444.01503	0.33092	C16H14NO10PS
17	444.03016	0.41894	C15H19N5OP2S3
18	460.00768	0.40566	C10H13N5O12S2
19	460.02502	0.28452	C15H19N5O2P2S3
20	461.13538	0.11649	C15H29N2O10PS
21	476.00259	0.50948	C12H20N3O7P3S2
22	476.12947	0.32202	C13H25N5O12S
23	478.09133	0.30686	C20H19N3O9S
24	480.16863	0.06136	C23H29NO8S
25	481.99854	0.35427	C13H11N3O15S
26	487.01522	0.03416	C22H14O9S2
27	492.10725	0.25331	C21H21N3O9S
28	496.01414	0.24485	C14H13N3O15S
29	497.97255	0.27084	C13H19N5O2P4S3
30	498.97591	0.00562	C12H17N6O4P3S3
31	499.95175	0.07776	C28H7NOP2S2*
32	500.09266	0.17793	C19H27N5OP2S3*
33	501.04824	0.28438	C17H27O7P3S2*
34	509.00611	0.09252	C14H20N6O3P4S2
35	511.98820	0.26498	C14H21N5O2P4S3
36	516.08764	0.29859	C19H27N5O2P2S3*
37	516.17993	0.07299	C25H29N3O7S
38	517.02561	0.30542	C23H16O10S2
39	517.18329	0.20187	C34H28O3S*
40	524.97997	0.13321	C13H12N6O11S3
41	526.00373	0.03086	C15H23N5O2P4S3
42	532.10369	0.00678	C21H26NO11PS*
43	538.06123	0.00819	C14H31N5O3P4S3
44	539.01668	0.00409	C11H18N6O13S3*
45	540.01962	0.47680	C16H25N5O2P4S3
46	554.03509	0.14068	C17H27N5O2P4S3*
47	554.05607	0.12766	C14H31N5O4P4S3*
48	554.99056	0.09423	C18H18N6O3P4S2*
49	555.03833	0.31406	C16H25N6O4P3S3
50	556.01424	0.06847	C16H25N5O3P4S3
51	568.17754	0.02433	C17H37N5O10S3*
52	570.02994	0.02249	C17H27N5O3P4S3*
53	571.03334	0.13859	C16H25N6O5P3S3
54	609.20075	0.07629	C22H36N6O10S2*
55	614.91890	0.41081	C25H12O9P2S3

2.4 Vergleichende Analyse des Schwefelmetaboloms in *Arabidopsis*

Die im Vorangegangenen etablierte Methode zur Identifikation von Schwefelmetaboliten bildet die Basis für vergleichende Analysen des Schwefelmetaboloms. So besteht die Möglichkeit gezielt Veränderungen des Schwefelmetabolismus in Abhängigkeit von Ökotypen, Entwicklungsstadien, Umwelteinflüssen und Veränderungen im Metabolismus durch Genmutationen aufzuzeigen und zu charakterisieren. Für den *Arabidopsis* Wildtyp Col-0 konnten 136 Schwefelmetaboliten beschrieben werden. Zur vergleichenden Analyse des Schwefelmetaboloms wurden verschiedene Schwefelmetabolismus-assoziierte Mutanten ausgewählt sowie der Ökotyp Landsberg *erecta* (*Ler-0*) mit sowohl bekannten als auch unbekanntem metabolischen Veränderungen. Dabei wurden die Genfamilien der ATP-Sulfurylasen (ATPS), der Adenosin-Phosphosulfat-Reduktasen (APR) und die der Adenosin-Phosphokinase (APK) untersucht als Kernkomponenten der primären Sulfatassimilation in der Pflanze (Abbildung 1.2). Als Bindeglied zwischen primärem und spezialisiertem Schwefelmetabolismus wurden die Glutathionmetabolismus-assoziierten Genfamilien der γ -Glutamyltransferasen (GGT) und der Phytochelatinsynthasen (PCS) untersucht. Aus dem spezialisierten Schwefelmetabolismus wurden die an der Indolglucosinolat-synthese beteiligten P450 Zytochrome CYP79B2 und CYP79B3 analysiert.

Abbildung 2.17 zeigt am Beispiel der bekannten Schwefelmetaboliten aus Tabelle 2.4 zusammenfassend die Varianz der untersuchten Linien im Vergleich zum Wildtyp Col-0. Jeder Datenpunkt stellt den relativen Unterschied der mittleren Intensität der monoisotopen ^{32}S -Masse von drei biologischen Replikaten zur korrespondierenden mittleren Intensität von Col-0 dar. Wobei die absolute Abundanz von Col-0 auf 100 % gesetzt wurde. Ein dunkleres Feld zeigt eine erhöhte Abundanz gegenüber Col-0 an, ein helles Feld eine verringerte Abundanz. Einzelne Schwefelmetaboliten waren bis zu 100-fach gegenüber dem Wildtyp reduziert, wie die meisten Glucosinolate in der Doppelmutante von APK1 und APK2 sowie in der Dreifachmutante von APK1, APK2 und APK4 (*apk TR3*). Die Akkumulation von Schwefelmetaboliten war demgegenüber weniger deutlich, hier war lediglich eine Zunahme der Intensität um das Vierfache zu beobachten. Im Allgemeinen war zu sehen, dass nur

ERGEBNISSE

wenige der untersuchten Linien einen umfassenden Einfluss auf die Abundanz der bekannten Schwefelmetaboliten zeigten und vor allem im Bereich der primären Schwefelassimilation eine hohe Redundanz innerhalb der Genfamilien präsent war. Im Folgenden soll auf die Ergebnisse der untersuchten Linien im Detail eingegangen werden.

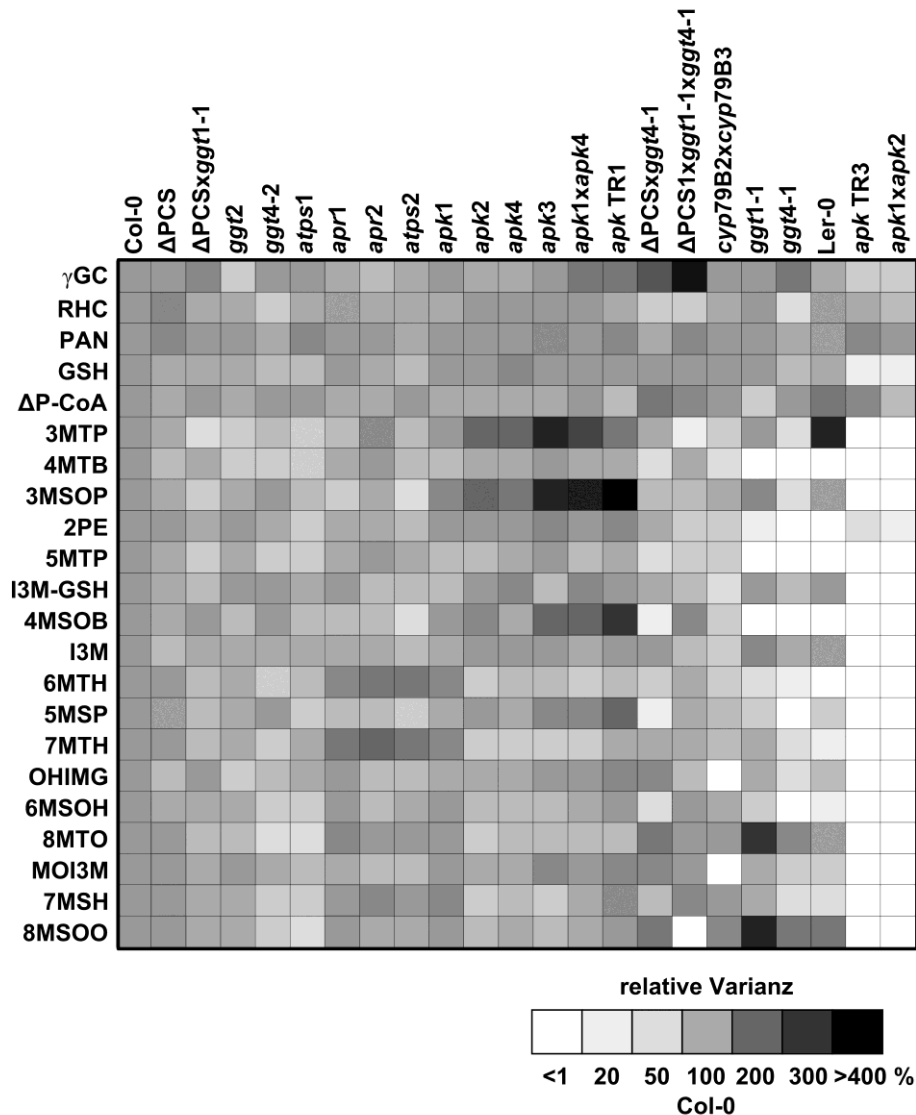


Abbildung 2.17 Varianz bekannter Schwefelmetaboliten in den analysierten *Arabidopsis*-Mutanten und dem Ökotyp Ler-0 im Vergleich zum Wildtyp Col-0

Einfluss des Funktionsverlusts unterschiedlicher Gene des Schwefelmetabolismus und des Ökotyps Ler-0 auf die Abundanz bekannter Schwefelmetaboliten (Tabelle 2.4). Bei den analysierten Linien handelt es sich um Mutanten der Schwefelmetabolismus assoziierten Enzyme der Adenosin-Phosphosulfat-Kinasen (*apk*), ATP-Sulfurylasen (*atps*), Adenosinphosphosulfat-Reduktasen (*apr*), Phytochelatinsynthasen (Δ PCS), γ -Glutamyl-Transferasen (*ggt*) und P450 Zytochrom (*cyp*). Die Varianz wurde je Schwefelmetabolit als relative Abweichung zur Signalintensität des Wildtyps (100 %) bei negativer Ionisierung dargestellt. Die die verwendeten Mittelwerte setzen sich aus den Analysen von drei biologischen Replikaten zusammen.

Zur vergleichenden Analyse zweier Linien wurden Keimlinge für 14 Tage auf 375 μM $\text{Na}_2^{32}\text{SO}_4$ bzw. $\text{Na}_2^{34}\text{SO}_4$, angezogen. Nach serieller Extraktion der Keimlinge wurde der Extrakt in 1:25-Verdünnung mittels ICR-FT/MS bei 300-1000 akkumulierten Scans analysiert. Anhand der Massenspektren wurden zunächst für alle Replikate mittels S-CALC die Schwefelmassen selektiert. Diese wurden anschließend in einer Matrix mit 100-500 reproduzierbaren Schwefelkandidatenmassen zusammengefasst und mit HCA auf spezifische Veränderungen ihrer Abundanz gegenüber dem Wildtyp analysiert. Alle relativ zum Wildtyp akkumulierten oder reduzierten Massen, welchen eine organische Summenformel zugeordnet werden konnte, wurden in den korrespondierenden Massenspektren überprüft. Hierbei dienten die spezifische Abundanz in der Mutante, die Schwefelmassenverschiebung und die Anwesenheit von $^{13}\text{C}_1$ sowie deren Übereinstimmung mit der erwarteten Abundanz durch die annotierte Summenformel als Grundlage für die Annahme einer Masse als echte Schwefelmasse. Spezifisch selektierte Massen, welche nicht mit einer bekannten Schwefelverbindung annotiert werden konnten, bei nicht nachweisbarem, oder nicht zur Summenformel passendem $^{13}\text{C}_1$, aufgrund mangelnder Argumente für die annotierte molekulare Komposition nicht weiter berücksichtigt. Die Versuche wurden üblicherweise wenigstens zweimal mit vergleichbarem Ergebnis durchgeführt. In den vergleichenden Analysen wurden Änderungen als charakteristisch angesehen, wenn die Abundanz gegenüber dem Wildtyp wenigstens eine Änderung um den Faktor 2 zeigte.

2.4.1 Differentieller Schwefelmetabolismus in *Arabidopsis*-Ökotypen

Der Modelorganismus *Arabidopsis thaliana* bildet die Referenz für die genetische und molekulare Forschung höherer Pflanzen, basierend auf der Verfügbarkeit der vollständigen, genomischen Sequenz und einer umfassenden Auswahl an T-DNA-Insertionslinien, welche die funktionale Analyse einzelner Gen-Loci stützen (Meinke *et al.*, 1998; Izawa *et al.*, 2003). Neben diesen erzeugten Genvarianten bildet die natürliche Variation des *Arabidopsis*-Genoms, welche für unterschiedliche Ökotypen gefunden werden kann eine wichtige Quelle für das Verständnis von Genfunktionen und Mechanismen der Adaptation und Regulation (Loudet *et al.*, 2007). Für *Arabidopsis* sind über 300 Ökotypen bekannt (Koornneef *et al.*, 2004). Es wurde gezeigt das allein

zwischen zwei Ökotypen 1-2 % der Gene Deletionen aufweisen und etwa 4 % Polymorphismen im Expressionsmuster zeigen (Borevitz *et al.*, 2003a). Diese natürlichen Variationen können, in Abhängigkeit von Funktionsgewinn oder Funktionsverlust, unterschiedliche Auswirkungen auf den Phäno- und Chemotyp der Pflanzen haben. Im Kontext des Schwefelmetabolismus konnte beispielsweise für die Ökotypen Bayreuth (Bay-0) und Shahdara (Sha) eine Korrelation differentieller Sulfatakkumulation mit Polymorphismen in der ATP-Sulfurylase 1 (ATPS1) und der Adenosin-Phosphosulfat-Reduktase 2 (APR2) gezeigt werden (Loudet *et al.*, 2007; Koprivova *et al.*, 2013). Darüber hinaus wurden für 39 *Arabidopsis*-Ökotypen sieben unterschiedliche Glucosinolatprofile beschrieben, welche durch Polymorphismen in drei an der Glucosinolatbiosynthese beteiligten *Loci* bestimmt werden (Kliebenstein *et al.*, 2001b). Der wohl maßgebliche Unterschied der Glucosinolatprofile wird durch zwei 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxigenasen (AOP2 und AOP3) vermittelt, welche als Tandem vorliegen und Ökotyp-spezifisch exprimiert werden (Kliebenstein *et al.*, 2001a) (Abbildung 2.18).

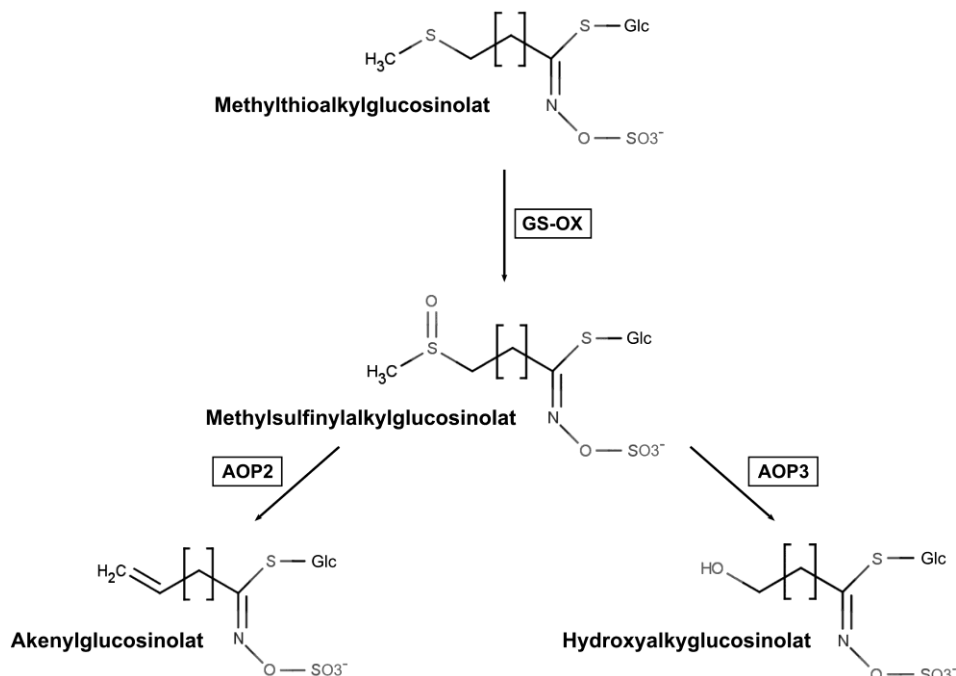


Abbildung 2.18 Die spezifischen Funktionen der 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxigenasen in *Arabidopsis thaliana*.

Die 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxigenasen AOP2 und AOP3 liegen im Arabidopsis-Genom als Tandem vor und werden Ökotypen-spezifisch selektiv exprimiert. Die Folge ist ein Unterschied in der Anreicherung von Glucosinolatspezies. AOP2 exprimierende Ökotypen synthetisieren vor allem Alkenylglucosinolate, AOP3 exprimierende Ökotypen hingegen Hydroxyalkylglucosinolate.

ERGEBNISSE

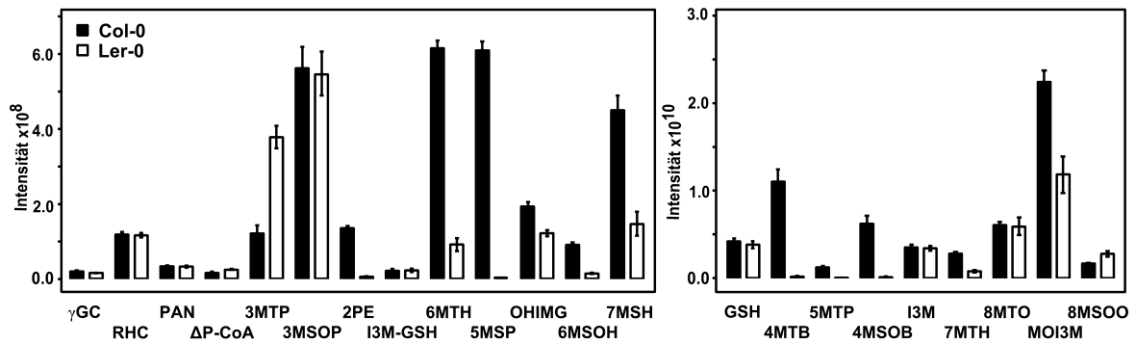


Abbildung 2.19 Natürliche Variabilität bekannter Schwefelmetaboliten in den *Arabidopsis*-Ökotypen Columbia und Landsberg.

Unterschiedliche Abundanz bekannter Schwefelmetaboliten (Tabelle 2.4) in Col-0 und Ler-0. Mittelwerte der absoluten Signalintensitäten des ^{32}S -Isotops [m-H] der bekannten Schwefelmetaboliten von Col-0 (schwarze Balken) und Ler-0 (weiße Balken). Die Anzucht der Keimlinge erfolgte für 14 Tage auf 0,5-fach konzentriertem, mit Agar verfestigtem, schwefelfreiem Medium mit $375\ \mu\text{M Na}_2\text{SO}_4$ supplementiert. Die gezeigten Mittelwerte mit SD setzen sich aus den Analysen von zwei biologischen Replikaten in zweifacher, technischer Wiederholung zusammen. Die Datenaufnahme erfolgte mit 1000 Scans bei negativer Ionisierung und einer 1:25 Verdünnung der Pflanzenextrakte.

Die Glucosinolatverteilung der Ökotypen passt zu den Daten, welche Kliebenstein *et al.* (2001a und 2001b) erhoben haben. Hierbei wird Ler-0 durch die Akkumulation von Hydroxyalkylglucosinolaten charakterisiert, hingegen zeigt Col-0 durch sehr geringe Expression im *Locus* AOP2 und AOP3 vor allem Sulfanylalkylglucosinolate. Weiterhin konnten 23 nicht annotierte Schwefelmassen mit spezifischer Änderung der Abundanz identifiziert werden von denen jeweils 12 akkumuliert und 11 reduziert auftraten (Abbildung 2.20). Durch das bereits beschriebene Ausmaß an natürlicher Variabilität zwischen den Ökotypen können hier die Ursachen für diese spezifischen Veränderungen im Schwefelmetabolom weitreichend sein. Wenigstens fünf Genprodukte, APTS1, APR2, GS-OX, AOP2 und AOP3, zeigen eine Ökotypen-abhängige Expression mit daraus resultierenden metabolischen Effekten (Loudet *et al.*, 2007; Kliebenstein *et al.*, 2001a; Kliebenstein *et al.*, 2001b; Koprivova *et al.*, 2013). Da vor allem Glucosinolate von veränderter Abundanz betroffen waren, wäre es naheliegend weitere, nicht beschriebene Glucosinolat-assoziierte Verbindungen zu finden (Kliebenstein *et al.*, 2001b). Die veränderten Schwefelmetaboliten mit den nominalen Massen 374, 402, 416 und 444 amu haben Summenformeln, welche die Basiseinheit von Glucosinolaten ($\text{C}_7\text{H}_{12}\text{NO}_9\text{S}_2$) enthalten. Die Masse 374, mit der Summenformel $\text{C}_{11}\text{H}_{21}\text{NO}_9\text{S}_2$ entspricht der Basiseinheit mit einem Butylrest, entsprechende Substanzen können auch in ChemSpider gefunden werden (Abbildung 2.21). Die Metaboliten 402, 416 und 444 mit den

2.4.2 *Loss-of-function* Mutationen im primären Schwefelmetabolismus

Die primäre Assimilation des Schwefels in der Pflanze erfolgt mit der Aktivierung des aufgenommenen Sulfats mittels ATP durch ATP-Sulfurylasen (ATPS) zu Adenosin-Phosphosulfat (APS) (Abbildung 1.2). APS kann einerseits durch APS-Reduktasen (APR) weiter zu Sulfit und schließlich zu Cystein reduziert werden, welches zusammen mit Glutathion den Hauptschwefelspeicher der Pflanze bildet (Noctor, Graham *et al.*, 1998; Leustek und Saito 1999; Hell und Wirtz 2011). Alternativ kann APS durch APS-Kinasen (APK) weiter zu Phosphoadenosin-Phosphosulfat (PAPS) phosphoryliert werden, welches vor allem bei der Sulfatierung im spezialisierten Schwefelmetabolismus, wie beispielsweise den Glucosinolaten eine Rolle spielt (Mugford *et al.*, 2009).

2.4.2.1 ATP-Sulfurylasen

In *Arabidopsis* wurden vier funktionale ATP-Sulfurylasen beschrieben ATPS1, ATPS2, ATPS3 und ATPS4 (Leustek *et al.*, 1994; Murillo und Leustek 1995; Hatzfeld *et al.*, 2000). Die Lokalisation der Gene auf jeweils unterschiedlichen Chromosomen zeigt, dass diese nicht unmittelbar das Ergebnis einer Genduplikation sind, welche notwendigerweise Redundanz zur Folge hätte. Es wurde gezeigt, dass die Regulation der vier Isoformen spezifisch ist (Matthewman *et al.*, 2012). So nehmen Mikro-RNA (mi395), induziert durch Schwefelmangel oder Transkriptionsfaktoren, welche in die Kontrolle der Glucosinolatbiosynthese involviert sind (z.B. HAG2, MYB76) als Effektoren unterschiedlichen Einfluss auf die Expression der ATPS-*Loci* (Gigolashvili *et al.*, 2007; Gigolashvili *et al.*, 2008; Kawashima *et al.*, 2009).

ATPS sind lokalisiert im Plastidenstroma und im Cytosol, wobei die reduktive Sulfatassimilation ausschließlich in Plastiden erfolgt (Rotte und Leustek 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei T-DNA-Insertionslinien von ATPS1 und ATPS2 untersucht (Tabelle 4.2). Für die verwendete ATPS1-Linie, bei welcher die Insertion im ersten Intron sitzt, wurde eine Akkumulation von Sulfat gegenüber dem Wildtyp beschrieben und eine um 50 % reduzierte Aktivität (Liang *et al.*, 2010; Kawashima *et al.*, 2011; Koprivova *et al.*, 2013). Aufgrund der Funktion der ATPS in der frühen Sulfatassimilation und der beschriebenen Auswirkungen auf den Sulfatgehalt der Pflanze, wurde für die Analyse des

ERGEBNISSE

Schwefelmetaboloms der ATPS-Mutanten allgemein eine Reduktion der Schwefelmetaboliten durch verringerten Sulfatumsatz erwartet.

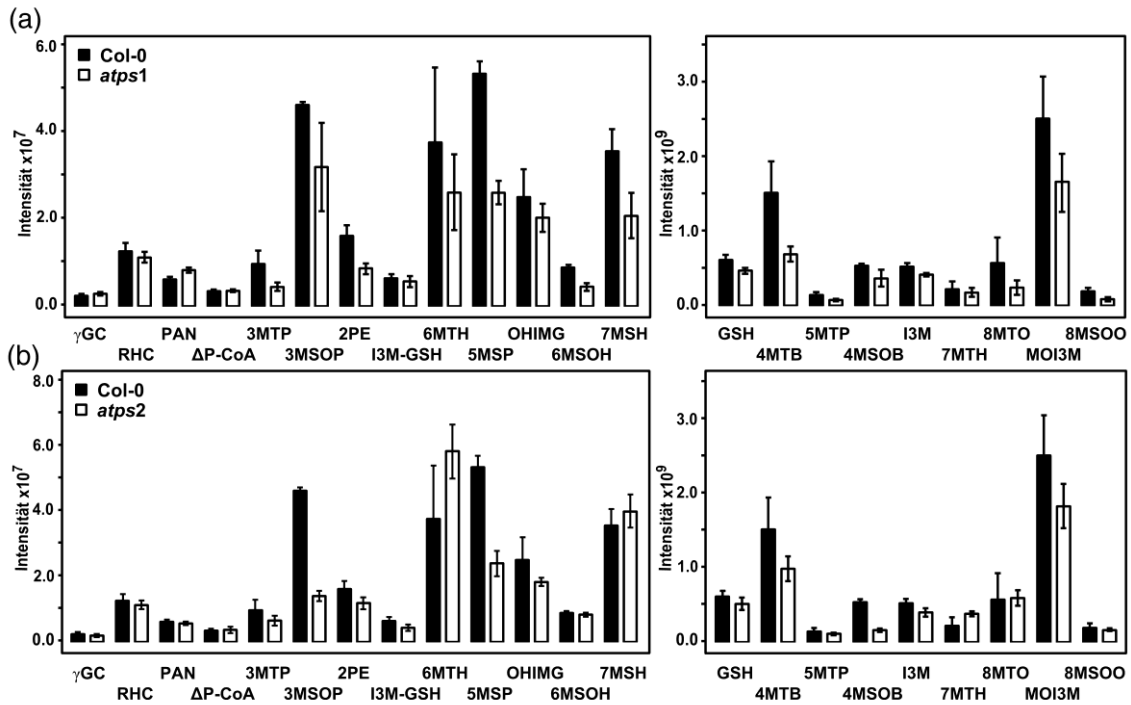


Abbildung 2.22 Variabilität bekannter Schwefelmetaboliten in Abhängigkeit von der Aktivität der ATP-Sulfurylasen

Einfluss von *atps1* (a) und *atps2* (b) auf die Abundanz bekannter Schwefelmetaboliten (Tabelle 2.4). Mittelwerte der absoluten Signalintensitäten des ^{32}S -Isotops [m-H] der bekannten Schwefelmetaboliten von Wildtyp Col-0 (schwarze Balken) und *atps1* bzw. *atps2* (weiße Balken). Die Anzucht der Keimlinge erfolgte für 14 Tage auf 0,5-fach konzentriertem, mit Agar verfestigtem, schwefelfreiem Medium mit $375\ \mu\text{M Na}_2\text{SO}_4$ supplementiert. Die gezeigten Mittelwerte mit SD setzen sich aus den Analysen von zwei biologischen Replikaten in zweifacher, technischer Wiederholung zusammen. Die Datenaufnahme erfolgte mit 300 Scans bei negativer Ionisierung und einer 1:25 Verdünnung der Pflanzenextrakte.

Die ICR-FT/MS-Analyse von *atps1* und *atps2* mit ^{32}S - und ^{34}S -Markierung zeigte nur einen marginalen Effekt auf das bekannte Schwefelmetabolom (Abbildung 2.22a, b). Der erwartete Einfluss auf die primären Produkte der Schwefelassimilation, wie Glutathion, war nicht erkennbar. Allerdings war ein verringerter Anteil an sowohl aliphatischen, als auch Indolglucosinolaten festzustellen. Darüber hinaus konnten für *atps1* drei nicht annotierte Schwefelmassen detektiert werden, welche gegenüber dem Wildtyp etwa zweifach reduziert waren (Abbildung 2.23). Aufgrund von Redundanz innerhalb der ATPS-Familie ließen die Ergebnisse für die Einzelmutanten keine Schlussfolgerungen über etwaige spezifische Aufgaben von ATPS1 oder

ATPS2 innerhalb der Sulfatassimilation unter den Standardanzuchtbedingungen zu, welche eine vertiefende Analyse gerechtfertigt hätten.

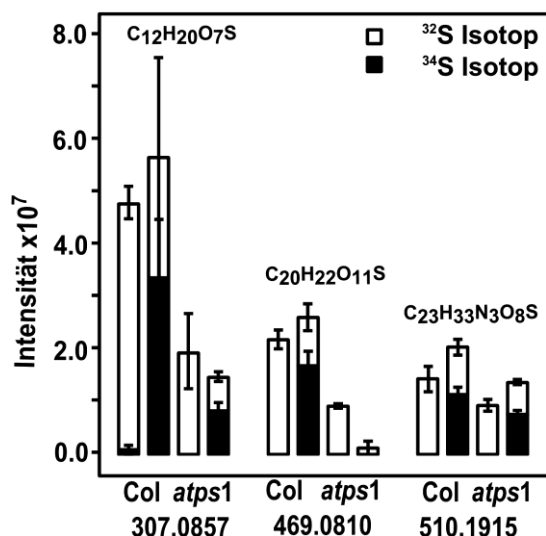


Abbildung 2.23 Veränderte Schwefelmetabolitabundanz in *atps1*

In Abhängigkeit von *atps1* wurden nicht annotierte Schwefelmetaboliten mit veränderter Abundanz zum Wildtyp (Col-0), jeweils in ³²S- und ³⁴S-markierten Keimlingen von *Arabidopsis* detektiert. Die zugeordnete Summenformel entspricht der molekularen Komposition mit der geringsten Massenabweichung gültig für C₀₋₁₀₀H_nN₀₋₆O₀₋₈₀P₀₋₄S₁₋₃ bei einer Ladung von -1 [m-H]. Die gezeigten Mittelwerte mit SD setzen sich aus den Analysen von zwei biologischen Replikaten in zweifacher, technischer Wiederholung für jeweils ³²S- und ³⁴S-Markierung zusammen. Die Datenaufnahme erfolgte mit 300 Scans bei negativer Ionisierung und einer 1:25 Verdünnung der Pflanzenextrakte.

Allgemein ließen die Ergebnisse den Schluss zu, dass die verringerte ATPS-Aktivität zu einer geringeren Verfügbarkeit von APS führt und diese bevorzugt für die Aufrechterhaltung des primären Schwefelmetabolismus und Speichers aufgewendet wird. So kommt es zur Unterversorgung mit PAPS für die Glucosinolatbiosynthese, welches zu verringerten Glucosinolatgehalten führte. Um diese These zu bestätigen wären Analysen der Gehalte von APS und PAPS in den Extrakten nötig. Diese Metaboliten wurden nicht in den ICR-FT/MS-Analysen detektiert. Mutmaßlich ist der endogene Gehalt dieser Substanzen zu gering um sich in der Matrix des Rohextrakts zu behaupten. Der Fluss ist für APS und PAPS verhältnismäßig hoch, da es sich bei APS um ein Intermediat der Sulfatassimilation handelt und bei PAPS um ein Substrat zur Sulfatierung. Der Gehalt von APS im Wildtyp liegt bei 0,7 nmol g⁻¹ Frischgewicht (Mugford *et al.*, 2009). Das entspricht einer Konzentration von 5,6 nM im verdünnten Pflanzenextrakt, welches zu Analyse verwendet wurde. Für gut ionisierende Verbindungen wie GSH liegt die Nachweisgrenze in der

Matrix bei 7 nM, daher kann angenommen werden, dass derartige Konzentrationen von APS möglicherweise nicht mehr erfasst werden können.

2.4.2.2 Adenosin-Phosphosulfat-Reduktasen

In Pflanzen erfolgt die Reduktion von Sulfat zu Sulfit, anders als in Mikroorganismen und Pilzen, nicht durch die Reduktion von PAPS sondern von APS. Dieser Schritt hat die höchste regulatorische Kontrolle über die Sulfatassimilation und wird durch hohe Konzentrationen der Produkte Cystein und Glutathion inhibiert (Vauclare *et al.*, 2002; Loudet *et al.*, 2007). In *Arabidopsis* wurden drei Isoformen von APR identifiziert, welche in Chloroplasten lokalisiert sind (Gutierrez-Marcos *et al.*, 1996; Setya *et al.*, 1996; Suter *et al.*, 2000). Die Gene zeigen eine hohe Homologie in Sequenz und Regulation, insbesondere APR1 und APR3 (Kopriva und Koprivova 2004). Dennoch gibt es Hinweise auf spezifische Funktionen der einzelnen Enzyme basierend auf ihren spezifischen Expressionsmustern in Wurzel und Blüte sowie deren unterschiedlicher Antwort auf die Exposition von Pflanzenhormonen (Koprivova *et al.*, 2008; Kopriva *et al.*, 2009). Die Enzyme sind in zwei Domänen gegliedert, in eine N-terminale PAPS-Reduktase-ähnliche Domäne und eine C-terminale Thioredoxin-ähnliche Domäne. Letztere ist ausschlaggebend für die spezifische APR-Aktivität (Bick *et al.*, 1998; Prior *et al.*, 1999; Weber *et al.*, 2000). Der Verlust von APR1 oder APR2 verursacht eine Abnahme der APR-Aktivität um 20 % bzw. 80 % und führt zu einer Anreicherung von Sulfat sowie zu verringertem Gehalt von reduzierten Schwefelmetaboliten wie Cystein und Glutathion. Dennoch sind die Pflanzen in Wachstum und Entwicklung nicht beeinträchtigt (Koprivova *et al.*, 2002; Loudet *et al.*, 2007; Grant *et al.*, 2011). Zur ICR-FT/MS-Analyse des Einflusses von APR auf das Schwefelmetabolom wurden T-DNA-Insertionslinien von APR1 und APR2 verwendet (Tabelle 4.2).

In den Analysen von *apr1* und *apr2* konnten keine deutlichen Auswirkungen des Verlusts der Genaktivität der APR auf Schwefelmetaboliten gefunden werden (Abbildung 2.24). Die in der Literatur beschriebene Verringerung des Glutathiongehalts konnte mit diesen Daten auch nicht bestätigt werden. Die beschriebene Änderung des Glutathiongehalts in Grant *et al.*, 2011 beträgt etwa 10 %. Es wäre möglich, dass der Betrag der Änderung zu gering ist um in der

semi-quantitativen Analyse mittels ICR-FT/MS erfasst zu werden oder die Änderung im Bereich einer biologischen Schwankungsbreite liegt und daher nicht signifikant ist. Weiterhin konnten kleinere Änderungen für einige Glucosinolate gefunden werden, welche aufgrund hoher Varianz als nicht signifikant einzustufen waren. Darüber hinaus wurden keine Schwefel-metaboliten, welche eine APR-spezifische Veränderung in der Abundanz zeigten gefunden. So haben ein Verlust von APR1 oder APR2 in Abwesenheit von fordernden Umweltbedingungen wie Trockenheit oder Nährstoffmangel von beispielsweise Stickstoff keinen Einfluss auf die Abundanz von Schwefel-metaboliten (Koprivova *et al.*, 2000; Koprivova *et al.*, 2008).

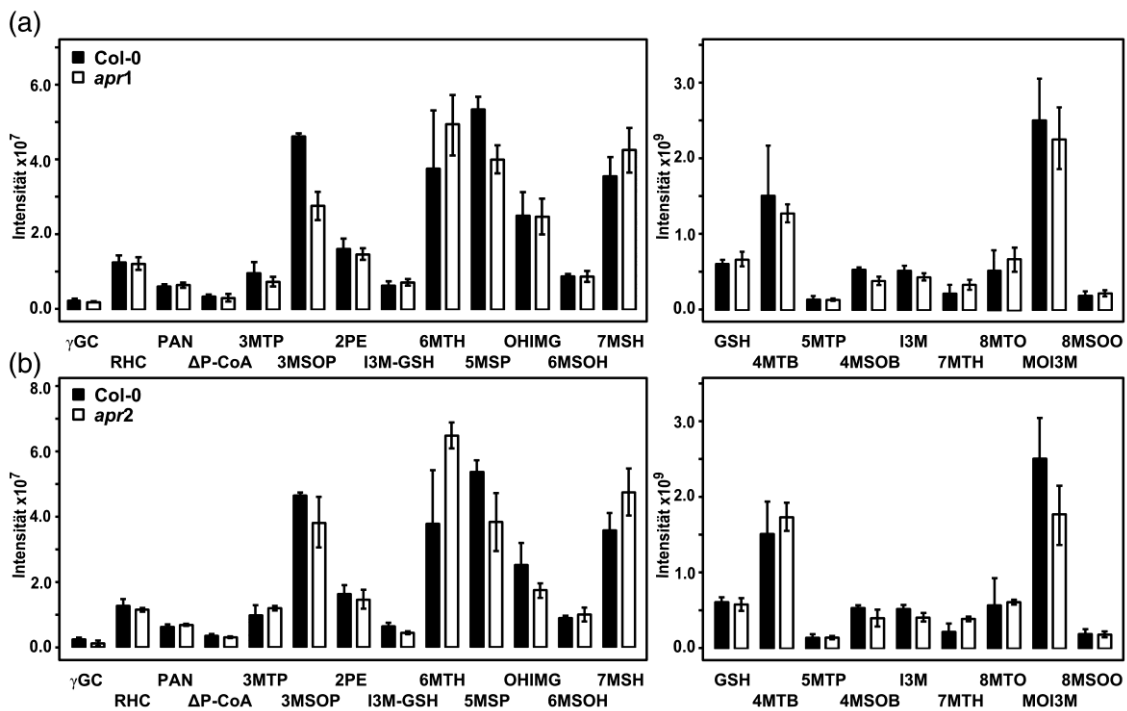


Abbildung 2.24 Variabilität bekannter Schwefelmetaboliten in Abhängigkeit von der Aktivität der APS-Reduktasen

Einfluss von *apr1* (a) und *apr2* (b) auf die Abundanz bekannter Schwefelmetaboliten (Tabelle 2.4). Mittelwerte der absoluten Signalintensitäten des 32 S-Isotops [m-H] der bekannten Schwefelmetaboliten von Wildtyp Col-0 (schwarze Balken) und *apr1* bzw. *apr2* (weiße Balken). Die Anzucht der Keimlinge erfolgte für 14 Tage auf 0,5-fach konzentriertem, mit Agar verfestigtem, schwefelfreiem Medium mit $375 \mu\text{M Na}_2\text{SO}_4$ supplementiert. Die gezeigten Mittelwerte mit SD setzen sich aus den Analysen von zwei biologischen Replikaten in zweifacher, technischer Wiederholung zusammen. Die Datenaufnahme erfolgte mit 300 Scans bei negativer Ionisierung und einer 1:25 Verdünnung der Pflanzenextrakte.

2.4.2.3 Adenosin-Phosphosulfat-Kinasen

Vier funktionale Isoformen von Adenosin-Phosphosulfat-Kinasen (APK) wurden für *Arabidopsis* beschrieben (Lee und Leustek 1998; Lillig *et al.*, 2001; Leustek 2002). Drei der vier zeigen eine Lokalisation in Chloroplasten, während eine Isoform, APK3, cytosolisch ist (Mugford *et al.*, 2009). APKs phosphorylieren APS zu PAPS, welches in Pflanzen ausschließlich als Substrat zur Sulfatierung von beispielsweise Glucosinolaten und Peptiden durch Sulfotransferasen (SOT) dient (Abbildung 1.2). *Arabidopsis* verfügt über 18 cytosolische SOTs von denen drei nachweislich an der Glucosinolatbiosynthese beteiligt sind (Klein und Papenbrock 2004; Piotrowski *et al.*, 2004). Der Verlust einzelner APKs resultiert in keinem veränderten Phäno- oder Chemotyp der Pflanzen. Dies verdeutlicht, dass ein Austausch zwischen cytosolischem und plastidärem PAPS-Speicher stattfindet (Mugford *et al.*, 2009). Versuche mit Doppel- und Dreifachmutanten der APKs zeigten eine deutliche Reduktion des Glucosinolatgehalts um bis zu 90 % und eine entsprechende Akkumulation der Desulfo-Vorstufen. Außerdem wurde eine verstärkte Anreicherung von Cystein und GSH beobachtet. Es wurde postuliert, dass die Hauptaktivität der APK von APK1 bereitgestellt wird und Pflanzen, welche ausschließlich APK2 exprimierten nicht lebensfähig seien (Mugford *et al.*, 2009; Mugford *et al.*, 2010).

In Rahmen dieser Arbeit wurden T-DNA-Insertionslinien aller vier APK-Isoformen analysiert sowie ausgewählte Kreuzungen dieser Linien, *apk1xapk2*, *apk1xapk4*, *apk1xapk2xapk4* (*apk* TR3) und *apk2xapk3xapk4* (*apk* TR1), welche in Mugford *et al.* (2009 und 2010) verwendet wurden (Tabelle 4.2).

Die ICR-FT/MS-Analysen der Extrakte von den Linien mit Aktivitätsverlusts einzelner APKs zeigten, wie bereits durch Mugford *et al.* (2009) beschrieben wurde, keine deutlichen Auswirkungen auf die hier annotierten Schwefelmetaboliten (Abbildung 2.25). Es war eine geringe Varianz der Glucosinolatgehalte zu beobachten. Hierbei zeigten 3MSOP und 4MSOB eine Zunahme der Abundanz von bis zu dreifach. 7MTH und 8MTO waren dagegen etwa um ein Drittel reduziert. Allerdings wurde in den Analysen häufig eine hohe Schwankungsbreite von bis zu 50 % der Glucosinolate beobachtet, die sich für gewöhnlich nicht spezifisch reproduzieren ließ und auch schon anderweitig beschrieben wurde (Mugford *et al.*, 2009). In diesem Kontext muss auch

ERGEBNISSE

beachtet werden, dass die Glucosinolatgehalte leicht durch Gewebeverletzung und Myrosinase-induzierten Abbau während der Ernte der Keimlinge beeinträchtigt sein können.

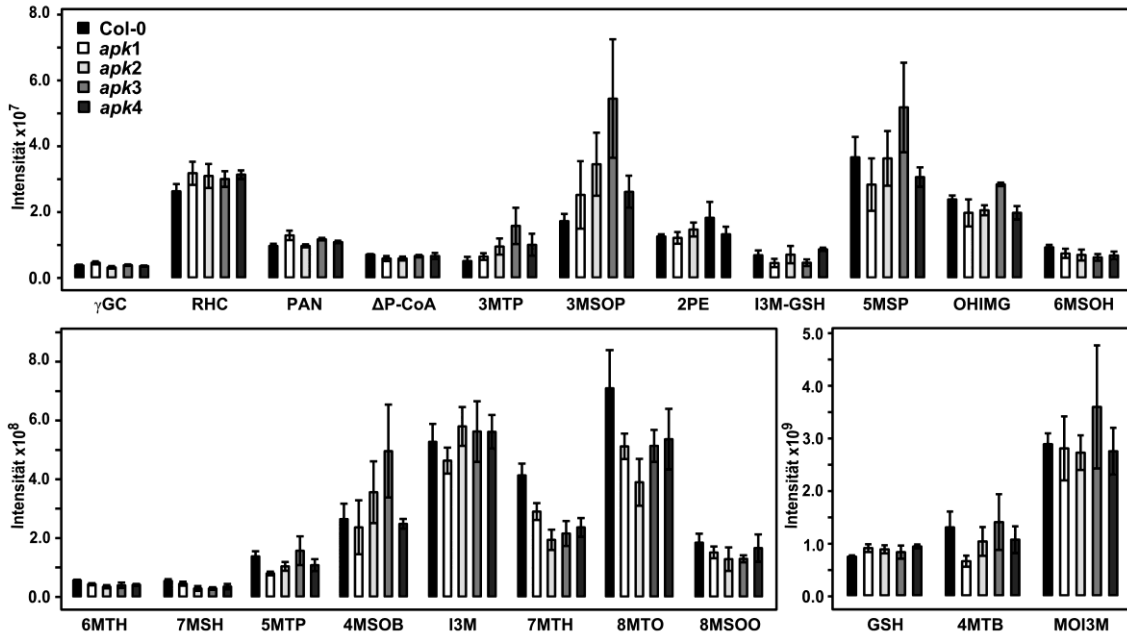


Abbildung 2.25 Variabilität bekannter Schwefelmetaboliten in Abhängigkeit von der Aktivität der APS-Kinasen

Einfluss von *apk1*, *apk2*, *apk3* und *apk4* auf die Abundanz bekannter Schwefelmetaboliten (Tabelle 2.4). Mittelwerte der absoluten Signalintensitäten des ³²S-Isotops [m-H] der bekannten Schwefelmetaboliten von Wildtyp Col-0 und *apk*. Die Anzucht der Keimlinge erfolgte für 14 Tage auf 0,5-fach konzentriertem, mit Agar verfestigtem, schwefelfreiem Medium mit 375 μ M Na₂SO₄ supplementiert. Die gezeigten Mittelwerte mit SD setzen sich aus den Analysen von zwei biologischen Replikaten in zweifacher, technischer Wiederholung zusammen. Die Datenaufnahme erfolgte mit 300 Scans bei negativer Ionisierung und einer 1:25 Verdünnung der Pflanzenextrakte.

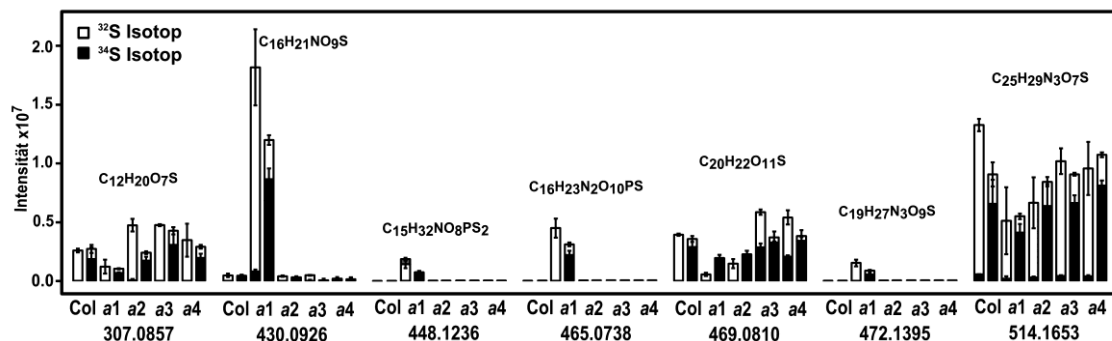


Abbildung 2.26 Veränderte Schwefelmetabolitabundanz in Mutanten der APS-Kinasen

In Abhängigkeit von fehlender Aktivität einzelner APKs wurden nicht annotierte Schwefelmetaboliten mit veränderter Abundanz zum Wildtyp (Col-0), jeweils in ³²S- und ³⁴S-markierten Keimlingen von *Arabidopsis* detektiert. Verwendet wurden die Linien *apk1* (a1), *apk2* (a2), *apk3* (a3) und *apk4* (a4). Die zugeordnete Summenformel entspricht der molekularen Komposition mit der geringsten Massenabweichung gültig für C₀₋₁₀₀H_nN₀₋₆O₀₋₈₀P₀₋₄S₁₋₃ bei einer Ladung von -1 [m-H]. Die gezeigten Mittelwerte mit SD setzen sich aus den Analysen von zwei biologischen Replikaten in zweifacher, technischer Wiederholung für jeweils ³²S- und ³⁴S-Markierung zusammen. Die Datenaufnahme erfolgte mit 300 Scans bei negativer Ionisierung und einer 1:25 Verdünnung der Pflanzenextrakte.

Des Weiteren konnten sieben nicht annotierte Schwefelmetaboliten detektiert werden, die eine eindeutige Veränderung in der Abundanz im Vergleich zum Wildtyp zeigten (Abbildung 2.26). Während *apk2*, *apk3* und *apk4* ein ähnliches Abundanzmuster der Metaboliten aufwiesen, welches sich lediglich durch geringe Veränderungen gegenüber dem Wildtyp auszeichnete, konnten für *apk1* vier charakteristische Massen identifiziert werden, welche eine starke Anreicherung zeigten. Die Schwefelmetaboliten mit den nominalen Massen 448, 465 und 472 waren ausschließlich in *apk1* vorzufinden. Für die Massen 307, 469 wurde eine Reduktion um die etwa Hälfte, für 514 um ein Drittel der Wildtypabundanz in *apk1* festgestellt. Die Summenformeln der spezifisch akkumulierten Schwefelverbindungen mit den nominalen Massen 430, 448, 465 und 472 sind $C_{16}H_{21}NO_9S$, $C_{15}H_{32}NO_8PS_2$, $C_{16}H_{23}N_2O_{10}PS$ und $C_{19}H_{27}N_3O_9S$. Weiterführende Analysen zur Aufklärung von Komposition und Struktur durch Fragmentierung waren auf Grund der geringen Abundanz ($< 10^8$) nicht möglich. Für *APK1* ist bislang keine andere Funktion neben der ATP-abhängigen Phosphorylierung von APS beschrieben worden. So muss angenommen werden, dass bei Aktivitätsverlust der *APK1* Substanzen die akkumulieren entweder Substrate der Kinase sind oder Ziele der Sulfatierung durch PAPS. Hierbei müsste von einem PAPS-Pool, welcher ausschließlich durch *APK1* bereitgestellt wird ausgegangen werden und eine spezifische Kanalisierung von PAPS vorliegen. Es wird angenommen, dass die Hauptaktivität der *APKs* von *APK1* ausgeübt wird. Mugford *et al.* (2009) postulierten daher eine Diskriminierung bestimmter Substanzen bei geringer PAPS-Verfügbarkeit oder eine unmittelbare Assoziation mit bestimmten PAPS-konsumierenden Enzymen wie SOTs. Da nach gegenwärtigem Wissensstand *APK1* in den Chloroplasten lokalisiert ist und alle beschriebenen SOTs im Cytosol, müsste in diesem Fall von einer spezifischen Verbindung durch eine Art Transmittersubstanz ausgegangen werden. Zwei der in *apk1* akkumulierten Schwefelverbindungen enthalten nach der annotierten Summenformel ein Phosphat. Dies würde sie für potentielle APS-analoge Strukturen, welche durch die Kinasedomäne erkannt und phosphoryliert werden qualifizieren.

Weiterhin wurden Kreuzungen der einzelnen *apk*-Linien untersucht. Der Einfluss der Kreuzungslinien auf die bekannten Schwefelmetaboliten war sehr unterschiedlich. Die Genotypen *apk1xapk2* und *apk TR3* zeichneten sich durch

nahezu vollständigen Verlust der Glucosinolate aus sowie reduzierte GSH- und γ EC- und I3M-GSH-Gehalte (Abbildung 2.27a). Diese Beobachtungen deckten sich nicht mit Mugford *et al.* (2009 und 2010), da hier eine Akkumulation von GSH um etwa ein Viertel gegenüber dem Wildtyp Col-0 beschrieben wurde. Demgegenüber zeigten *apk1xapk4* und *apk* TR1 ein, den Einzelmutanten vergleichbares Abundanzmuster (Abbildung 2.27b). Auch hier, wie bereits für die Einzelmutanten beobachtet, ließ sich wieder eine leichte Anreicherung von 3MSOP und 4MSOB sowie eine Reduktion von 7MTH und 8MTO beobachten. Bei der Analyse von spezifisch veränderten, nicht annotierten Schwefelmetaboliten konnten für die Kreuzungslinien neben den sieben, welche bereits für *apk1* gefunden wurden, 17 zusätzliche, charakteristische Schwefelmassen detektiert werden. So waren in *apk1xapk2* und *apk* TR3 21 Schwefelmassen vorhanden, welche nicht im Wildtyp detektiert werden konnten und drei Schwefelmassen, welche gegenüber dem Wildtyp fehlten (Abbildung 2.28a). Für *apk1xapk4* konnte die veränderte Abundanz nur in 14 dieser Massen gefunden werden, welche sich vergleichbar zu *apk1xapk2* verhielten (Abbildung 2.28b). Alle Linien, welche *apk1* enthielten zeigten dieselben *apk1*-spezifischen Veränderungen (Abbildung 2.26). Auffällig war, dass gegenüber den vielen spezifisch, akkumulierten Massen nur wenige Massen im Vergleich zum Wildtyp fehlten oder reduziert waren. Dies fördert den Schluss, dass die Zielmetaboliten, deren Vorstufen bei Aktivitätsverlust von APK akkumulieren, nicht angereichert werden und möglicher Weise einem hohen Fluss unterliegen. Alternativ könnten die Zielmetaboliten auch Ziele des Abbaus sein. *apk* TR1 zeigte nur in drei Schwefelmassen Veränderungen gegenüber dem Wildtyp. Eine reduzierte Abundanz für 514.1653 amu um ein Drittel und von 469.0810 amu um zwei Drittel, wie es auch schon in *apk1* beobachtet wurde. Allerdings zeigte *apk* TR1 als einzige Linie eine Akkumulation von 307.0857 amu, welche in den anderen Linien eher reduziert gegenüber dem Wildtyp war. Zu dieser Masse wurde eine Summenformel von $C_{12}H_{20}O_7S$ annotiert. Diese Schwefelverbindung konnte auch schon mit veränderter Abundanz in *apk1* gefunden werden, hier war der Gehalt etwa zweifach reduziert gegenüber dem Wildtyp und den übrigen Einzelmutanten der APKs. Dieser Metabolit verhielt sich also gegenläufig zu den andren *apk1*-spezifisch veränderten Schwefelverbindung (430, 448, 472, 465 m/z). Daher besteht die

ERGEBNISSE

Möglichkeit, dass diese Metaboliten Edukte und Produkte derselben APK1-abhängigen Reaktion sind.

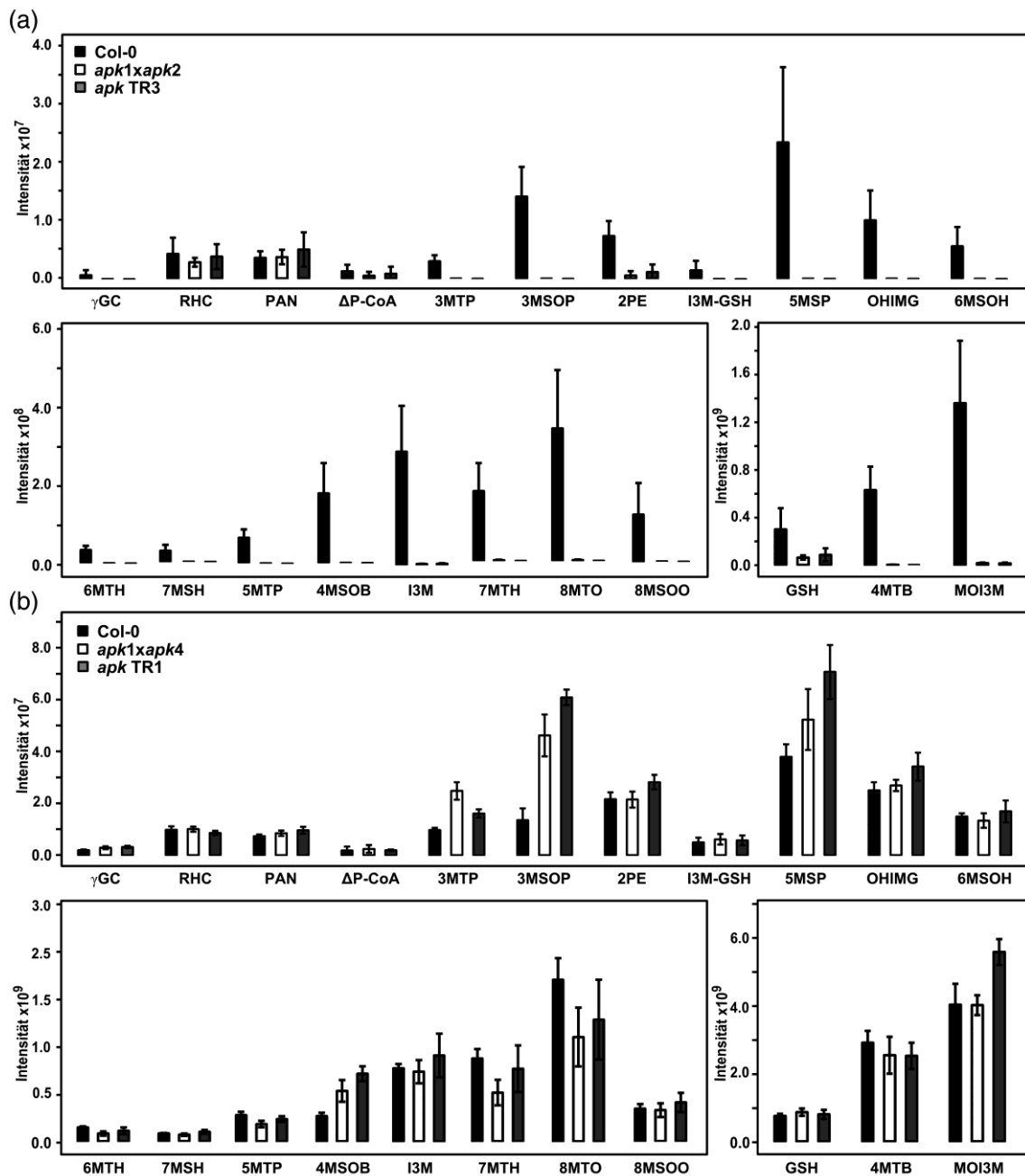


Abbildung 2.27 Variabilität bekannter Schwefelmetaboliten bei multiplem Aktivitätsverlust von APS-Kinasen

Einfluss von *apk1xapk2*, *apk1xapk4*, *apk TR1* (*apk2xapk3xapk4*) und *apk TR3* (*apk1xapk2xapk4*) auf die Abundanz bekannter Schwefelmetaboliten (Tabelle 2.4). Mittelwerte der absoluten Signalintensitäten des ^{32}S -Isotops [m-H] der bekannten Schwefelmetaboliten von Wildtyp Col-0 und *apk*. Die Anzucht der Keimlinge erfolgte für 14 Tage auf 0,5-fach konzentriertem, mit Agar verfestigtem, schwefelfreiem Medium mit $375 \mu\text{M Na}_2\text{SO}_4$ supplementiert. Die gezeigten Mittelwerte mit SD setzen sich aus den Analysen von zwei biologischen Replikaten in zweifacher, technischer Wiederholung zusammen. Die Datenaufnahme erfolgte mit 300 Scans bei negativer Ionisierung und einer 1:25 Verdünnung der Pflanzenextrakte.

ERGEBNISSE

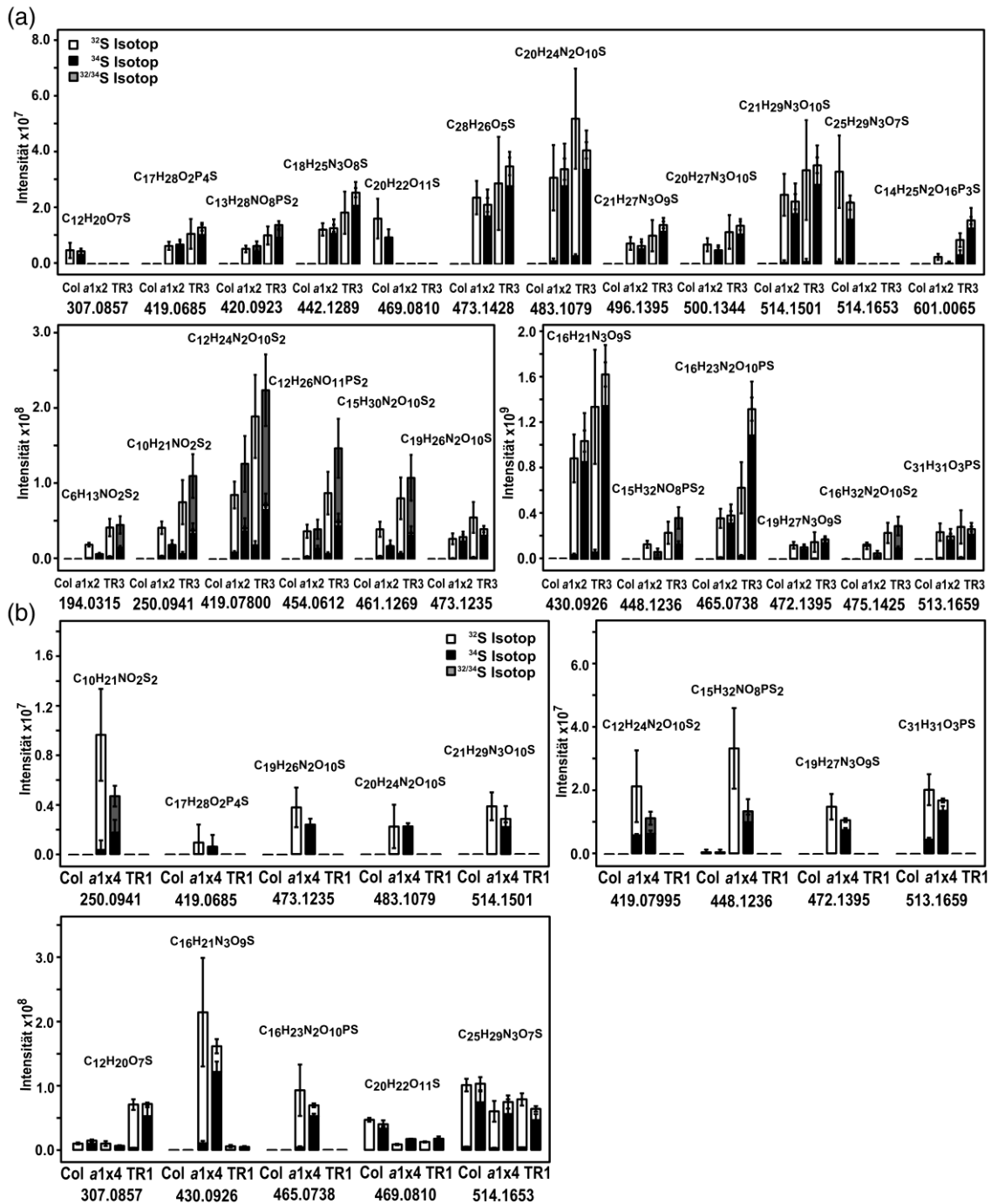


Abbildung 2.28 Veränderte Schwefelmetabolitabundanz in multiplen Mutanten der APS-Kinasen

In Abhängigkeit von fehlender Aktivität mehrere APKs wurden nicht annotierte Schwefelmetaboliten mit veränderter Abundanz zum Wildtyp (Col-0), jeweils in ^{32}S - und ^{34}S -markierten Keimlingen von *Arabidopsis* detektiert. Verwendet wurden die Linie *apk1xapk2* (a1x2), *apk1xapk4* (a1x4), *apk TR1* (*apk2xapk3xapk4*; TR1) und *apk TR3* (*apk1xapk2xapk4*; TR3). Die zugeordnete Summenformel entspricht der molekularen Komposition mit der geringsten Massenabweichung gültig für $C_{0-100}H_nN_{0-6}O_{0-80}P_{0-4}S_{1-3}$ bei einer Ladung von -1 [m-H]. Die gezeigten Mittelwerte mit SD setzen sich aus den Analysen von zwei biologischen Replikaten in zweifacher, technischer Wiederholung für jeweils ^{32}S - und ^{34}S -Markierung zusammen. Die Datenaufnahme erfolgte mit 300 Scans bei negativer Ionisierung und einer 1:25 Verdünnung der Pflanzenextrakte.

ERGEBNISSE

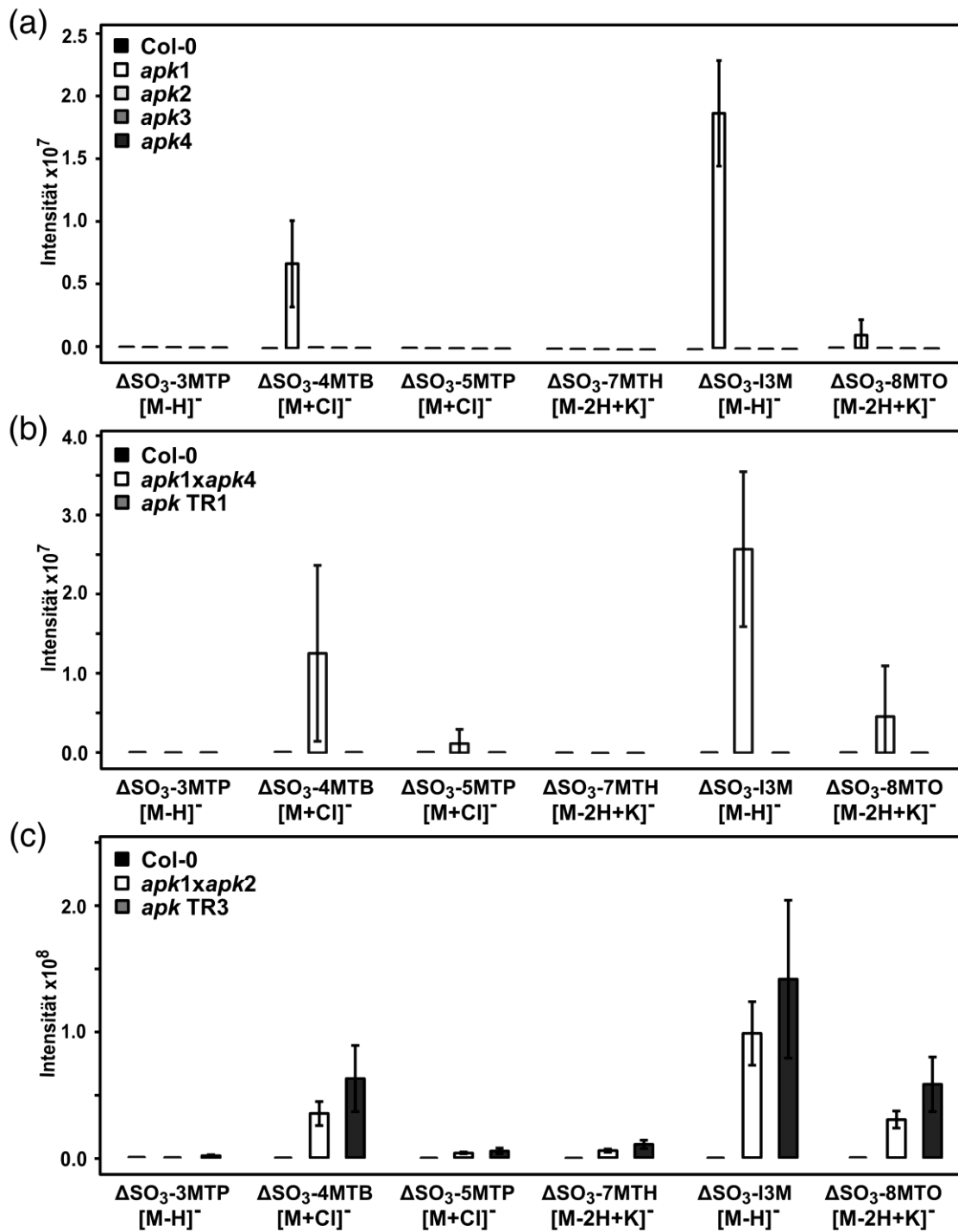


Abbildung 2.29 Akkumulation von Desulfoglucosinolaten in Mutanten der APS-Kinasen

Einfluss von fehlender APK-Aktivität auf die Sulfatierung von Glucosinolaten. Untersucht wurden die Linien *apk1*, *apk2*, *apk3*, *apk4*, *apk1xapk2*, *apk1xapk4*, *apk TR1* (*apk2xapk3xapk4*) und *apk TR3* (*apk1xapk2xapk4*). Mittelwerte der absoluten Signalintensitäten des ^{32}S -Isotops als [m-H], [M+Cl] oder [M-2H+K] Addukte der Desulfoglucosinolate von 3MTP, 4MTB, 5MTP, 7MTH, 13M und 8MTO für den Wildtyp Col-0 und *apk*. Die Anzucht der Keimlinge erfolgte für 14 Tage auf 0,5-fach konzentriertem, mit Agar verfestigtem, schwefelfreiem Medium mit $375\ \mu\text{M}$ Na_2SO_4 supplementiert. Die gezeigten Mittelwerte mit SD setzen sich aus den Analysen von zwei biologischen Replikaten in zweifacher, technischer Wiederholung zusammen. Die Datenaufnahme erfolgte mit 300 Scans bei negativer Ionisierung und einer 1:25 Verdünnung der Pflanzenextrakte.

Um auf die umfassenden Ergebnisse von Mugford *et al.* (2009) näher einzugehen wurden die beschriebene Anreicherung der Desulfoglucosinolate sowie der Vorstufen von Hydroxyjasmonsäuresulfat untersucht (Miersch *et al.*, 2008). In der hier dargestellten massenspektrometrischen Analyse wurden Desulfoglucosinolate vorwiegend deprotoniert oder als Addukte mit Chlorid und Kalium detektiert. Häufig waren auch unterschiedliche Addukte eines Desulfoglucosinolats zu finden. In diesen Fällen wurde das dominierende Addukt dargestellt. Von acht für *Arabidopsis* beschriebenen Desulfoglucosinolaten konnten die 6 Vorstufen der abundantesten Glucosinolate detektiert werden ($\Delta\text{SO}_3\text{-3MTP}$, $\Delta\text{SO}_3\text{-4MTB}$, $\Delta\text{SO}_3\text{-5MTP}$, $\Delta\text{SO}_3\text{-7MTH}$, $\Delta\text{SO}_3\text{-I3M}$, $\Delta\text{SO}_3\text{-8MTO}$). Die Analysen zeigten, dass von den Einzelmutanten lediglich *apk1* geringfügig Desulfoglucosinolate akkumulierte, vergleichbar mit *apk1xapk4* (Abbildung 2.29a, b). *apk TR1* war in der Sulfatierung von Glucosinolaten nicht beeinträchtigt. *apk1xapk2* und *apk TR3* akkumulierten demgegenüber etwa die fünffache Menge an Desulfoglucosinolaten verglichen mit *apk1* (Abbildung 2.29c). Hier konnten auch die weniger abundanten Vorstufen von 3MTP, 5MTP und 7MTH detektiert werden.

Schließlich wurde am Beispiel von Jasmonsäure die Akkumulation der Vorstufen anderer sulfatierter Metaboliten untersucht. Durch Mugford *et al.* (2009) wurde gezeigt, dass die Beeinträchtigung des PAPS-Haushalts durch Aktivitätsverlust der APKs zu einer Reduktion von Hydroxyjasmonsäuresulfat führt und einer Akkumulation von Hydroxyjasmonsäure (OHJA) als unmittelbare Vorstufe und von Hydroxyjasmonsäure-O-Glykosid (O-Glc-JA) als deren Derivat. Außerdem wurde eine Reduktion der Jasmonsäurevorstufe Oxophytodiensäure (OPDA) beobachtet. Da Hydroxyjasmonsäuresulfat selber nicht in der ICR-FT/MS-Analyse detektiert wurde, konnten lediglich die nicht-schwefelhaltigen Vorstufen OHJA, O-Glc-JA und OPDA untersucht werden. Für alle untersuchten Linien konnten keine deutlichen Unterschiede der drei Metaboliten zum Wildtyp gefunden werden (Abbildung 2.30). In Mugford *et al.* (2009) wurde eine Akkumulation von OPDA um etwa 15 % und für 12-OHJA um etwa 20 % des Wildtypgehalts beschrieben. 11-OHJA zeigte hingegen keine Änderung. Für O-Glc-JA wurde eine mittlere Änderung von etwa 15 % festgestellt, welche aber aufgrund einer Abweichung von bis zu 100 % nicht signifikant war. Tendenziell zeigten die in dieser Arbeit erhobenen Daten auch eine geringe

Akkumulation von OPDA im Rahmen von etwa 20 %. Wie in den Analysen von Mugford *et al.* (2009) konnte eine hohe Variabilität von O-Glc-JA festgestellt werden die keine Aussage über etwaige Veränderungen der Abundanz zulassen. Für OHJA wurde ebenfalls keine Änderung in der Abundanz festgestellt. 12-OHJA und 11-OHJA waren in Mugford *et al.* (2009) unterschiedlich stark beeinträchtigt. Allerdings ist es im Rahmen der ICR-FT/MS-Analyse nicht möglich zwischen den Isomeren von 12-OHJA und 11-OHJA zu unterscheiden und die Abundanz von OHJA ist ein Ausdruck von deren Mischung. So können geringe Unterschiede in der Abundanz der einzelnen Isomere von 12-OHJA und 11-OHJA nicht bestimmt werden. Da die untersuchten Metaboliten keinen Schwefel enthielten konnten Detektion und Bestimmung der Metaboliten lediglich auf Basis ihrer Summenformel und des $^{13}\text{C}_1$ -Musters erfolgen, welche stimmig waren. Dennoch besteht die Möglichkeit der Detektion von isomeren Verbindungen, welche nicht mit dem Jasmonsäuremetabolismus in Verbindung stehen. Daher erlauben diese Ergebnisse keine definitive Aussage über den Gehalt der untersuchten Metaboliten.

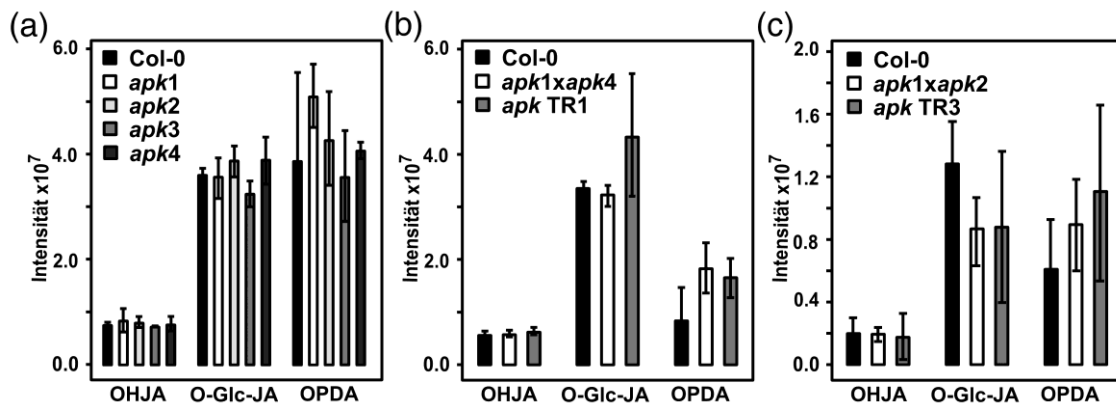


Abbildung 2.30 Einfluss von fehlender APK-Aktivität auf die Sulfatierung von Metaboliten im Jasmonsäuremetabolismus

Untersucht wurden die Linien (a) *apk1*, *apk2*, *apk3*, *apk4*, (b) *apk1xapk4*, *apk TR1* (*apk2xapk3xapk4*) und (c) *apk1xapk2*, *apk TR3* (*apk1xapk2xapk4*) bezüglich der Metabolitgehalte von Hydroxyjasmonsäure (OHJA), Jasmonsäure-O-Glykosid (O-Glc-JA) und Oxophytodiensäure (OPDA). Mittelwerte der absoluten Signalintensitäten des ^{32}S -Isotops von Wildtyp Col-0 und *apk*. Die Anzucht der Keimlinge erfolgte für 14 Tage auf 0,5-fach konzentriertem, mit Agar verfestigtem, schwefelfreiem Medium mit 375 μM Na_2SO_4 supplementiert. Die gezeigten Mittelwerte mit SD setzen sich aus den Analysen von vier biologischen Replikaten in zweifacher, technischer Wiederholung zusammen. Die Datenaufnahme erfolgte mit 300 Scans bei negativer Ionisierung und einer 1:25 Verdünnung der Pflanzenextrakte.

Die Analysen der unterschiedlichen Insertionslinien von APKs und deren Kreuzungen zeigten im Allgemeinen einen deutlichen Effekt auf den

Glucosinolathaushalt aber auch ein hohes Ausmaß an Redundanz, welches innerhalb dieser Genfamilie vorliegt, wie es bereits durch Mugford *et al.* (2009 und 2010) beschrieben wurde. Anhand der Mehrfachmutanten der APKs wurde deutlich, dass es sich bei der PAPS-Verfügbarkeit um einen Dosiseffekt handelt. So akkumulierten die zu sulfatierenden Substrate zunehmend mit Abnahme der APK-Aktivität, an der offenkundig APK1 den größten Anteil hat. Über die bereits bekannten metabolischen Auswirkungen hinaus konnten 24 spezifisch beeinflusste Schwefelmassen detektiert werden. Hervorzuheben sei die Schwefelmasse 307.0857 amu, welche sich in apk TR1 gegenläufig zu dem erwarteten Muster entwickelte und akkumulierte, hingegen alle anderen Linien eher reduziert gegenüber dem Wildtyp waren. Ein naheliegender Schluss wäre, dass die, in Abhängigkeit des Aktivitätsverlusts von APK akkumulierten Massen Substrate zur Sulfatierung sind. Gleiches gilt im Umkehrschluss für die reduzierten Massen, welche sulfatierte Verbindungen wären. Leider konnten in den Analysen keine korrespondierenden Massen gefunden werden, die diese Hypothese stützen würden.

Die Funktion der Sulfatierung von Metaboliten ist vielfältig. Vor allem wirkt sich die Sulfatierung aber auf die Löslichkeit der betreffenden Metaboliten aus, welche Verbreitung und Transport erleichtert (Weinshilboum *et al.*, 1997; Faulkner und Rubery 1992). Bei Säugern ist die Sulfatierung in der Transformation von Xenobiotika im Rahmen der Detoxifizierung involviert (Weinshilboum und Otterness 1994). Für Pflanzen wurde die Sulfatierung vor allem im Zusammenhang mit der Regulation der biologischen Aktivität von Phytohormonen beschrieben sowie der Involvierung in Prozessen der Signaltransduktion (Truchet *et al.*, 1991; Gidda *et al.*, 2003; Marsolais *et al.*, 2007). So ist es möglich, dass die sulfatierte Form der Metaboliten lediglich eine Übergangslösung beispielweise für den Transport ist, welche im Anschluss umgehend metabolisiert wird. Dies würde erklären, dass im Wildtyp keine korrespondierenden Kandidaten zu den in den APK-Mutanten akkumulierten Vorstufen gefunden werden können. Anderenfalls besteht die Möglichkeit, dass die akkumulierten Massen wiederum mit dem Glucosinolatmetabolismus verknüpft sind und nicht beschriebene Derivate der Vorstufen darstellen. Beispielsweise stimmt die Masse 419.0685 amu ($\pm 0,002$ ppm) dem Chloridaddukt des desulfatierten OHIMG überein. Dieses Desulfoglucosinolat

ist nicht Teil der Glucosinolatbiosynthese. OHIMG resultiert aus der Vorstufe von I3M und wird durch sekundäre Modifikation gebildet. So stellt sich die Frage ob dieses Desulfoglucosinolat tatsächlich ein mögliches Produkt der *apk*-Linien darstellt und gegebenen Falls eine Desulfatierung von Glucosinolaten bei sehr geringer PAPS-Verfügbarkeit stattfindet. Dennoch kann ohne weitere Analysen der Struktur oder Funktion der detektierten Massen keine nähere Charakterisierung der nicht annotierten Schwefelmetaboliten erfolgen.

2.4.3 Loss-of-function Mutationen im Glutathion-assoziierten Metabolismus

Das Tripeptid Glutathion (GSH) hat eine zentrale Rolle in der Pflanzenzelle. Es ist beteiligt an Redoxhomöostase, Signaltransduktion und Entgiftung von Metallen und Xenobiotika. Die wichtigste funktionale Gruppe des Glutathions ist die Thiolgruppe des Cysteins, welche die meisten Reaktionen initiiert (Foyer und Noctor 2011; Noctor *et al.*, 2011). Sie erlaubt es Verbindungen mit elektrophilen Substanzen einzugehen wie z. B. Metallionen oder Pestiziden sowohl spontan als auch katalysiert durch Glutathiontransferasen (GST) (Edwards und Dixon 2005; Cummins *et al.*, 2011). Neben Xenobiotika und Schwermetallen wurden auch endogene Ziele wie OPDA für die Konjugation an Glutathion gefunden (Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2011). Der Abbau von GSH-Konjugaten erfolgt durch die enzymatische Abspaltung von γ -Glutamyl- und Glycinyrest. Ersteres kann durch γ -Glutamyltransferasen (GGT) oder γ -Glutamylpeptidase (GGP) katalysiert werden, letzteres durch Phytochelatin-synthasen (PCS) oder Carboxypeptidasen (Storozhenko *et al.*, 2002; Beck *et al.*, 2003; Blum *et al.*, 2007; Grzam *et al.*, 2007; Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2007a; Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2007b; Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2008; Geu-Flores *et al.*, 2009; Geu-Flores *et al.*, 2011). Trotz der Lokalisation der Konjugat-abbauenden Enzyme in Cytosol und Vakuole wird im Allgemeinen ein vakuolärer Weg des Konjugatabbaus beschrieben (Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2007b; Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2011).

2.4.3.1 γ -Glutamyltransferasen

Für *Arabidopsis* sind drei funktionale GGTs beschrieben, GGT1, GGT2 und GGT4 (Grzam *et al.*, 2007; Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2007a; Ohkama-Ohtsu *et al.*,

2007b). GGT3 ist ein fragmentiertes Genduplikat von GGT1 oder GGT2, welches als nicht exprimiertes Pseudogen auftritt. GGT1 und GGT2 sind benachbarte Gene, welche entsprechend ihrer hohen Homologie mutmaßlich aus einer Genduplikation resultierten. GGT1 und GGT2 sind beide apoplastisch lokalisiert und gewebespezifisch exprimiert (Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2007a). GGT4 hingegen ist in den vakuolären Abbau von Glutathionkonjugaten involviert ist (Grzam *et al.*, 2007; Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2007b).

Ein Verlust der Aktivität von GGT1 führt zu einer um 90 % reduzierten GGT-Aktivität in Blättern. Die Pflanzen zeigen vermehrt Chlorosen. Außerdem wurden Auswirkungen auf GSH-Gehalt und verwandte Metaboliten beschrieben. Es wurde postuliert, dass GGT1 eine Rolle beim Schutz vor oxidativem Stress spielt (Martin und Slovin 2000; Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2007a). Die Resultate von fehlender GGT2-Aktivität sind aufgrund der lokal begrenzten Expression gering und führen zu einer GGT-Restaktivität von 45 % in Schoten (Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2007a). Fehlende GGT4-Aktivität resultiert in keinem offensichtlichen Phänotyp. Allerdings wurde in Experimenten mit Monobromobimanexposition, welches an GSH konjugiert, gezeigt, dass der Abbau der Konjugate inhibiert ist (Blum *et al.*, 2010). Zur Analyse der Abhängigkeit des Schwefelmetabolismus von der GGT-Aktivität wurden in dieser Arbeit unterschiedliche Insertionslinien von GGT1, GGT2 und GGT4 untersucht (Tabelle 4.2).

Der Einfluss des Aktivitätsverlusts der untersuchten GGT-Linien auf das beschriebene, bekannte Schwefelmetabolom war gering. Für *ggt1* zeigten die meisten Metaboliten eine Übereinstimmung der Abundanz mit den Daten des korrespondierenden Wildtyps *Ler-0*, wenngleich eine Akkumulation einiger Glucosinolate beobachtet werden konnte, wie für 6MSOH und 7MSH (Abbildung 2.31a). In Abbildung 2.17 sind die gleichen Schwefelmetaboliten im Vergleich zu *Col-0* dargestellt. Hier kann eine deutliche Varianz, vor allem in den Glucosinolatgehalten festgestellt werden. Diese Varianz der Glucosinolate korreliert mit dem Metabolitmuster, welches in *Ler-0* zu beobachten ist. Da *ggt1* eine Mutante im genetischen Hintergrund von *Ler-0* ist kann davon ausgegangen werden, dass die Änderungen in den Glucosinolatgehalten nicht durch *ggt1* verursacht werden sondern eine Folge des *Ler-0*-basierten Genoms sind. Wie die Daten zu Lokalisation und Expression von GGT2 in Ohkama-

Ohtsu *et al.* (2007a) erwarten ließen, zeigten die Analysen von *ggt2* keine Veränderungen gegenüber dem Wildtyp bezüglich der bekannten Schwefelmetaboliten (Abbildung 2.31b). In entsprechenden Analysen von *ggt4-1* konnte eine Reduktion von RHC, 3MTP und 3MSOP gegenüber dem korrespondierenden Wildtyp *Ler-0* beobachtet werden (Abbildung 2.31c).

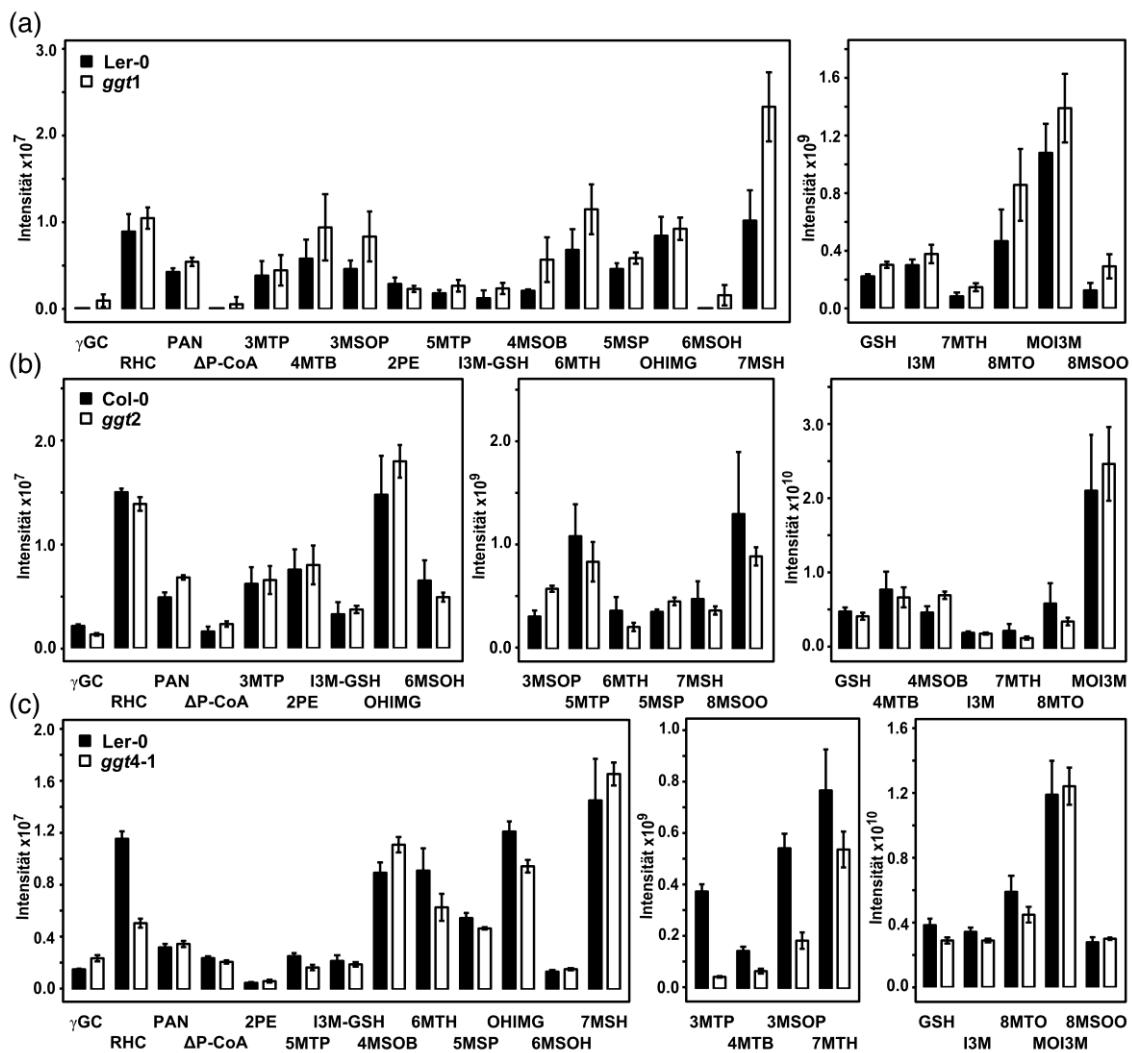


Abbildung 2.31 Variabilität bekannter Schwefelmetaboliten in Abhängigkeit von der Aktivität der γ -Glutamyltransferasen

Einfluss von *ggt1* (a), *ggt2* (b) und *ggt4-1* (c) auf die Abundanz bekannter Schwefelmetaboliten (Tabelle 2.4). Mittelwerte der absoluten Signalintensitäten des ^{32}S -Isotops [m-H] der bekannten Schwefelmetaboliten von Wildtyp *Col-0* bzw. *Ler-0* und *ggt*-Mutanten. Die Anzucht der Keimlinge erfolgte für 14 Tage auf 0,5-fach konzentriertem, mit Agar verfestigtem, schwefelfreiem Medium mit $375 \mu\text{M Na}_2\text{SO}_4$ supplementiert. Die gezeigten Mittelwerte mit SD setzen sich aus den Analysen von zwei biologischen Replikaten in zweifacher, technischer Wiederholung zusammen. Die Datenaufnahme erfolgte für *ggt1* mit 250 Scans, für *ggt2* und *ggt4-1* mit 1000 Scans bei negativer Ionisierung und einer 1:25 Verdünnung der Pflanzenextrakte.

Auch hier gilt wie für *ggt1*, dass die in Abbildung 2.17 erhobenen Daten im Vergleich zu Wildtyp *Col-0* durchgeführt wurden und die dargestellte Variabilität

sich hauptsächlich auf den genetischen Hintergrund des Ökotyps Ler-0 zurückführen lässt. Dies wurde auch durch die Daten der allelen Mutante, *ggt4-2*, im genetischen Hintergrund von Col-0 gestützt, deren Metabolitabundanz vergleichbar zum Wildtyp war (Abbildung 2.17).

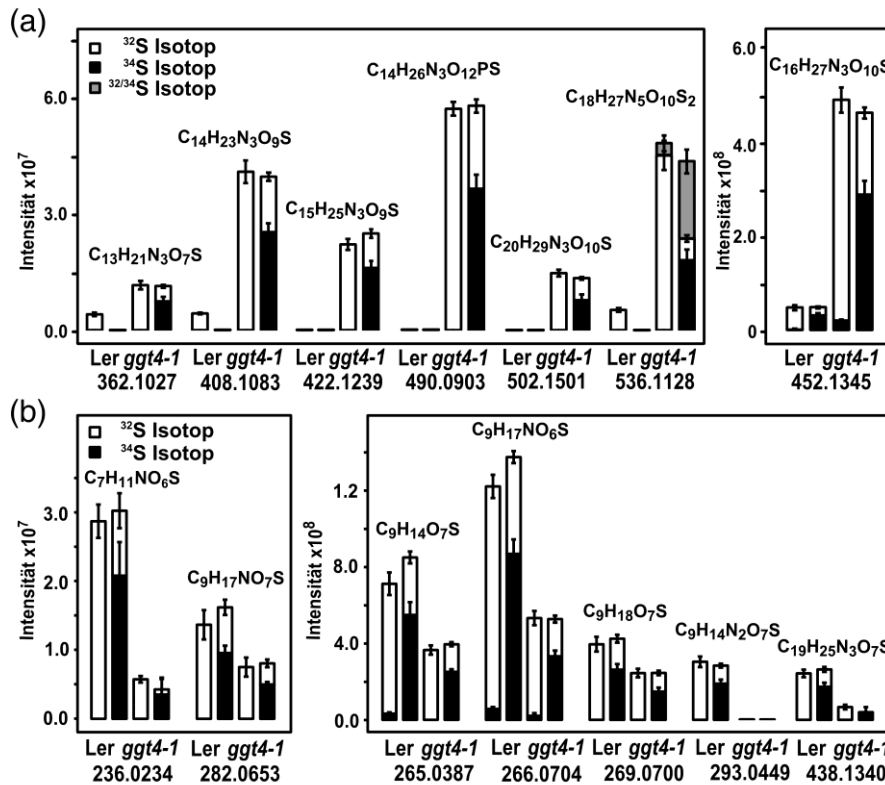


Abbildung 2.32 Veränderte Schwefelmetabolitabundanz in *ggt4-1*

In Abhängigkeit von fehlender Aktivität von GGT4 wurden nicht annotierte Schwefelmetaboliten mit erhöhter (a) bzw. reduzierter (b) Abundanz zum Wildtyp (*Ler-0*) detektiert, jeweils in ³²S- und ³⁴S-markierten Keimlingen von *Arabidopsis*. Die zugeordnete Summenformel entspricht der molekularen Komposition mit der geringsten Massenabweichung gültig für C₀₋₁₀₀H_nN₀₋₆O₀₋₈₀P₀₋₄S₁₋₃ bei einer Ladung von -1 [m-H]. Die gezeigten Mittelwerte mit SD setzen sich aus den Analysen von zwei biologischen Replikaten in zweifacher, technischer Wiederholung für jeweils ³²S- und ³⁴S-Markierung zusammen. Die Datenaufnahme erfolgte mit 1000 Scans bei negativer Ionisierung und einer 1:25 Verdünnung der Pflanzenextrakte.

Republished from Exploring the *Arabidopsis* sulfur metabolome, Gläser *et al.*, The Plant Journal 77, 1. Copyright © (2014) John Wiley and Sons.

Die Analysen auf charakteristische Veränderungen nicht-annotierter Schwefelmetaboliten lieferten für *ggt1* und *ggt2* keinen Unterschied zum Wildtyp. Für *ggt4-1* konnten demgegenüber 14 spezifisch veränderte Massen identifiziert werden. Von sieben *ggt4-1*-abhängig akkumulierten Massen wurden drei ausschließlich in der Mutante gefunden. Die übrigen vier zeigten ein Anreicherung von fünffach für 362.1027 amu bis zu 10-fach für 452.1345 amu (Abbildung 2.32a). Die Abundanz für sieben weitere Schwefelmassen, welche

die von RHC (266.0704 amu) beinhalteten, war verringert gegenüber dem Wildtyp *Ler-0* (Abbildung 2.32b). Aufgrund der γ -Glutamyl-spezifischen Aktivität der GGTs bestand die Möglichkeit, dass diese *ggt4-1*-abhängigen Schwefel-metaboliten Derivate von GSH oder Trägern einer γ -Glutamylgruppe waren. Zum Nachweis der Anwesenheit einer γ -Glutamylgruppe wurden die Pflanzen-extrakte von *ggt4-1* mit einer gereinigten GGT inkubiert und die Versuchs-ansätze auf die Degradation der spezifisch akkumulierten Schwefelmetaboliten mittels ICR-FT/MS untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die beiden abundanten Metaboliten mit den nominalen Massen 452 und 502 in Abhängigkeit von der Inkubation mit der GGT in der Probe abgebaut wurden (Abbildung 2.33a). Als interne Kontrollen wurden GSH, als Träger einer γ -Glutamylgruppe und MOI3M, welches keine γ -Glutamylgruppe enthält untersucht. Während GSH, entsprechend den Erwartungen von der GGT metabolisiert wurde, blieb die Abundanz von MOI3M unverändert. Die übrigen Kandidatenmassen konnten nicht oder nicht eindeutig, aufgrund von Interferenz in der Matrix durch die Enzymzugabe, als Träger einer γ -Glutamylgruppe verifiziert werden.

Weiterhin sollte der γ -Glutamylmetabolit mit der höchsten Abundanz mittels MS/MS-Fragmentierung weiter charakterisiert werden. Die Fragmentierungen des ^{32}S - (452.1346 amu) und des ^{34}S -Isotops (454.1303 amu) resultierten in einem Hauptfragment mit der Masse 306.076 amu bzw. 308.072 amu (Abbildung 2.33b). Diese Fragmente entsprechen den Massen von GSH und seinem korrespondierenden ^{34}S -Isotopolog. Dem abgespaltenen Fragment mit einer Masse von 146.058 amu, welches nicht in der Analyse detektiert wurde, konnte eine Summenformel von $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$ (< 0.4 ppm) zugeordnet werden. Es war anzunehmen, dass die Abspaltung einer neutralen Abgangsgruppe erfolgte, welche mit einer Protonenverschiebung der konjugierten Gruppe zum GSH einhergeht und eine intramolekulare Umlagerung zur Folge hat (Kanawati *et al.*, 2011) (Abbildung 2.34). Demnach sollte die konjugierte Gruppe in einem ungeladenen Glutathionkonjugat eine Summenformel von $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_4$ haben.

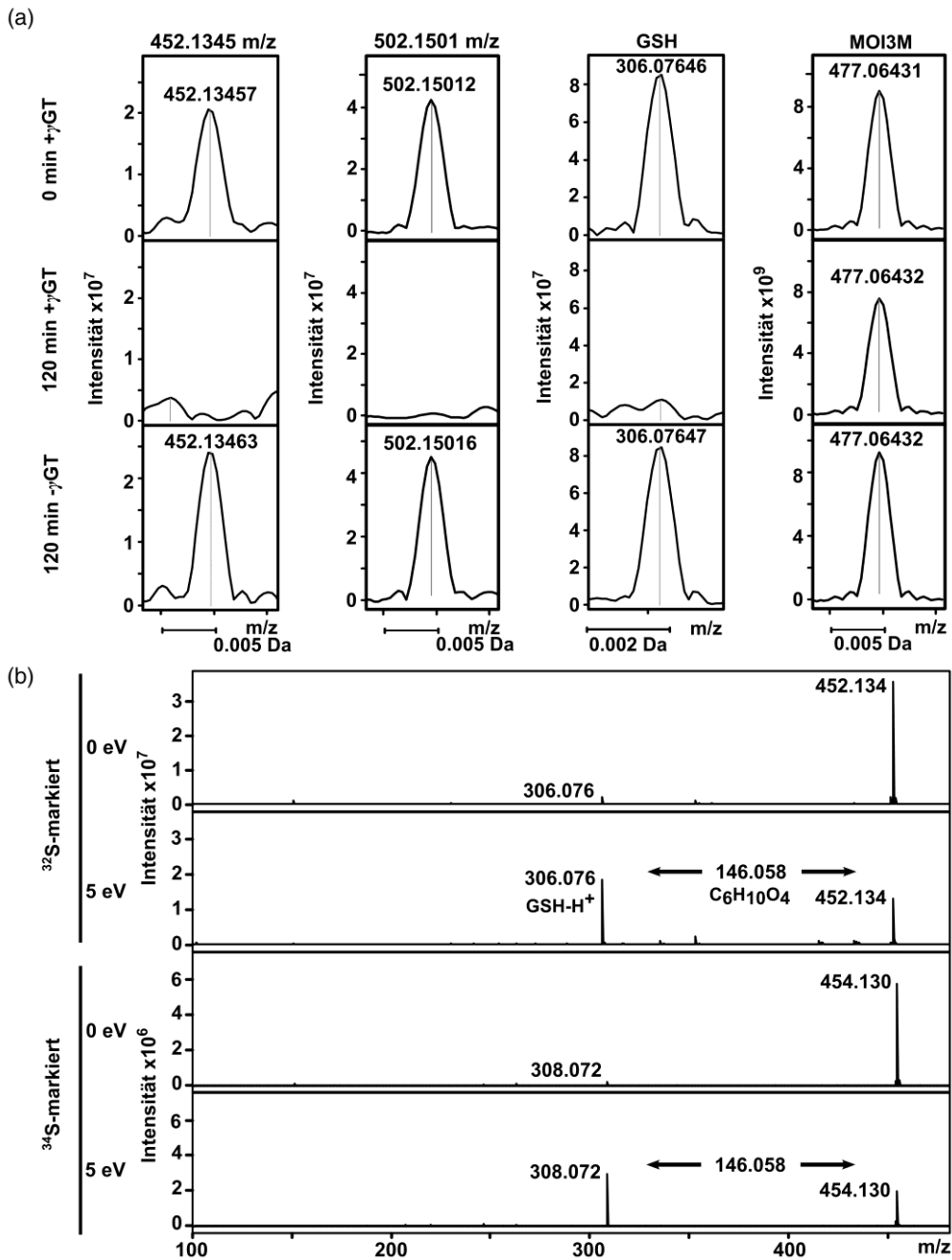


Abbildung 2.33 Analyse spezifisch akkumulierter Schwefelmetaboliten in *ggt4-1*

(a) Abbau von 452.1345 [m-H] und 502.1501 [m-H] durch γ -Glutamyltransferaseaktivität. Die nicht annotierten Schwefelmetaboliten und Glutathion wurden über einen Zeitraum von 120 min mit gereinigter GGT versetzt und abgebaut (oben und mittig). Methoxyglucobrassicin (MOI3M), welches keine γ -Glutamylgruppe enthält sowie die Kontrollen ohne Enzymzugabe (unten) zeigten keine Veränderung der Metabolitabundanz. Die Datenaufnahme erfolgte mit 500 Scans bei negativer Ionisierung und einer 1:25 Verdünnung der Pflanzenextrakte.

(b) Fragmentierungsanalyse des unbekanntes Schwefelmetaboliten mit der annotierten Summenformel $C_{16}H_{26}N_3O_{10}S$. Zur weiteren Charakterisierung wurden nach der Isolierung der Massen des jeweils ³²S- und ³⁴S-Isotops, 452.1345 [m-H] und 454.130 [m-H] (Zeile 1 und 3), diese mittels Kollision mit Argonatomen mit einer Energie von 5 eV fragmentiert (Zeile 2 und 4). Das detektierte Hauptfragment zeigte eine Masse von 306.076 m/z bzw. 308.072 m/z, welches der Masse der korrespondierenden Isotopologen von Glutathion entspricht ([m-H] ± 0.3 ppm bzw. ± 0.7 ppm). Die Massendifferenz zur Ausgangssubstanz betrug 146.058 amu, welches mit einer Abgangsgruppe von $C_6H_{10}O_4$ korreliert (< 0.4 ppm). Die Datenaufnahme erfolgte mit 20 Scans bei negativer Ionisierung.

Republished from Exploring the *Arabidopsis* sulfur metabolome, Gläser *et al.*, The Plant Journal 77, 1. Copyright © (2014) John Wiley and Sons.

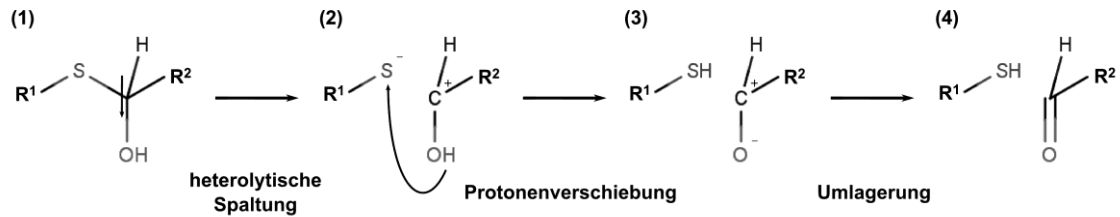


Abbildung 2.34 Heterolytische Bindungsspaltung durch MS/MS-Fragmentierung

Ein isoliertes Ion wird in einer Kollisionskammer durch die Energie beschleunigter Gasphasenatome fragmentiert. Hierbei ist sind die gespaltenen Bindungen üblicherweise solche mit geringer Bindungsstärke (1). Bei der heterolytischen Spaltung werden die Elektronen der Bindung ungleich verteilt und es entstehen geladene Fragmente (2). Durch die Verteilung der Ladung kann es zu einer Protonenverschiebung unter den Fragmenten sowie zu einer intramolekularen Umlagerung kommen um die Produkte zu stabilisieren (2) und (3). Die Umlagerung führt in der Regel zu einem neutralen Fragment, welches nicht mehr detektiert werden kann (4).

Nachdem gezeigt werden konnte, dass wenigstens zwei der spezifisch akkumulierten Massen in *ggt4-1*, 452 und 502, γ -Glutamylderivate sind und eine davon ein endogenes Glutathionkonjugat bildet, sollte untersucht werden ob auch die übrigen *ggt4-1*-abhängigen Massen Kandidaten für Glutathionkonjugate oder deren Derivate sind. Außerdem sollten die Ergebnisse mittels einer allelen Linie für *ggt4-1* bestätigt werden um zu untermauern, dass die Variabilität auf die Genfunktion von GGT4 zurückzuführen ist und keine Artefakte von *ggt4-1* sind. Hierzu wurde in den folgenden Analysen eine T-DNA-Insertionslinie von GGT4 im genetischen Hintergrund von Col-0 (*ggt4-2*; Tabelle 4.2) verwendet. Wie für den Aktivitätsverlust von GGT4 beschrieben wurde ist eine Akkumulation des Konjugats zu erwarten. Durch den verringerten Abbau der Konjugate liegen die Produkte, das Cysteinyl- und das Cysteinylglycin-Konjugat in reduzierter Abundanz vor (Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2007b; Blum *et al.*, 2010). Dieses Verteilungsmuster konnte für sechs der sieben spezifisch veränderten Metaboliten gefunden werden, mit jeweils dem GSH- und dem korrespondierenden Cysteinylkonjugat (Abbildung 2.35). Aus diesen Daten ging hervor, dass das korrespondierende Cysteinylkonjugat zu dem verifizierten Glutathionkonjugat (452.1345 amu), mit der konjugierten Gruppe $C_6H_{11}O_4$, ein Isomer von RHC ist. Dieser Befund erklärt auch die verringerte Abundanz dieser Masse (266.0704 amu) um etwa die Hälfte. Unter den übrigen Kandidaten konnten unter anderem die konjugierten Gruppen $C_4H_5O_4$ und $C_6H_{11}O_5$ zugeordnet werden, welche mit Konjugaten einer Dicarboxyethyl- bzw. Glucopyranosylgruppe übereinstimmen würden (Wang und Ballatori 1998) (Abbildung 2.36).

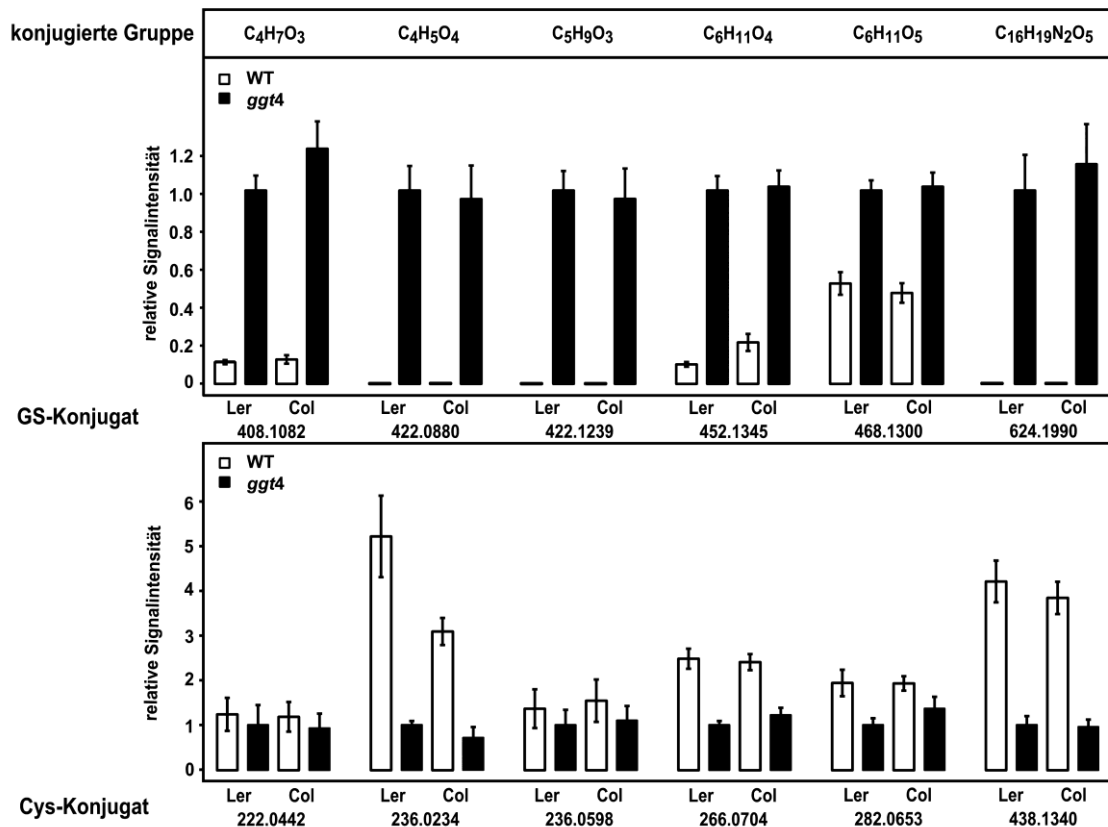


Abbildung 2.35 Putative Glutathionkonjugate mit veränderter Abundanz in *ggt4*

Von den in *ggt4-1* akkumulierten Massen (Abbildung 3.32) wurden Glutathionkonjugate abgeleitet und in zwei allelen Mutanten von GGT4 in *Ler-0* und *Col-0* basierten Linien analysiert. Die Signale der postulierten Glutathionkonjugate (oben) und der korrespondierenden Cysteinylnkonjugate (unten) wurden relativ zur Signalintensität von *ggt4-1* in *Ler-0* (=1) dargestellt. Die gezeigten Mittelwerte mit SD setzen sich aus den Analysen von zwei biologischen Replikaten in zweifacher, technischer Wiederholung zusammen. Die Datenaufnahme erfolgte mit 1000 Scans bei negativer Ionisierung und einer 1:25 Verdünnung der Pflanzenextrakte.

Republished from Exploring the *Arabidopsis* sulfur metabolome, Gläser *et al.*, The Plant Journal 77, 1. Copyright © (2014) John Wiley and Sons.

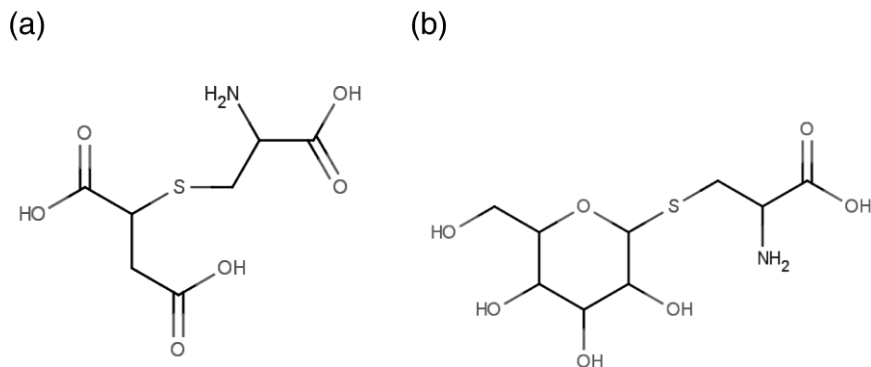


Abbildung 2.36 Struktur endogener Cysteinylnkonjugate

Cysteinylnkonjugate als Abbauprodukte der endogenen Glutathionkonjugate von Malat und Glucose. Dicarboxyethylcystein (a) und Glucosylcystein (b).

Des Weiteren konnten durch die parallele Analyse von *ggt4-2* im Ökotyp Col-0 die Daten von *ggt4-1* in Ler-0 bestätigt werden. So sind die schwefel-metabolischen Veränderungen spezifisch auf die GGT4-Defizienz zurück-zuführen.

Neben der Verwendung von Mutanten zur Funktionsanalyse von GGTs, können GGTs mittels spezifischer Inhibitoren irreversibel gehemmt werden. So können metabolische Effekte unabhängig von einem mutagenisierten Pflanzenhintergrund untersucht werden. Als effektive Inhibitoren von GGTs sind Acivicin und 6-Diazo-5-oxo-L-norleucin (DON) beschrieben worden (Hartman und Stochaj 1973; Nakano *et al.*, 2006a). Acivicin sowie DON binden aufgrund ihrer Strukturanalogie irreversible die Aminosäurereste, die auch für die Interaktion mit der γ -Glutamylgruppe verantwortlich sind (Wada *et al.*, 2008) (Abbildung 2.37). Neben der Inhibition von GGTs, ist für Acivicin außerdem ein Hemmung von Glutaminamidotransferasen beschrieben sowie wie ein beeinträchtigt Wachstum (Blum *et al.*, 2007; Maeda *et al.*, 2014). So sind hier im Vergleich zur Mutante weitere sekundäre Effekte zu erwarten.

Zunächst wurde die Vitalität der Keimlinge bei Inhibitorexposition untersucht. Keimlinge wurden auf Standardnährmedium angezogen, für sieben Tage vorkultiviert und schließlich auf Medien mit unterschiedlichen Konzentrationen des jeweiligen Inhibitors umgesetzt und für drei bzw. sieben Tage exponiert.

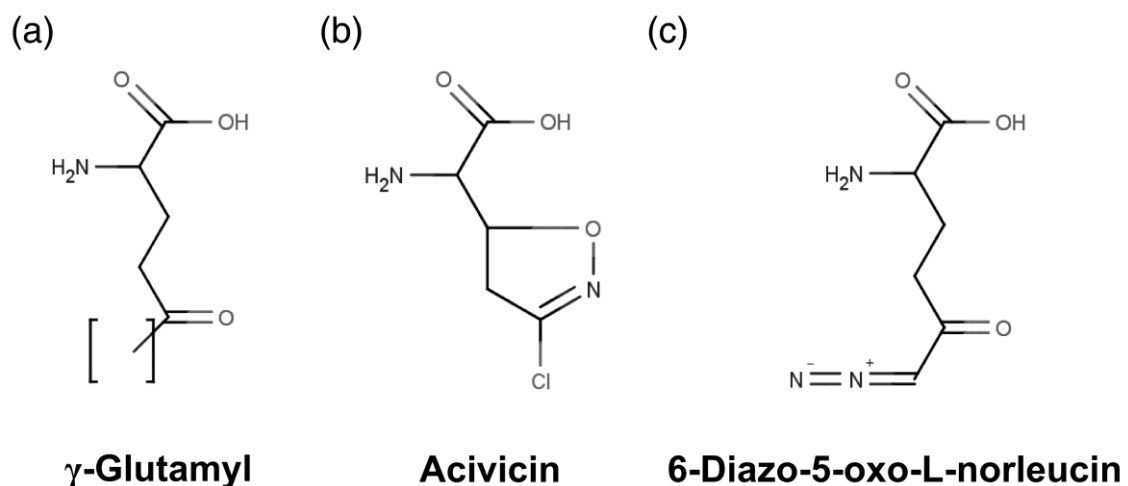


Abbildung 2.37 Molekülstruktur von γ -Glutamyltransferasesubstraten und Inhibitoren
 Die GGT-Inhibitoren Acivicin (b) und 6-Diazo-5-oxo-L-norleucin (c) sind Strukturanaloga der γ -Glutamylgruppe (a), welche das physiologische Substrat der GGTs ist.

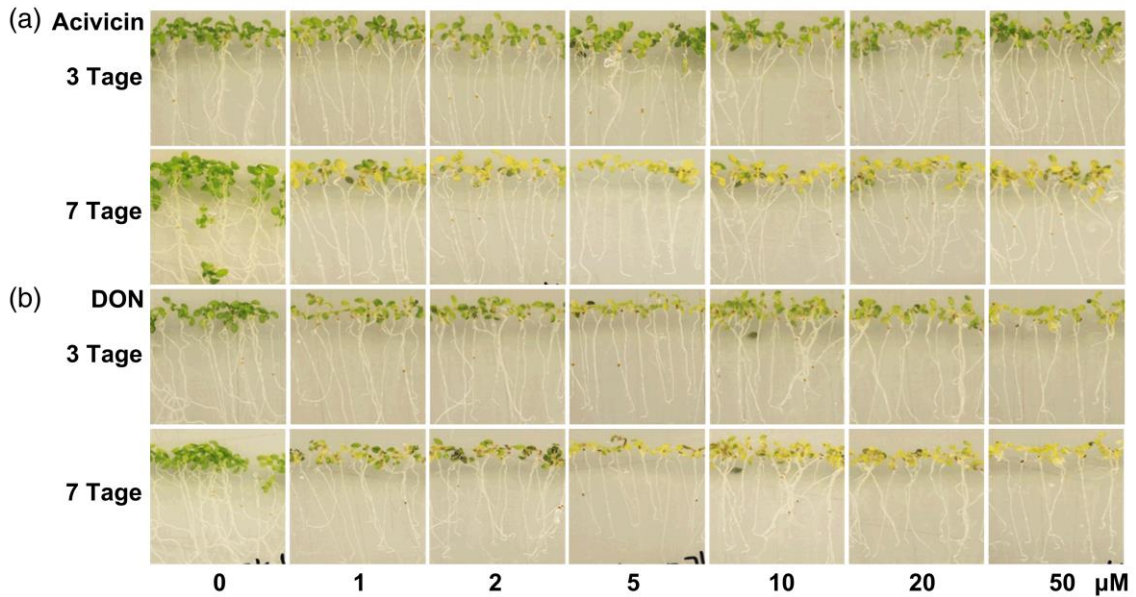


Abbildung 2.38 Einfluss von spezifischen GGT-Inhibitoren auf die Vitalität von *Arabidopsis*-Keimlingen des Ökotyps Landsberg.

Untersuchung der Toxizität von Acivicin (a) und 6-Diazo-5-oxo-L-norleucine (DON) (b) in Bezug auf Inhibitor-Konzentration und Expositionszeitraum. Die Anzucht der Keimlinge des Ökotyps *Ler-0* erfolgte für 7 Tage auf 0,5-fach konzentriertem, mit Agar verfestigtem, schwefelfreiem Medium mit $375 \mu\text{M Na}_2\text{SO}_4$ supplementiert. Anschließend wurden die Keimlinge auf entsprechendes Medium mit unterschiedlichen Inhibitor-Konzentrationen umgesetzt und für 3 bzw. 7 Tage exponiert.

Wie bereits beschrieben wurde ist die Vitalität der Keimlinge bereits bei der Exposition von $1 \mu\text{M}$ Inhibitor sowohl bei Acivicin- als auch bei DON-Exposition beeinträchtigt (Blum *et al.*, 2007) (Abbildung 2.38a, b). Bereits nach drei Tagen zeigten die Keimlinge zunehmend Chlorosen. Die Keimlinge, welche auf Acivicin wuchsen zeigten allerdings geringere Auswirkungen auf die allgemeine Vitalität als die Keimlinge auf DON. Schließlich wurden 14 Tage alte Keimlinge des Ökotyps *Ler-0* nach sieben Tagen Inhibitorexposition bei $2 \mu\text{M}$ mittels ICR-FT/MS auf die *ggt4-1*-abhängigen metabolischen Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp *Ler-0* und zu *ggt4-1* untersucht. Für die in *ggt4-1* reduzierten Schwefelmassen konnte nur für die Hälfte der Kandidaten eine eindeutige Korrelation der Inhibitorexposition mit *ggt4-1* gefunden werden (Abbildung 2.39a). Für die akkumulierten Schwefelmassen zeigten die Extrakte von Inhibitor-exponierten Keimlingen in nahezu allen Fällen tendenziell eine Akkumulation, wenngleich nicht im gleichen Ausmaß wie *ggt4-1* (Abbildung 2.39b). Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass beide Inhibitoren grundlegend einen *ggt4-1*-ähnlichen Chemotyp zeigten. Das Abundanzmuster von Acivicin exponiertem Material stimmte mehr mit *ggt4-1* überein, als bei

Exposition von DON. Darüber hinaus sind die physiologischen Beeinträchtigungen der Keimlinge jedoch so erheblich, dass die metabolischen Auswirkungen der Inhibitoren offensichtlich weit über die Hemmung der GGTs hinausgehen und somit nicht für die Simulation eines metabolischen GGT-abhängigen Chemotyps geeignet erscheinen.

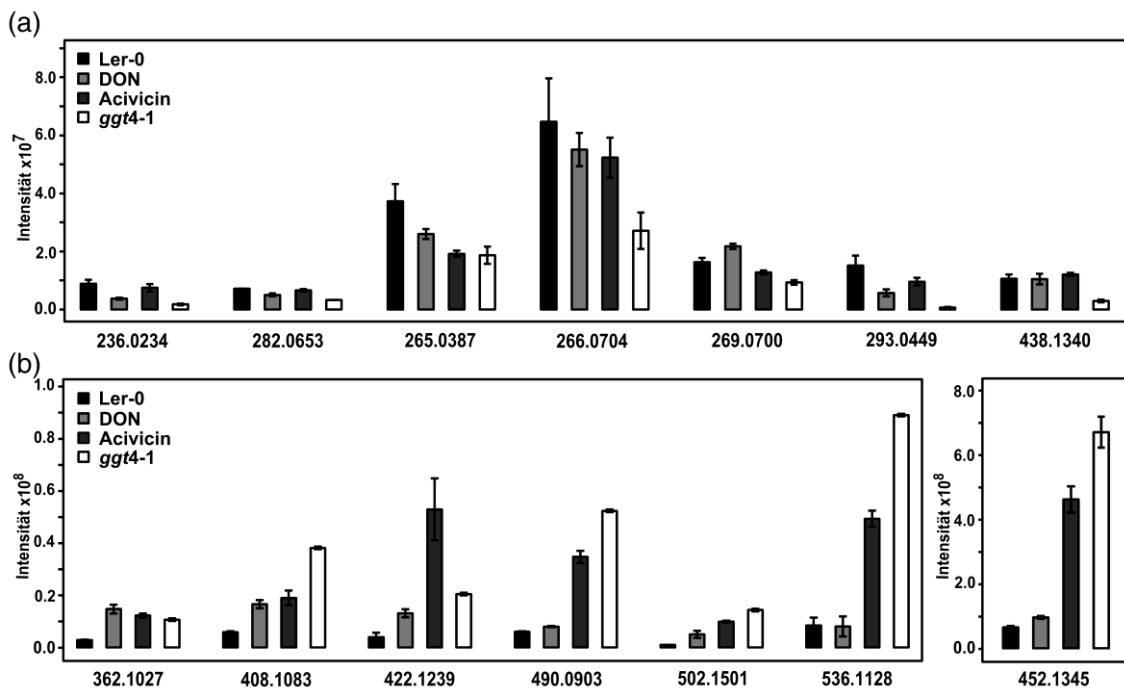


Abbildung 2.39 Analyse des Inhibitor-induzierten Chemotyps im Vergleich zu *ggt4-1*

In Abhängigkeit von GGT-spezifischen Inhibitoren veränderte Schwefelmetabolitabundanz und deren Vergleichbarkeit mit dem Funktionsverlust von GGT4. Die Schwefelmetaboliten, welche in *ggt4-1* spezifisch reduziert (a) oder akkumuliert (b) waren wurden in Keimlingen, welche mit den GGT-Inhibitoren Acivicin und 6-Diazo-5-oxo-L-norleucine (DON) behandelt waren, analysiert.

Die Anzucht der Keimlinge des Ökotyps Ler-0 erfolgte für 7 Tage auf 0,5-fach konzentriertem, mit Agar verfestigtem, schwefelfreiem Medium mit $375 \mu\text{M Na}_2\text{SO}_4$ supplementiert. Anschließend wurden die Keimlinge auf entsprechendes Medium mit unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen umgesetzt und für 3 bzw. 7 Tage exponiert. Die Kontrollen Ler-0 und *ggt4-1* wurden auf Inhibitor-freies Medium umgesetzt. Die gezeigten Mittelwerte mit SD setzen sich aus den Analysen von drei biologischen Replikaten für jeweils ^{32}S - und ^{34}S -Markierung zusammen. Die Datenaufnahme erfolgte mit 300 Scans bei negativer Ionisierung und einer 1:25 Verdünnung der Pflanzenextrakte.

2.4.3.2 Phytochelatinsynthesen

Phytochelatinsynthesen (PCS) wurden aufgrund ihrer Bedeutung für die Schwermetallentgiftung in Pflanzen identifiziert. Phytochelatinsynthesen sind γ -Glutamylcysteinyl-spezifische Transpeptidasen. Sie bilden γ -Glutamylcysteinyl-Oligopeptide aus GSH, bezeichnet als Phytochelatine (PC). Diese können Schwermetallionen in Chelatkomplexen binden, analog zu Metallothioninen in

Vertebraten und Pilzen (Grill *et al.*, 1987; Grill *et al.*, 1989; Vatamaniuk *et al.*, 2004). Neben der Synthese von Phytochelatinen sind die PCS auch am Abbau von Glutathionkonjugaten bei der Abspaltung des Glycinrests beteiligt (Blum *et al.*, 2007). In *Arabidopsis* gibt es zwei Phytochelatinsynthasen. PCS1 ist cytosolisch lokalisiert und im Keimling in allen Geweben exprimiert. Ein Funktionsverlust hat erhebliche Auswirkungen auf die Schwermetalltoleranz und die damit assoziierte Phytochelatinbildung. Außerdem wurde ein inhibierter Abbau von Biman-Konjugaten gezeigt (Grzam *et al.*, 2006; Blum *et al.*, 2010). Demgegenüber ist die Expression von PCS2 gering, welche den Funktionsverlust von PCS1 nicht kompensieren kann. Für den Funktionsverlust von PCS2 wurde bislang kein Phänotyp beschrieben (Cazalé und Clemens 2001; Lee und Kang 2005). Phytochelatinsynthasen sind in zwei Domänen aufgebaut, wobei die γ -Glutamylcysteinyl-spezifische Transpeptidaseaktivität durch die aminoternale, katalytische Domäne vermittelt wird (Ha *et al.*, 1999; Cobbett und Goldsbrough 2002). Der vergleichsweise variable Carboxyterminus ist für die Funktionalität der Phytochelatinsynthese verzichtbar, steigert aber durch seine cysteinreiche Struktur die Stabilität und Effizienz der enzymatischen Reaktion (Ruotolo *et al.*, 2004; Vivares *et al.*, 2005; Romanyuk *et al.*, 2006).

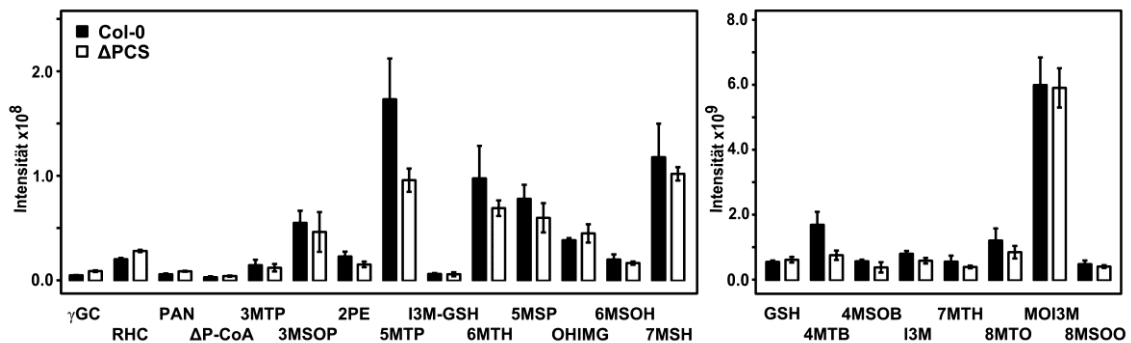


Abbildung 2.40 Variabilität bekannter Schwefelmetaboliten in Abhängigkeit der Aktivität von Phytochelatinsynthasen

Einfluss von Verlust der Phytochelatinsyntheseaktivität in der Doppelmutante von PCS1 und PCS2 (Δ PCS) auf die Abundanz bekannter Schwefelmetaboliten (Tabelle 2.4). Gezeigt sind Mittelwerte der absoluten Signalintensitäten des ³²S-Isotops [m-H] der bekannten Schwefelmetaboliten von Wildtyp Col-0 und Δ PCS. Die Anzucht der Keimlinge erfolgte für 14 Tage auf 0,5-fach konzentriertem, mit Agar verfestigtem, schwefelfreiem Medium mit 375 μ M Na₂SO₄ supplementiert. Die gezeigten Mittelwerte mit SD setzen sich aus den Analysen von zwei biologischen Replikaten in zweifacher, technischer Wiederholung zusammen. Die Datenaufnahme erfolgte mit 300 Scans bei negativer Ionisierung und einer 1:25 Verdünnung der Pflanzenextrakte.

Aufgrund der verbreiteten und konstitutiven Expression wurde der Einfluss von PCS auf den Schwefelmetabolismus untersucht. Hierzu wurde eine Doppelmutante aus PCS1 und PCS2 (Δ PCS) verwendet (Blum *et al.*, 2007) (Tabelle 4.2).

Die Analyse der Abundanz bekannter Schwefelmetaboliten in Δ PCS zeigte keine drastischen Veränderungen gegenüber dem Wildtyp (Abbildung 2.40). Es konnten lediglich zwei nicht annotierte Schwefelmetaboliten detektiert werden, welche Änderungen gegenüber dem Wildtypsignal aufwiesen (Abbildung 2.41). Auffallend war die nominale Masse 510, da diese auch schon in der Analyse von *atps1* detektiert werden konnte. Für *atps1* war die Masse 510 auch, wie für Δ PCS in der Abundanz gegenüber dem Wildtyp reduziert, wenngleich lediglich um ein Drittel. Für Δ PCS konnte eine Reduktion um etwa die Hälfte festgestellt werden. Dennoch stellt die beobachtete Reduktion der Masse 510 in *atps1* die Spezifität der veränderten Abundanz in Verbindung mit dem Verlust der Transpeptidaseaktivität in Frage.

Da die Veränderungen im Schwefelmetabolom der Δ PCS eher unauffällig waren, wurde der Einfluss von Cadmiumexposition auf die Keimlinge untersucht. Cadmiumionen induzieren in den Keimlingen Prozesse der Detoxifizierung, wie der Phytochelatinsynthese. So wurde die spezifische Aktivierung der Phytochelatinsynthasen durch die Anwesenheit von Schwermetallionen, insbesondere durch Cadmium beschrieben (Oven *et al.*, 2002; Lee und Korban 2002; Beck *et al.*, 2003; Ogawa *et al.*, 2011). Analysen von PCS-defizienten Linien zeigten außerdem eine erhöhte Akkumulation von GSH (Mendoza-Cózatl und Moreno-Sánchez 2006). Zur Untersuchung des Einflusses der Cadmiumexposition auf das Schwefelmetabolom, wurden Keimlinge von Δ PCS und dem korrespondierenden Wildtyp Col-0 für 14 Tage auf schwefelfreiem Anzuchtmedium supplementiert mit jeweils $\text{Na}_2^{32}\text{SO}_4$ und $\text{Na}_2^{34}\text{SO}_4$ angezogen und anschließend in Flüssigkultur für vier Stunden mit 200 μM Cadmiumnitrat belastet (Jobe *et al.*, 2012). Die Analyse der Extrakte identifizierte fünf Schwefelmassen, welche ein verändertes Abundanzmuster gegenüber dem Wildtyp zeigten, darunter die Massen von γ EC und GSH (Abbildung 2.42).

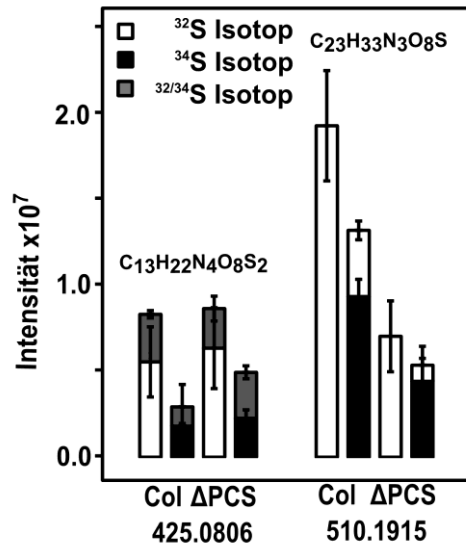


Abbildung 2.41 Veränderte Abundanz von Schwefelmetaboliten in der ΔPCS-Mutante

In Abhängigkeit von fehlender Aktivität von PCS1 und PCS2 (ΔPCS) wurden nicht annotierte Schwefelmetaboliten mit veränderter Abundanz zum Wildtyp (Col-0), jeweils in ³²S- und ³⁴S-markierten Keimlingen von *Arabidopsis* detektiert. Die zugeordnete Summenformel entspricht der molekularen Komposition mit der geringsten Massenabweichung gültig für C₀₋₁₀₀H_nN₀₋₆O₀₋₈₀P₀₋₄S₁₋₃ bei einer Ladung von -1 [m-H]. Die gezeigten Mittelwerte mit SD setzen sich aus den Analysen von zwei biologischen Replikaten in zweifacher, technischer Wiederholung für jeweils ³²S- und ³⁴S-Markierung zusammen. Die Datenaufnahme erfolgte mit 300 Scans bei negativer Ionisierung und einer 1:25 Verdünnung der Pflanzenextrakte.

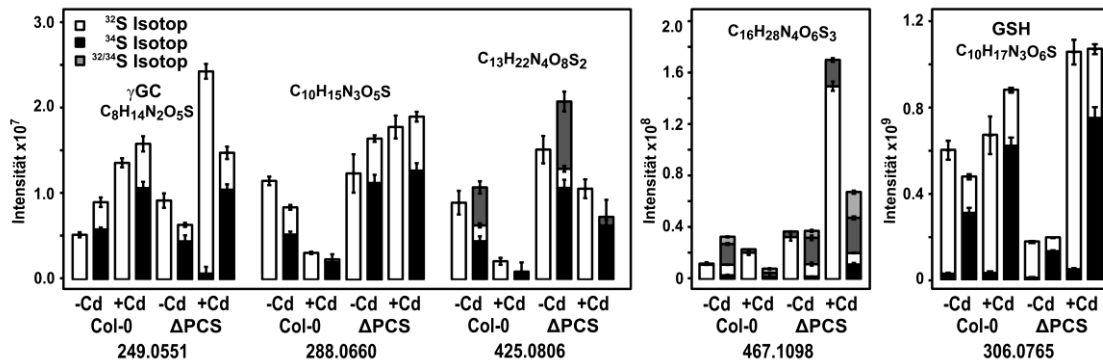


Abbildung 2.42 Veränderte Schwefelmetabolitabundanz in ΔPCS bei Cadmiumexposition

Bei Cadmiumexposition von ΔPCS wurden Schwefelmetaboliten mit veränderter Abundanz zum Wildtyp (Col-0), jeweils in ³²S- und ³⁴S-markierten Keimlingen von *Arabidopsis* detektiert. Die zugeordnete Summenformel entspricht der molekularen Komposition mit der geringsten Massenabweichung gültig für C₀₋₁₀₀H_nN₀₋₆O₀₋₈₀P₀₋₄S₁₋₃ bei einer Ladung von -1 [m-H]. Neben den nicht annotierten Schwefelmassen, konnten γEC und GSH identifiziert werden. Die Anzucht der Keimlinge erfolgte für 14 Tage auf 0,5-fach konzentriertem, mit Agar verfestigtem, schwefelfreiem Medium mit 375 μM Na₂SO₄ supplementiert. Anschließend wurden die Keimlinge zur Cadmiumexposition in Flüssigkulturen von 0,5-fach konzentriertem, schwefelfreiem Medium mit 375 μM Na₂SO₄ supplementiert überführt und mit Cadmiumnitrat zu einer Endkonzentration von 200 μM versetzt und vier Stunden unter Schütteln exponiert (+Cd). Als Kontrollen wurden Kulturen ohne Cadmiumzugabe mitgeführt (-Cd). Die gezeigten Mittelwerte mit SD setzen sich aus den Analysen von zwei biologischen Replikaten in zweifacher, technischer Wiederholung für jeweils ³²S- und ³⁴S-Markierung zusammen. Die Datenaufnahme erfolgte mit 300 Scans bei negativer Ionisierung und einer 1:25 Verdünnung der Pflanzenextrakte.

γ EC und GSH sowie die nominale Masse 425 zeigten in der Tendenz in Wildtyp und Δ PCS eine ähnliche Reaktion auf die Cadmiumexposition. γ EC und GSH zeigten eine etwa zweifache bzw. vierfache Akkumulation in Δ PCS. Im Wildtyp, wurde lediglich eine Anreicherung um etwa ein Drittel der beiden Metaboliten beobachtet. Die nominale Masse 425 lag war im Gehalt gegenüber dem Wildtyp reduziert, wobei die Abundanz in Δ PCS sowohl vor als auch nach der Cadmiumexposition um wenigsten ein Drittel erhöht war. Die Schwefel-metaboliten mit den nominalen Massen 288 und 467, mit den zugeordneten Summenformeln $C_{10}H_{15}N_3O_5S$ und $C_{16}H_{28}N_4O_6S_3$, zeigten in Δ PCS und Wildtyp ein entgegengesetztes Verhalten. Im Wildtyp führte die Cadmiumexposition jeweils eher zu einer Reduktion, in Δ PCS ist die Abundanz in Abhängigkeit von Cadmium gesteigert. Die Massen der in Folge von Cadmiumexposition gebildeten Phytochelatine (PC_2) konnten nur in Spuren detektiert werden. Ihre Intensität in den Massenspektren der Cadmium-exponierten Proben lag nah am Detektionslimit von 10^6 und die Schwefelmassenverschiebung durch ^{34}S konnte nicht detektiert werden. Die entsprechenden Massen waren in den Proben ohne Cadmiumexposition nicht zu detektieren.

Zur Analyse additiver Effekte der Komponenten des GSH-assozierten Metabolismus wurden Kreuzungslinien von Δ PCS bzw. Δ PCS1, *ggt4-1* und *ggt1* im Vergleich zum Wildtyp Col-0 untersucht. Da die Linien *ggt1* und *ggt4-1* assoziiert mit dem Wildtyp *Ler-0* sind, zeigten alle drei untersuchten Kreuzungslinien Δ PCS*xggt4-1*, Δ PCS*xggt1* und Δ PCS1*xggt1xggt4-1* die *Ler-0*-spezifischen Veränderungen der Glucosinolatprofile (Abbildung 2.43a, b, c). Durch die Kreuzung gegen das Col-0-Genom von Δ PCS zeigten Δ PCS*xggt1* und Δ PCS1*xggt1xggt4-1* eine Annäherung an das Glucosinolatprofil des Wildtyps Col-0. Dies galt für Δ PCS*xggt4-1* nur sehr eingeschränkt, hier dominierte das *Ler-0*-Muster. Weiterhin war in Δ PCS*xggt4-1* und Δ PCS1*xggt1xggt4-1* die *ggt4-1*-spezifische Reduktion für RHC zu beobachten. Bei der Analyse der nicht annotierten Schwefelmetaboliten konnten für Δ PCS*xggt4-1* insgesamt elf in der Abundanz veränderte Schwefelmassen identifiziert werden (Abbildung 2.44a). Die gefundenen Metaboliten mit den Massen 265.0387 amu, 282.0653 amu und 452.1345 amu wurden bereits in Abhängigkeit von *ggt4-1* nachgewiesen. Weiterhin korrelierten 341.09112 amu und 514.1653 amu mit *Ler-0*-spezifischen Massen und 510.1915 amu wurde

ERGEBNISSE

bereits in Verbindung mit Δ PCS beschrieben. Die übrigen fünf Massen waren basierend auf den vorliegenden Daten charakteristisch für Δ PCS $xggt4-1$. Drei dieser Schwefelmassen zeigten eine reduzierte Abundanz gegenüber dem Wildtyp, die anderen zwei waren akkumuliert. Den reduzierten Massensignalen 267.0544 amu, 317.0548 amu und 341.0846 amu wurden die Summenformeln $C_9H_{16}O_7S$, $C_9H_{18}O_{10}S$ und $C_{11}H_{22}N_2O_6S_2$ zugeordnet. Die angereicherten Schwefelmassen 395.1745 amu und 469.0810 amu haben eine chemische Zusammensetzung von $C_{17}H_{32}O_8S$ und $C_{20}H_{22}O_{11}S$.

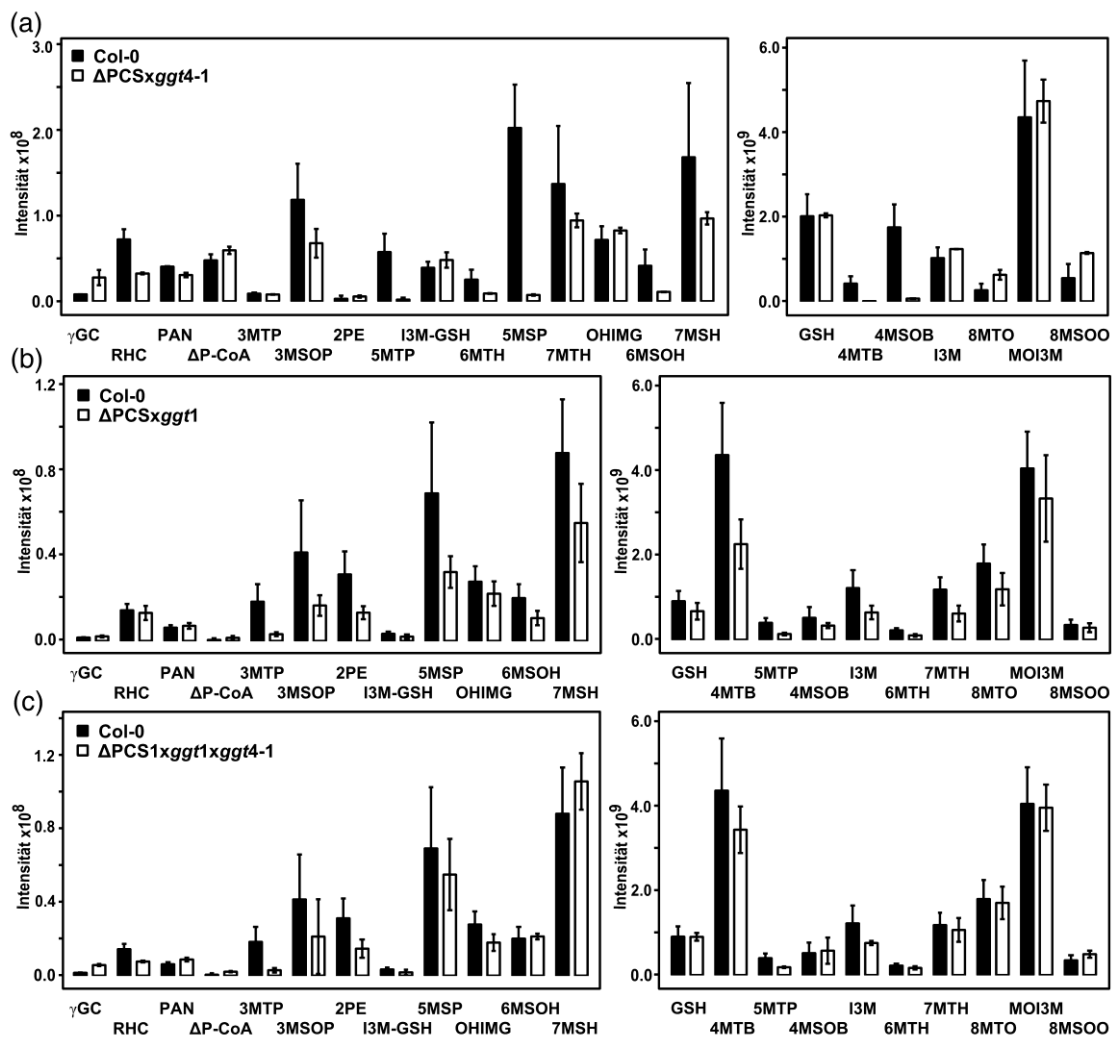


Abbildung 2.43 Variabilität bekannter Schwefelmetaboliten in Abhängigkeit von gleichzeitigem Aktivitätsverlust der Phytochelatinsynthesen und einzelner GGTs

Einfluss der Tripelmutanten Δ PCS $xggt4-1$ (a), Δ PCS $xggt1$ (b) und Δ PCS1 $xggt1xggt4-1$ (c) auf die Abundanz bekannter Schwefelmetaboliten (Tabelle 2.4). Mittelwerte der absoluten Signalintensitäten des ^{32}S -Isotops [m-H] der bekannten Schwefelmetaboliten von Wildtyp Col-0 und Δ PCS $xggt1$. Der korrespondierende Wildtyp zu $ggt1$ und $ggt4-1$, $Ler-0$ wurde in diesem Versuch nicht analysiert. Die Anzucht der Keimlinge erfolgte für 14 Tage auf 0,5-fach konzentriertem, mit Agar verfestigtem, schwefelfreiem Medium mit $375 \mu M Na_2SO_4$ supplementiert. Die gezeigten Mittelwerte mit SD setzen sich aus den Analysen von zwei biologischen Replikaten in zweifacher, technischer Wiederholung zusammen. Die Datenaufnahme erfolgte mit 300 Scans bei negativer Ionisierung und einer 1:25 Verdünnung der Pflanzenextrakte.

Für $\Delta\text{PCS1xggt1}$ konnten in dieser Analyse lediglich drei spezifisch reduzierte Schwefelmassen zugeordnet werden, von denen wiederum zwei, 341.0912 amu und 514.1653 amu bereits als *Ler-0*-spezifisch beschrieben wurden (Abbildung 2.44b).

Für $\Delta\text{PCS1xggt1xggt4-1}$ konnten hingegen sieben Schwefelmetaboliten als spezifisch selektiert werden (Abbildung 2.44c). Auch hier waren drei der Massen *Ler-0*-spezifisch, 451.0704 amu, 465.0497 amu und 514.1653 amu, und 452.1334 amu war charakteristisch für *ggt4-1*. Die $\Delta\text{PCS1xggt1xggt4-1}$ -spezifisch veränderten Schwefelmassen 421.0599 amu und 664.2185 amu lagen gegenüber dem Wildtyp vierfach bis zehnfach akkumuliert vor. 492.1334 amu war wenigstens um zwei Drittel reduziert. Diesen Massen konnten Summenformeln $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_9\text{S}$, $\text{C}_{32}\text{H}_{46}\text{NO}_6\text{P}_3\text{S}$ und $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{NO}_9\text{S}$ zugeordnet werden.

Die neuen, akkumulierten Schwefelmetaboliten in den *ggt4-1*-assoziierten Linien boten keine Grundlage zur Annahme, dass es sich hierbei um weitere GSH-Derivaten handeln könnte, da deren Summenformeln keinen oder nicht genügend Stickstoff enthielten. Weitere Analysen von Struktur und der Abhängigkeit von der GGT-Aktivität wären erforderlich um die Kandidatenmassen näher zu beschreiben. Allerdings ist für die Kreuzungslinien zu beachten, dass die spezifischen Effekte auch durch die Diskrepanz des Ökotyps induziert sein könnten. Die Analysen der Kreuzungsmutanten zeigten vorwiegend die Summe der in den Einzelmutanten beobachteten Effekte. Der untersuchte Einfluss des Funktionsverlusts von PCS und GGTs resultierte in der Identifikation von einem Glutathionkonjugat mit der Masse 452.1334 amu und fünf weiteren Kandidaten. Hierbei wurde der größte Einfluss auf den Glutathionkonjugatmetabolismus durch GGT4 vermittelt. Die übrigen untersuchten Linien, GGT1, GGT2 und ΔPCS , brachten keine weiterführenden Ergebnisse. Ein additiver Effekt von PCS und GGTs konnte in den Kreuzungslinien nur eingeschränkt beobachtet werden, die Kreuzungslinien waren im Ergebnis vielmehr die Summe der Ausgangslinien.

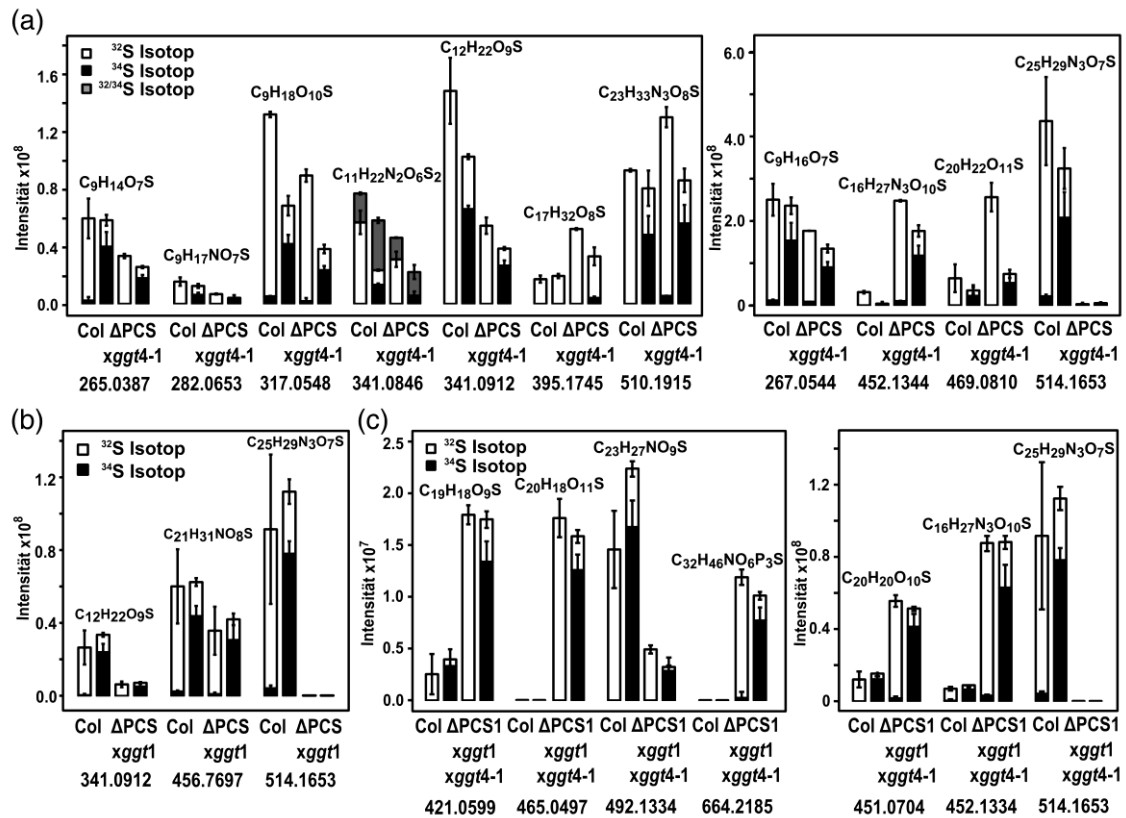


Abbildung 2.44 Veränderte Schwefelmetabolitabundanz bei gleichzeitigem Aktivitätsverlust der Phytochelatinsynthesen und einzelner GGTs.

In Abhängigkeit unterschiedlicher Kombinationen fehlender Aktivität von PCS1, PCS2, GGT1 und GGT4 wurden nicht annotierte Schwefelmetaboliten mit veränderter Abundanz zum Wildtyp (Col-0) detektiert, jeweils in ^{32}S - und ^{34}S -markierten Keimlingen von *Arabidopsis*. Der verwendete Wildtyp war Col-0, welcher dem genetischen Hintergrund von PCS1 und PCS2 entspricht. Der korrespondierende Wildtyp zu *ggt1* und *ggt4-1* ist Ler-0 und wurde in diesem Versuch nicht analysiert. Die untersuchten Tripelmutanten waren $\Delta PCSxggt4-1$ (a), $\Delta PCSxggt1$ (b) und $\Delta PCS1xggt1xggt4-1$ (c). Die zugeordnete Summenformel entspricht der molekularen Komposition mit der geringsten Massenabweichung gültig für $C_{0-100}H_nN_{0-6}O_{0-80}P_{0-4}S_{1-3}$ bei einer Ladung von -1 [m-H]. Die gezeigten Mittelwerte mit SD setzen sich aus den Analysen von zwei biologischen Replikaten in zweifacher, technischer Wiederholung für jeweils ^{32}S - und ^{34}S -Markierung zusammen. Die Datenaufnahme erfolgte mit 1000 Scans bei negativer Ionisierung und einer 1:25 Verdünnung der Pflanzenextrakte.

2.4.4 Loss-of-function Mutationen in der Glucosinolatbiosynthese

Glucosinolate bilden einen großen Anteil der Schwefelmetaboliten in *Brassicaceae* und sind Schlüsselmetaboliten deren Abwehr gegen Fraßfeinde und Pathogene (Halkier und Gershenzon 2006; Bednarek *et al.*, 2009; Clay *et al.*, 2009). Glucosinolate werden strukturell in drei Gruppen unterschieden in Abhängigkeit von der Aminosäurevorstufe aus der sie gebildet werden. Die Biosynthese von aliphatischen Glucosinolaten erfolgt aus den Aminosäuren Alanin, Leucin, Isoleucin, Valin und Methionin. Phenylalanin und Tryptophan bilden Benzylglucosinolate und Tryptophan Indolglucosinolate. Die Glucosino-

latbiosynthese ist in drei Stufen gegliedert: Kettenverlängerung durch Methylengruppen, Bildung der Glucosinolatkernstruktur und Modifikation der Seitenketten (Underhill *et al.*, 1973; Halkier und Du 1997). Die Vielfalt der über 120 beschriebenen Glucosinolatstrukturen wird dabei durch die Aminosäurevorstufe, die Zyklen der Kettenverlängerung und durch sekundäre Modifikationen bestimmt (Fahey *et al.*, 2001). Für *Arabidopsis* sind etwa 40 Glucosinolate beschrieben, vorwiegend Abkömmlinge von Methionin und Tryptophan (Kliebenstein *et al.*, 2001b). Die Glucosinolatkernstruktur wird durch Konversion der Aminosäure-basierten Vorstufe zu Aldoximen erzeugt, welche anschließend durch Oxidation aktiviert werden (Abbildung 1.5). Diese Reaktionen werden durch P450 Zytochrome der Familien CYP79 und CYP83 katalysiert. Im Folgenden werden die Aldoxime an einen Schwefeldonor konjugiert, postuliert als GSH (Schlaeppli *et al.*, 2008; Bednarek *et al.*, 2009). Schließlich wird das entstandene S-Alkyl mittels Glucosyltransferasen des Typs UGT74 glucosyliert und bildet die Desulfo-Vorstufe, welche durch Sulfatierung mit PAPS zum Glucosinolat wird (Sønderby *et al.*, 2010).

2.4.4.1 P450 Zytochrome der Glucosinolatbiosynthese

Der initiale Schritt der Glucosinolatbiosynthese wird durch die P450 Zytochrome der CYP79 Familie vermittelt. Für *Arabidopsis* sind fünf *Loci* beschrieben die spezifisch für die Synthese der drei Glucosinolatgruppen verantwortlich sind. So können CYP79F1 und CYP79F2 den aliphatischen Glucosinolaten zugeordnet werden, CYP79A2 den Benzyl- und CYP79B2 und CYP79B3 den Indolglucosinolaten (Hull *et al.*, 2000; Mikkelsen *et al.*, 2000; Wittstock und Halkier 2000; Hansen *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2003). Für den Funktionsverlust von *cyp79F1* wurde gezeigt, dass die Synthese kurzkettiger aliphatischer Glucosinolate beeinträchtigt ist (Reintanz *et al.*, 2001). Gleichermaßen fehlen in *cyp79B2xcyp79B3* Indolglucosinolate (Zhao *et al.*, 2002). Die Synthese von Glucosinolaten findet im Allgemeinen im Cytosol statt, wie Lokalisationsstudien belegen (Reintanz *et al.*, 2001). Neben der Biosynthese von Indolglucosinolaten sind CYP79B2 und CYP79B3 auch in den Metabolismus des Phytoalexins Camalexin involviert, welches ebenfalls Indole-3-Acetaldoxime (IAOx) als Vorstufe verwendet und entsprechend durch den Aktivitätsverlust von CYP79B2 und CYP79B3 beeinträchtigt ist (Glawischnig *et al.*, 2004).

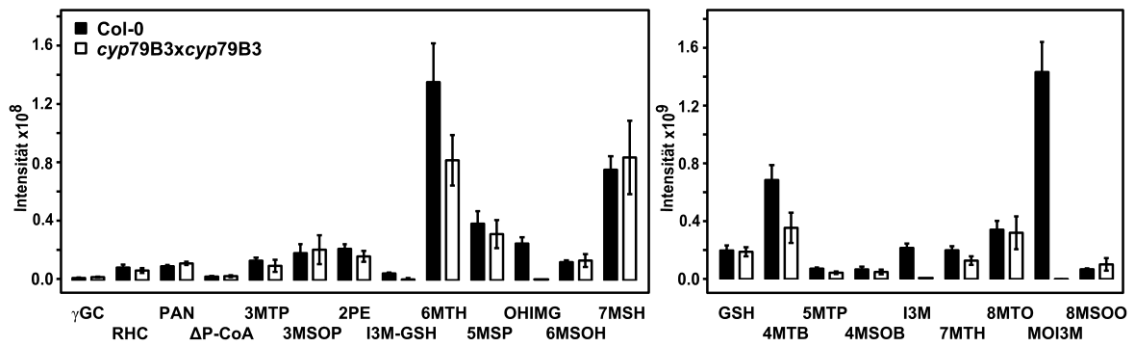


Abbildung 2.45 Variabilität bekannter Schwefelmetaboliten in Abhängigkeit vom Aktivitätsverlust der P450 Zytochrome der Indolglucosinolatbiosynthese

Einfluss der Doppelmutante von CYP79B2 und CYP79B3 auf die Abundanz bekannter Schwefelmetaboliten (Tabelle 2.4). Mittelwerte der absoluten Signalintensitäten des ³²S-Isotops [m-H] der bekannten Schwefelmetaboliten von Wildtyp Col-0 und cyp79B2xcyp79B3. Die Anzucht der Keimlinge erfolgte für 14 Tage auf 0,5-fach konzentriertem, mit Agar verfestigtem, schwefelfreiem Medium mit 375 μM Na₂SO₄ supplementiert. Die gezeigten Mittelwerte mit SD setzen sich aus den Analysen von zwei biologischen Replikaten in zweifacher, technischer Wiederholung zusammen. Die Datenaufnahme erfolgte mit 300 Scans bei negativer Ionisierung und einer 1:25 Verdünnung der Pflanzenextrakte.

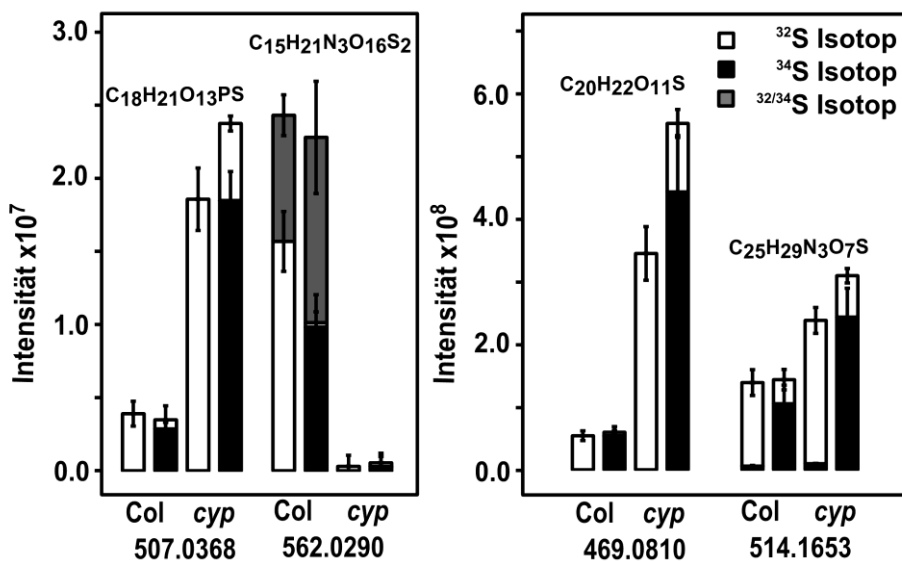


Abbildung 2.46 Veränderte Schwefelmetabolitabundanz in cyp79B2xcyp79B3

In Abhängigkeit von fehlender Aktivität der P450 Zytochrome CYP79B2 und CYP79B3 (*cyp*) wurden nicht annotierte Schwefelmetaboliten mit veränderter Abundanz zum Wildtyp (Col-0), jeweils in ³²S- und ³⁴S-markierten Keimlingen von *Arabidopsis* detektiert. Die zugeordnete Summenformel entspricht der molekularen Komposition mit der geringsten Massenabweichung gültig für C₀₋₁₀₀H_nN₀₋₆O₀₋₈₀P₀₋₄S₁₋₃ bei einer Ladung von -1 [m-H]. Die gezeigten Mittelwerte mit SD setzen sich aus den Analysen von zwei biologischen Replikaten in zweifacher, technischer Wiederholung für jeweils ³²S- und ³⁴S-Markierung zusammen. Die Datenaufnahme erfolgte mit 300 Scans bei negativer Ionisierung und einer 1:25 Verdünnung der Pflanzenextrakte.

Zur Analyse des Einflusses der P450 Zytochrome CYP79B2 und CYP79B3 wurde eine Kreuzung von T-DNA-Insertionslinien der beiden *Loc*i untersucht (Zhao *et al.*, 2002) (Tabelle 4.2). Neben der häufig beobachteten Variabilität der

Glucosinolate 6MTH und 4MTB, zeigten die Analysen der bekannten Schwefelmetaboliten, dass OHIMG, I3M und MOI3M sowie I3M-GSH bis zur Detektionsschwelle der ICR-FT/MS-Analyse reduziert waren (Abbildung 2.45). Ergänzend zu den erwartungsgemäß reduzierten Indolglucosinolatgehalten wurden drei in *cyp79B2xcyp79B3* angereicherte Schwefelmassen detektiert und eine weitere lag stark reduziert vor (Abbildung 2.46). Da CYP79 sehr früh in der Glucosinolatbiosynthese agiert liegt keine unmittelbare Verknüpfung mit schwefelhaltigen Substraten oder Produkten vor (Abbildung 1.5). So sind die Veränderungen in der Abundanz der Schwefelmetaboliten indirekter Natur, was Schlussfolgerungen über die Identität der Metaboliten erschwert. Dennoch wurde der spezifisch akkumulierte Schwefelmetabolit mit der höchsten Abundanz, 469.0810 amu zur weiteren Charakterisierung mittels Fragmentierung untersucht. Hierbei wurden jeweils die ³²S- und ³⁴S-Isotope zur Analyse eingesetzt. Das Fragmentierungsmuster zeigte zwei resultierende Fragmente mit den Massen 389.125 amu und 341.104 amu (Abbildung 2.47). Da die Produkte der Fragmentierung für beide Isotope gleich waren konnte geschlossen werden, dass die Abgangsgruppen jeweils den Schwefel enthielten. Die Massendifferenz war 79.956 amu für das Fragment mit 389.125 amu, was einer Abgangsgruppe von SO₃ entspricht. Die zweite Abgangsgruppe betrug 127.977 amu für das Fragment mit 341.104 amu, korrelierend mit einer molekularen Zusammensetzung von CH₄O₅S. Die Abgangsgruppen wurden in der Analyse nicht detektiert, wobei 79.956 amu sich außerhalb des Messbereichs befand. Es ist außerdem möglich, dass 341.104 amu kein Primärfragment war sondern durch Fragmentierung von 389.125 amu gebildet wurde und daher die Abgangsgruppen jeweils außerhalb des Messbereichs lagen. Aufgrund der elementaren Zusammensetzung von C₁₉H₁₈O₆ des verbleibenden Fragments 341.104 amu ist zu erwarten, dass die Verbindung reich an Doppelbindungen ist und aromatische Strukturen enthält. Mittels Metlin und ChemSpider können Metaboliten gefunden werden die in Summenformel, strukturellen Eigenschaften und mit dem Fragmentierungsmuster übereinstimmen. Der naheliegendste Kandidat ist ein sulfatiertes Resveratrolglucosid (Abbildung 2.48). Resveratrol ist ein Phytoalexin, welches erstmals in *Polygonum cuspidatum* gefunden wurde (Takaoka 1939).

ERGEBNISSE

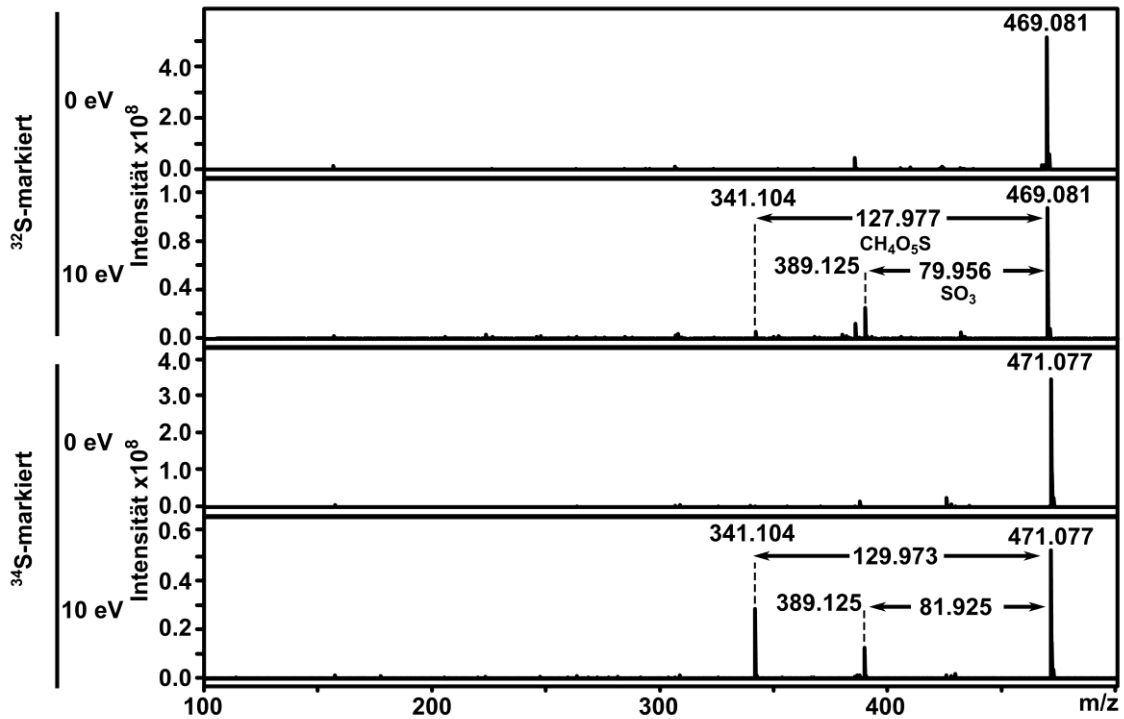


Abbildung 2.47 Fragmentierungsanalyse eines spezifisch akkumulierten Schwefelmetaboliten in **cyp79B2xcyp79B3**

Fragmentierungsanalyse des unbekannten Schwefelmetaboliten mit der annotierten Summenformel $C_{20}H_{22}O_{11}S$. Zur weiteren Charakterisierung wurden nach der Isolierung der Massen des jeweils ^{32}S - und ^{34}S -Isotops, 469.081 [m-H] und 471.077 [m-H] (Zeile 1 und 3), diese mittels Kollision mit Argonatomen durch eine Energie von 10 eV fragmentiert (Zeile 2 und 4). Die detektierten Fragmente wiesen Massen von 389.125 m/z und 341.104 m/z auf, welche den Abgangsgruppen SO_3 (79.956 amu bzw. 81.925 amu) und CH_4O_5S (127.977 amu bzw. 129.973 amu) entsprechen. Die Datenaufnahme erfolgte mit 20 Scans bei negativer Ionisierung.

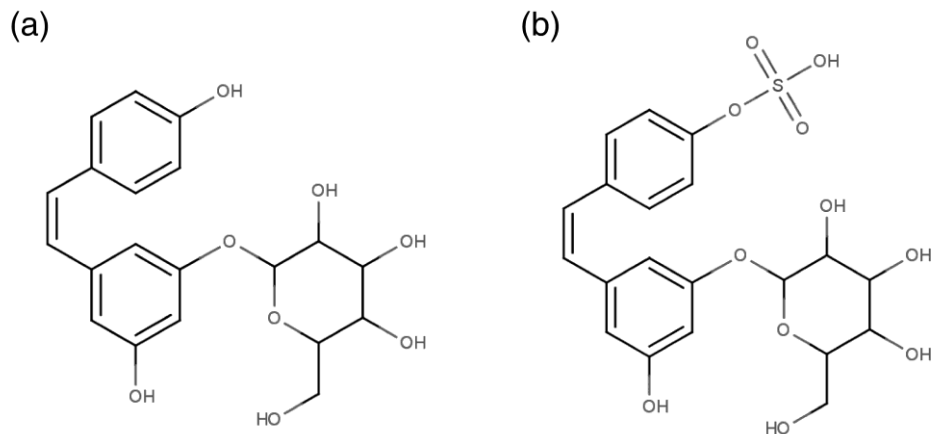


Abbildung 2.48 Struktur von Resveratrolglucosiden

Resveratrolglucosid (a) und sein sulfatiertes Derivat Resveratrolglucosid-Sulfat (b). Die sulfatierte Form des Resveratrolglucosids, kann in unterschiedlichen Formen vorliegen, da das Sulfat an jeder Hydroxylgruppe gebunden sein kann. So können entweder das Resveratrol oder das Glucosid sulfatiert vorliegen.

Außerdem ist es in Leguminosen, Trauben und Erdnüssen vorhanden (Burns *et al.*, 2002). Die antioxidative Wirkung des Polyphenols ist bekannt aus der traditionellen, chinesischen Medizin und wird in Verbindung mit der Prävention von Gefäßerkrankungen und Krebs assoziiert (Tang *et al.*, 2014). Bislang wurden Resveratrol und seine Derivate nicht in Verbindung mit *Arabidopsis* beschrieben und kein homologes Enzym zur Resveratrolsynthese annotiert. Nach den experimentellen Daten erfolgt die Fragmentierung eines putativen Resveratrolglucosids hier zunächst durch die Abspaltung des Sulfats und schließlich durch Aufspaltung der Glucose durch Eliminierung von Formaldehyd und Wasser (H_2CO und H_2O). Ein solches Fragmentierungsmuster der Glucose konnte bereits durch Fragmentierung von Saccharose mittels TOF-MS gezeigt werden

(<http://spectra.psc.riken.jp/menta.cgi/respect/datail/datail?accession=T200600>). Außerdem wurden weitere in der Literatur beschriebene nicht-Schwefel-metaboliten analysiert, welche vom Funktionsverlust der CYP79 betroffen sind. Die untersuchten Metaboliten wurden ursprünglich bei Hemmung der Camalexin Biosynthese in CYP71B15, welche für die Metabolisierung von IAOx verantwortlich ist identifiziert. Es handelt sich dabei um Derivate der Indolcarboxylsäure, welche als Produkt von IAOx spezifisch akkumulierten (Böttcher *et al.*, 2009; Zandalinas *et al.*, 2012) (Abbildung 2.49). Dementsprechend sollten diese Metaboliten bei Ausbleiben der IAOx-Synthese reduziert gegenüber dem Wildtyp auftreten, genauso wie es zu einer Anreicherung des Substrats Tryptophan kommen sollte.

Die Ergebnisse der Analyse zeigten, dass diese Metaboliten detektierbar waren und die Abundanz der $^{13}C_1$ erwartungsgemäß mit den molekularen Zusammensetzungen übereinstimmte. Es wurde beobachtet, dass Tryptophan etwa zweifach gegenüber dem Wildtyp Col-0 akkumuliert war und die beiden Indolcarboxylsäurederivate, I3CO₂Glc und 6-GlcO-I3CO₂H eine starke Abnahme der Abundanz um das neun- bis 16-fache zeigten (Abbildung 2.50). Da ein geringer Gehalt von I3CO₂Glc und 6-GlcO-I3CO₂H vorhanden war, kann entweder eine Restaktivität von CYP79B2 oder CYP79B3 angenommen werden oder es handelt sich um isomere Strukturen, welche unabhängig von IAOx sind.

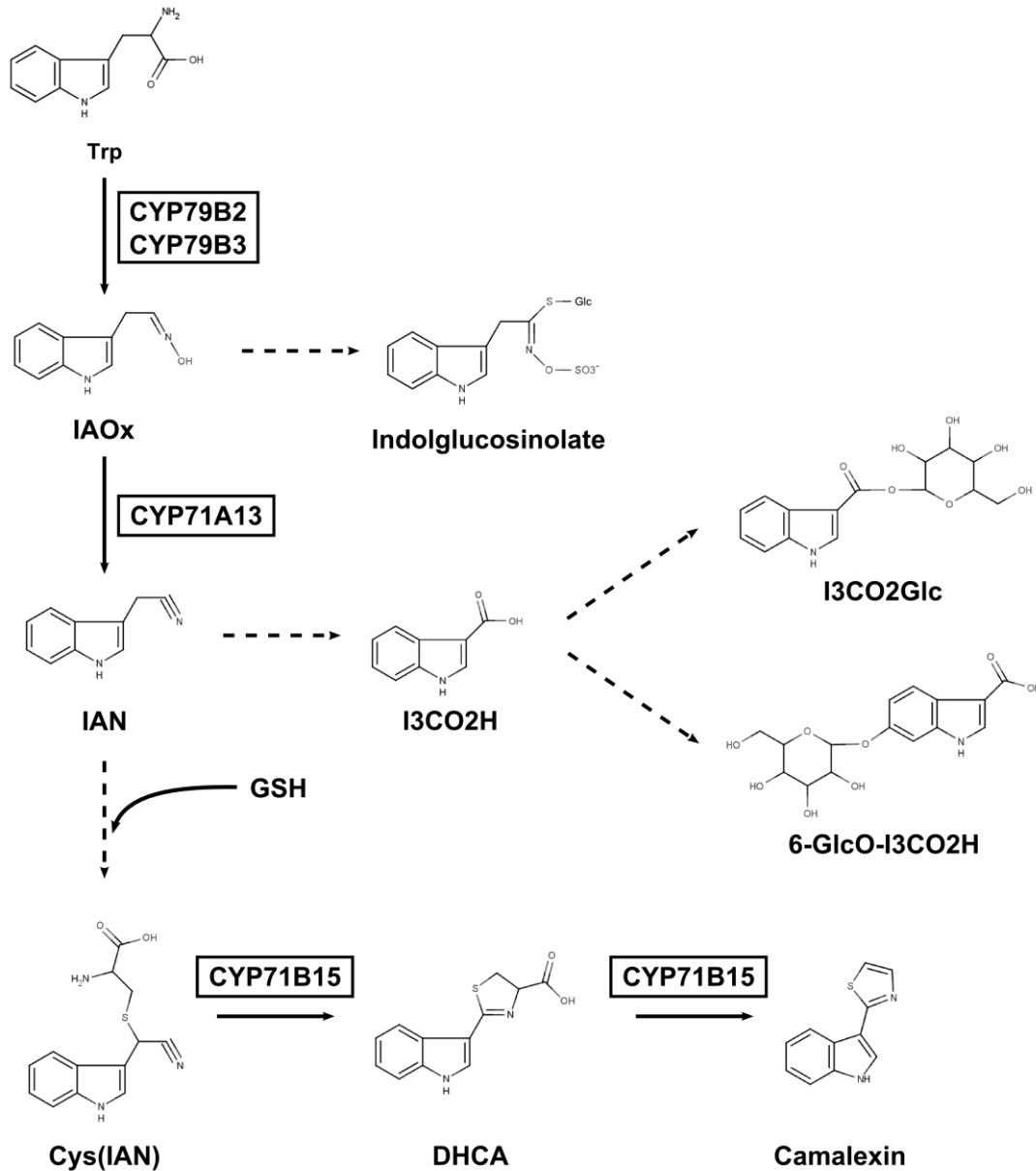


Abbildung 2.49 Schema der Camalexinbiosynthese

Weg der Camalexinbiosynthese ausgehend von Tryptophan. Indol-3-acetaldoxim (IAOx), welches durch CYP79B2 und CYP79B3 gebildet wird, ist ein Vorläufer der Indolglucosinolate sowie für Indolacetonitril (IAN) in der Camalexinbiosynthese. IAN wird an GSH als Schwefeldonor konjugiert. Nach Abspaltung des γ -Glutamyl- und Glycinrest, wird Cys(IAN) durch CYP71B15 über Dihydrocamalexinsäure (DHCA) zu Camalexin umgesetzt. IAN ist außerdem das Substrat für die Synthese von Indolcarboxylsäure und seiner glucosylierten Derivate.

In Anlehnung an Böttcher et al., 2009.

Die Analysen von *cyp79B2cyp79B3* bestätigten erneut die Beeinträchtigung der Indolglucosinolatsynthese sowie die Verknüpfung mit andern IAOx-abhängigen Synthesewegen wie der Indolcarboxylsäurederivatsynthese, welche bereits beschrieben und postuliert wurden (Böttcher *et al.*, 2009). Des Weiteren wurden vier spezifisch veränderte, nicht annotierte Schwefel-

metaboliten gefunden, von denen einer mittels Fragmentierung weiter charakterisiert werden konnte. Der in Abhängigkeit von *cyp79B2xcyp79B3* akkumulierte Metabolit mit der zugeordneten Summenformel $C_{20}H_{22}O_{11}S$, konnte zumindest als Träger einer Sulfatgruppe identifiziert werden. Dies veranlasste dazu die PAPS-abhängigen Daten erneut zu prüfen und es konnte eine Übereinstimmung mit den APK-abhängig veränderten Schwefelmassen gefunden werden. In den Daten zum Funktionsverlust einzelner, sowie mehrerer APKs wurde der gleiche Metabolit, 469.0810 amu, als erheblich reduziert vorgefunden. Dies untermauert, dass es sich um einen PAPS-abhängig sulfatierten, vermutlich aromatischen Metaboliten handelte mit der Summenformel $C_{20}H_{22}O_8$. Das gleiche Abundanzverhalten zwischen *cyp79B2xcyp79B3* und dem Funktionsverlust von APKs konnte auch für den Metabolit 514.1653 amu beobachtet werden. Es ist auch hier anzunehmen, dass es sich um einen sulfatierten Metabolit mit der entsprechenden Summenformel $C_{25}H_{29}N_3O_4$ handelt.

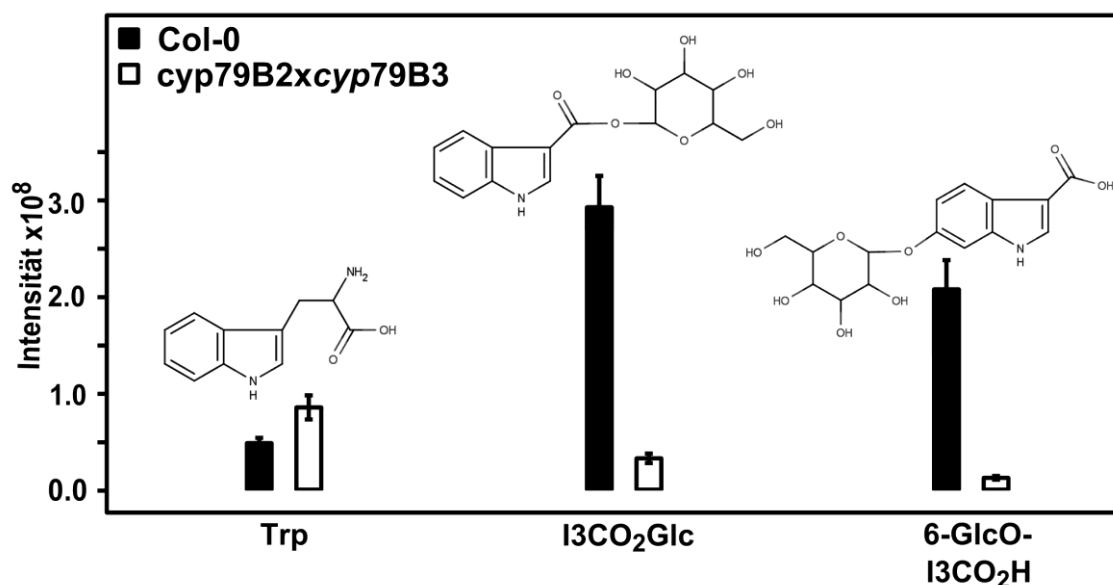


Abbildung 2.50 Einfluss von fehlender Aktivität von CYP79B2 und CYP79B3 auf schwefelfreie Metaboliten assoziierter Stoffwechselwege

Untersuchung der Metabolitabundanz der schwefelfreien Derivate von Indole-3-acetaldoxim (IAOx), I3CO₂Glc und 6-GlcO-I3CO₂H sowie dem Substrat Tryptophan (Trp). Mittelwerte der absoluten Signalintensitäten des ³²S-Isotops von Wildtyp Col-0 und *cyp79B2xcyp79B3*. Die Anzucht der Keimlinge erfolgte für 14 Tage auf 0,5-fach konzentriertem, mit Agar verfestigtem, schwefelfreiem Medium mit 375 µM Na₂SO₄ supplementiert. Die gezeigten Mittelwerte mit SD setzen sich aus den Analysen von vier biologischen Replikaten in zweifacher, technischer Wiederholung zusammen. Die Datenaufnahme erfolgte mit 300 Scans bei negativer Ionisierung und einer 1:25 Verdünnung der Pflanzenextrakte.

Durch die Akkumulation des putativen Resveratrolglucosids und der nominalen Masse 514, welche ein ähnliches Abundanzverhalten in *cyp79B2xcyp79B3* und den *apks* zeigten könnte angenommen werden, dass diese beiden Metaboliten in der Pathogenabwehr wirksam sind und angereichert werden aufgrund des Fehlens von Camalexin und den Indolglucosinolaten. Dennoch musste bei den Resultaten der *cyp79B2xcyp79B3* beachtet werden, dass die verwendete Kreuzungslinie aus T-DNA-Insertionslinien des Ökotyps Wassilewskija (WS) erzeugt wurde und daher spezifische Einflüsse durch diesen genetischen Hintergrund vermittelt sein mögen, wie es bereits für *Ler-0* beobachtet werden konnte.

3 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erfolgreich ein System zur schnellen und gezielte Analyse des Schwefelmetaboloms von Pflanzen etabliert. Die spezifische Erkennung der Schwefelmetaboliten basiert auf der stabilen Isotopenmarkierung von Pflanzen und der Anwendung hochauflösender Massenspektrometrie. Schwefel als solcher nimmt in Pflanzen etwa 0,1-1 % der Trockenmasse ein, in Brassicaceaeen aufgrund des hohen Gehalts an Glucosinolaten sogar bis zu bis 10 %. Durch die Cysteinautotrophie von Pflanzen hat der Schwefelmetabolismus hier eine besondere Bedeutung, vor allem als Lieferant der Aminosäuren Cystein und Methionin für heterotrophe Organismen. Bislang wurden umfassende und aufklärende Analysen des Schwefelmetaboloms, wie sie in dieser Arbeit vorgestellt wurden, lediglich für pflanzliche Organismen durchgeführt.

Zur Annotation bekannter Schwefelmetaboliten wurde in dieser Arbeit mit Hilfe von *open-source*-Datenbanken eine Biomarkerliste der bekannten Schwefelmetaboliten erstellt, welche rund 360 nicht-isomere Schwefelmetaboliten umfasst. Dabei konnten in Keimlingen des *Arabidopsis* Wildtyps Columbia etwa 20 % der gefundenen Schwefelmassen bekannten Schwefelmetaboliten zugeordnet werden. Insgesamt wurden knapp 200 Schwefelmetaboliten detektiert und charakterisiert von denen 80 % als nicht bekannte Schwefelverbindungen annotiert wurden. Basierend auf dieser Isotopen-gestützten Analyse konnten rund 1,2 % aller simultan detektierbaren Massen eines Rohextraktes als singuläre, schwefelhaltige Massensignale identifiziert werden. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass große Teile des tatsächlichen Schwefelmetaboloms in *Arabidopsis* bislang nicht beschrieben sind.

Neben der massenspektrometrischen Momentaufnahme des pflanzlichen Schwefelmetaboloms, ermöglicht die etablierte Methode den Vergleich unterschiedlicher Pflanzen- und Zelllinien zur Ermittlung der genetischen Variabilität des Schwefelmetaboloms und des Einflusses einzelner Gene auf den endogenen Schwefelmetabolismus. In diesem Kontext wurden 22 Pflanzenlinien von *Arabidopsis*, welche beschriebene Defekte oder Modifikationen im Schwefel-metabolismus aufweisen, bezüglich Veränderungen ihres Schwefel-

metaboloms im Vergleich zum Wildtyp Col-0 untersucht und charakterisiert. Hierbei wurden 60 Schwefelmassen gefunden, welche in den einzelnen Pflanzenlinien eine spezifisch veränderte Abundanz gegenüber dem Wildtyp zeigten.

3.1 ICR-FT/MS für metabolische Studien

Die Herausforderung bei ungerichteten Metabolomanalysen liegt nicht allein bei der Aufzeichnung der Daten und der zugrundeliegenden Methode, sondern auch bei der Selektion der biologisch relevanten Informationen und deren Charakterisierung. Die bioinformatische und statistische Auswertung massenspektrometrischer Daten ist einer der zeitaufwändigsten Prozesse von Metabolomstudien unabhängig von der Quelle der Daten (Goodacre 2005). Die Auswertung der Daten wird insbesondere durch Parameter wie akkurate Masseninformationen und Isotopenmarkierung erleichtert, welche auch im Rahmen dieser Arbeit angewendet wurden. In vielen Metabolomstudien ist die *online*-MS-Analyse, gekoppelt an eine Separationsmethode wie LC, GC oder CE, die Methode der Wahl. Durch die Auftrennung wird eine Ausdünnung der Matrix erreicht und dadurch die Gefahr der Ionensuppression oder Überladung der Messzelle minimiert, welche in Analysen mit direkter Injektion (DI) häufig auftreten können (Ohta *et al.*, 2010). Allerdings erhöht die Trennung in der Regel die Analysezeit und birgt eine Selektivität der analysierten Metaboliten basierend auf der Trennungsmethode. Die charakteristischen Eigenschaften der ICR-FT/MS sind hohe Sensitivität, Massenpräzision und Auflösung. Um diese Charakteristika der Methode optimal ausnutzen zu können werden ICR-FT/MS-Analysen häufig mittels direkter Injektion der Proben ohne gekoppelte chromatographische Trennung durchgeführt (Dunn *et al.*, 2013). Hierbei ist eine Akkumulation der Ionen in der Messzelle möglich und deren simultane Detektion. Im Rahmen dieser Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass die Anzahl der akkumulierten Gesamtspektren eng mit der Summe von reproduzierbar detektierbaren Ionen und deren Massenpräzision verknüpft ist. Durch den vorgegebenen Fluss einer separativen Methode kann eine entsprechende Akkumulation der Spektren in *online*-MS-Analysen nicht erfolgen. In dieser Arbeit und weiteren Studien wurde gezeigt, dass mittels DI-ICR-FT/MS bis zu 12.000 Massensignalen reproduzierbar in pflanzlichen

Rohextrakten detektieren werden können (Aharoni *et al.*, 2002; Gläser *et al.*, 2014). Demzufolge ist die ICR-FT/MS-Analyse eine Methode, die für effiziente Analysen mit hohem Durchsatz geeignet ist. Dies birgt großes Potential für die Analyse von Biodiversität und deren Charakterisierung auf metabolischer Ebene (Hall 2006). Die ICR-FT/MS bietet eine gute Grundlage zur putativen Annotation von elementaren Kompositionen zu den detektierten Ionen (Hall 2006; Kind und Fiehn 2007; Okazaki und Saito 2012). Die Massenpräzision ist unmittelbar mit der Anzahl annotierbarer Summenformeln verknüpft. So liegt die Annotationsleistung für Daten aus DI-ICR-FT/MS-Analysen bei etwa 0,1 ppm, dem gegenüber können Daten aus LC-MS-Analysen in der Regel lediglich mit 1-3 ppm annotiert werden, wobei die Anzahl passender Summenformeln ungleich höher ist (Kind und Fiehn 2007, Kind und Fiehn 2010). Im Rahmen dieser Arbeit konnten im Kontext mit genetischen Varianten im Schwefelmetabolismus etwa 60 neue Schwefelverbindungen in *Arabidopsis* charakterisiert werden. Es wurde gezeigt, dass mit der hier angewendeten Methode in der Regel in über 85 % der Fälle die Annotation einer einzelnen Summenformel möglich war. Dies konnte einerseits durch die Massenpräzision und andererseits durch die eindeutige Bestimmung der Anzahl von Schwefelatomen in der Verbindung, welche durch die Markierung mit stabilen Isotopen gewährleistet wurde, erreicht werden. Diese Arbeit und weitere Studien konnten zeigen, dass die Markierung mit stabilen Isotopen maßgeblich zur erfolgreichen Annotation von Summenformeln beiträgt (Giavalisco *et al.*, 2009; Giavalisco *et al.*, 2011; Hsieh *et al.*, 2012; Nakabayashi *et al.*, 2013b). Die Markierung mit Isotopen stützt neben der Metabolitidentität auch die Selektion der Daten biologischer Herkunft (Okazaki und Saito 2012). In Verbindung mit Isotopenmarkierung zeigt die chromatographische Trennung allerdings einen erheblichen Vorteil in der Datenauswertung und Annotation, da hier die Isotopologen innerhalb einer Fraktion koeluieren. Die Anzahl der Atome des isotopen Elements kann in den fraktionierten Spektren unmittelbar durch die Massenverschiebung abgeleitet werden (Giavalisco *et al.*, 2011; Nakabayashi *et al.*, 2013b). Hier ist muss keine nachträgliche Zuordnung der Isotopologen innerhalb des Gesamtspektrums erfolgen, wie es in dieser Arbeit der Fall war. Außerdem sind trennende Methoden gegenüber der DI-ICR-FT/MS-Analyse in der Lage isomere Strukturen zu unterscheiden und erlauben die absolute

Quantifizierung der Metaboliten (Hall 2006). Die mittels ICR-FT/MS generierten Spektren ermöglichen hier lediglich eine relative Quantifizierung, welche erheblich von der Vergleichbarkeit der analysierten Proben abhängig ist (Fiehn 2002). Allerdings gibt es bislang keine Studien, welche einen direkten Vergleich der Methoden, wie beispielsweise LC-MS und DI-MS, zur Charakterisierung ihres Potentials und der Resultate geführt haben.

Im Kontext mit den hier erhobenen Daten wird deutlich, dass hohe Auflösung und Massenpräzision unverzichtbar für die zuverlässige Annotation elementarer Kompositionen zu unbekannt Massen sind (Okazaki und Saito 2012). Trotz des großen analytischen Potentials der ICR-FT/MS ist die Identifikation der Metaboliten limitiert auf die Ableitung der molekularen Komposition aus den akkuraten Masseninformationen. Die eindeutige Identifikation einer Substanz ist stets an einen analytischen Standard und ergänzende Analysen zu Struktur und Retentionszeit geknüpft (Sumner *et al.*, 2007). Weiterhin kann in DI-ICR-FT/MS-Analysen die Unterscheidbarkeit von isomeren Strukturen nicht gewährleistet werden, welche beispielweise unter den Glucosinolaten häufig gefunden werden. Eine fraktionierende Trennung der Rohextrakte bietet demnach Potential den Informationsgehalt der massenspektrometrischen Daten zu erhöhen. Um nicht auf die Stärken der ICR-FT/MS-Analyse zu verzichten sind die einzelnen Fraktionen jeweils getrennt zu analysieren, wodurch die Analysezeit je Probe vervielfacht wird. So ist die Frage, ob der Informationsgewinn einer solchen Analyse im Verhältnis zum korrespondierenden Mehraufwand steht. Weiterhin können Netzwerkstudien zur weiteren Charakterisierung nicht identifizierter Metaboliten dienen. Im Kontext annotierter Metaboliten und in Verknüpfung mit Expressionsdaten können so Verbindungen zwischen den detektierten Metaboliten und den übergeordneten, biochemischen Reaktionen hergestellt werden (Nikiforova *et al.*, 2003; Nikiforova *et al.*, 2005a; Hirai *et al.*, 2007; Müller *et al.*, 2013). So kann durch die Einbindung in ein metabolisches Netzwerk die Identifikation von Kandidatenmassen zusätzlich unterstützt werden.

3.2 Biodiversität und Genfunktionen im Schwefelmetabolismus

Stoffwechselwege können erst tatsächlich verstanden werden, wenn die biochemischen Reaktionen und deren Verknüpfung aufgeklärt sind (Nikiforova

et al., 2004; Quanbeck *et al.*, 2012). So sind metabolische Analysen das Handwerkszeug zur funktionalen Charakterisierung von Genen geworden. Eine Vielzahl von Studien hat bewiesen, dass Genfunktionen eng mit spezifischen, metabolischen Veränderungen verknüpft sind. Aufgrund der hohen Komplexität ungerichteter Metabolomanalysen und der schwierigen damit einhergehenden Selektion und Annotation der Kandidatenmassen, werden die Methoden vorwiegend in gerichteten *fingerprint*- und *profiling*-Analysen angewendet (Okazaki und Saito 2012). Beispielsweise wurde Metabolit *profiling* zur Charakterisierung und Annotation mutagenisierter Linien eingesetzt. Hierbei wurden phänotypisch selektierte Linien, welche Defekte im Stärkemetabolismus aufwiesen, mit beschriebenen Mutanten des Stoffwechselweges verglichen und statistisch klassifiziert. Durch Korrelation der Profile konnten zwei der untersuchten mutagenisierten Linien bereits bekannten *Loci* zugeordnet werden und gezielt der Ort der Mutation identifiziert werden (Messerli *et al.*, 2007). Durch diesen Ansatz können mitunter zeitraubende genetische Kartierungen der mutagenisierten *Loci* übergangen werden. Das verwendete Metabolitprofil dieser Methode erfordert nicht unbedingt Kenntnis des Stoffwechselweges und der involvierten Metaboliten, dennoch erleichtert die Selektion spezifischer Metaboliten eine gezielte Extraktion und die anschließende Annotation der Genfunktion. Die *de novo* Charakterisierung von Genen ist umso mehr abhängig von der Kenntnis der Metaboliten, welche in genetisch unterschiedlichen Linien mit veränderter Abundanz gefunden werden. Die Charakterisierung einer neuen 3-O-Glucosyl-transferase, welche in Koexpressionsstudien von Genen der Flavonoidsynthese identifiziert wurde, gelang durch die Analyse des Profils von Flavonoiden und deren Vorstufen und Derivaten (Yonekura-Sakakibara *et al.*, 2008). Eine T-DNA-Insertionslinie der putativen Glucosyltransferase zeigte eine verringerte Akkumulation von Flavonol-Pentosid-Konjugaten. Anhand von *in vitro* Versuchen konnte gezeigt werden, dass die betreffende Glucosyltransferase spezifisch für Flavonol-aglycone war und ausschließlich Arabinose als Substrat verwendete (Yonekura-Sakakibara *et al.*, 2008). Umgekehrt ist die genetische Variation mitunter der Schlüssel zu Identifikation unbekannter Metaboliten. Es wurde postuliert, dass die meisten nicht annotierten Metaboliten eines Systems nur Unbekannte innerhalb des Systems sind, aber keine unbekannt Strukturen als solche

darstellen (Little *et al.*, 2012). Basierend auf umfassenden Informationen zu den physikochemischen Eigenschaften eines unbekanntes Metaboliten sollen so anhand chemischer Datenbanken Verbindungen annotiert werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, wie die Annotation unbekannter Schwefelverbindungen, welche eine charakteristische Akkumulation oder Reduktion für eine genetische Variation zeigen gelingen kann. Die γ -Glutamyltransferase GGT4 ist bekannt für ihre Funktion im Abbau von Glutathionkonjugaten. Es wurde beschrieben, dass GGT4 verantwortlich für den initialen Schritt der vakuolären Degradation der Konjugate durch Abspaltung des γ -Glutamylrests ist (Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2007b). Bereits in früheren Studien wurden Mutanten von GGT4 verwendet um Glutathionkonjugate und deren Metabolismus zu untersuchen (Blum *et al.*, 2010; Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2011). Dadurch konnte OPDA als Substrat der Konjugation an Glutathion und der Transport des Konjugats in die Vakuole identifiziert werden (Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2011). Die Kenntnis von endogenen Glutathionkonjugaten und deren Funktion ist gering (siehe 1.1.3.1). Für OPDA wurde postuliert, dass die Konjugation der Entgiftung überschüssigen OPDAs dient. Ähnliches wird für die reaktiven Produkte der Fettsäureoxidation angenommen (Cummins *et al.*, 2003; Mueller *et al.*, 2008). Diese Arbeit zeigte anhand ungerichteter, metabolischer Analysen des Schwefelmetaboloms die spezifische Akkumulation von sieben Kandidaten für endogene Glutathionkonjugate in *ggt4* (Gläser *et al.*, 2014) (Abbildung 2.32). Die jeweils korrespondierenden Massen der Cysteinylkonjugate als deren Abbauprodukt konnten dem gegenüber im Wildtyp gefunden werden. Die weitere Charakterisierung der Kandidatenmassen ergab, dass zwei der Verbindungen nachweislich eine γ -Glutamylgruppe enthielten. Ein Kandidat konnte mittels Fragmentierungsanalysen als Glutathionkonjugat einer $C_6H_{11}O_4$ -Gruppe identifiziert werden. Diese Daten stimmten mit dem für Wirbeltiere beschriebenen Dicarboxyethylglutathion überein, welches durch Konjugation von Malat gebildet wird (Tsuboi *et al.*, 1990). Es ist bekannt, dass Dicarboxyethylglutathion eine Rolle in der Blutgerinnung spielt und in die Aggregation der Blutplättchen involviert ist (Tsuboi *et al.*, 1993). Es ist möglich, dass Dicarboxyethylglutathion als Intermediat der Detoxifizierung reaktiver Aldehyde

gebildet wird, welche bei der Oxidation von Fettsäuren entstehen (Singh *et al.*, 2006).

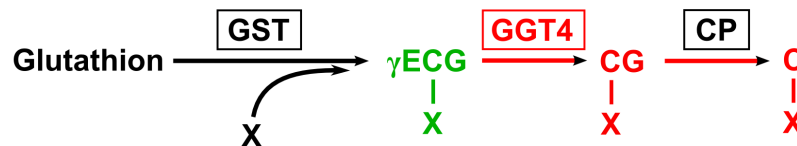


Abbildung 3.1 Einfluss des Funktionsverlusts von GGT4 auf den Abbau von Glutathionkonjugaten

Die γ -Glutamyltransferase 4 (GGT4) ist eine Kernkomponente des Abbaus von Glutathionkonjugaten in der Vakuole. Die Konjugation einer Substanz X an Glutathion wird in vielen Fällen, wie beispielsweise für Herbizide durch Glutathiontransferasen (GST) vermittelt. Reduzierte Prozesse oder Metaboliten werden im Flussdiagramm rot dargestellt, Anreicherung grün. Der Funktionsverlust von GGT4 hat eine Hemmung der Degradation von Glutathionkonjugaten (γ ECG-X) zur Folge, welche dadurch akkumuliert werden. Das Cysteinylglycinylnkonjugat (CG-X) als Produkt der GGT4-Aktivität und das Cysteinkonjugat (C-X) als sequenzielles Abbauprodukt von CG-X durch vakuoläre Carboxypeptidasen (CP) werden nicht mehr gefunden.

Aldehyde, wie auch Zucker in ihrer Aldoseform, sind in tierischen und pflanzlichen Systemen bekannt für ihre Fähigkeit an Glutathion zu konjugieren. In dieser Funktion agiert Glutathion auch im Glyoxylatzyklus (Sousa Silva *et al.*, 2013; Stewart *et al.*, 2013). Die abgeleiteten, chemischen Zusammensetzungen der konjugierten Gruppen der putativen Glutathionkonjugate stimmen vorwiegend mit kurzkettigen Carbonsäuren, wie Malat überein. Ein weiterer Kandidat mit der konjugierten Gruppe $C_6H_{11}O_5$ korreliert mit dem Konjugat eines Glucosylrests. Diese Daten deuten darauf hin, dass die gefundenen Glutathionkonjugate in Verbindung mit der Entgiftung redoxreaktiver Substanzen des Zucker- und Fettsäuremetabolismus stehen. Der Abbau zu Cysteinylkonjugaten ist außerdem ein Hinweis dafür, dass die gefundenen, putativen Glutathionkonjugate nicht zu Transportzwecken an Glutathion gebunden wurden, sondern zur vakuolären Degradation. GGT4 hat eine endständige Funktion im Metabolismus von Glutathionkonjugaten. Aufgrund der hohen Substratspezifität von GGT4 konnte hier eine Hypothese für die unbekanntem Schwefelmetaboliten formuliert werden (Abbildung 3.1). So konnten die Kandidaten zielgerichtet auf eine Identität als Glutathionkonjugat untersucht werden. Allerdings ermöglicht die Analyse von *ggt4* lediglich die Identifikation von Glutathionkonjugaten, welche auch ein Substrat der vakuolären Degradation sind. Schwieriger ist die Charakterisierung von unbekanntem Metaboliten deren Substrate und Produkte nicht akkumulieren.

Dadurch ist häufig eine relative Verknüpfung, wie sie für *ggt4* mit GSH- und Cysteinylkonjugat zu finden war nicht möglich. In solchen Fällen bleiben die bekannte Funktion des untersuchten Gens sowie seine beschriebenen Substrate und Produkte die einzigen Anhaltspunkte zur Charakterisierung unbekannter Verbindungen.

Trotz der guten Aufklärung des Schwefelmetabolismus konnten im Rahmen dieser Arbeit durch Analysen des Schwefelmetaboloms einzelner Mutanten spezifisch veränderte Metaboliten gefunden werden, welche zur Formulierung von vier Hypothesen bezüglich der Verteilung und Umsetzung des assimilierten Schwefels führten (Abbildung 2.17).

- Reduzierte Schwefelassimilation führt zu geringerer Bereitstellung von PAPS für Sulfatierungsreaktionen (siehe 3.2.1)
- Geringe PAPS-Verfügbarkeit kann zu einer Desulfatierung von Sulfo-Verbindungen führen (siehe 3.2.2)
- APK1 hat eine spezifische Funktion (siehe 3.2.3)
- In *Arabidopsis* gibt es nicht charakterisierte Glucosinolate und Phytoalexine (siehe 3.2.4)

3.2.1 Reduzierte Schwefelassimilation führt zu geringerer Bereitstellung von PAPS für Sulfatierungsreaktionen

Schwefelmangel bewirkt in Pflanzen eine Beeinträchtigung des Wachstums und der Vitalität. Dies hat vor allem Bedeutung für die Anzucht von Nutzpflanzen deren Qualität und Ertrag in Folge von Schwefelmangel gemindert wird (Blake-Kalff *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 1999). Durch adaptive Mechanismen versucht die Pflanze den Nährstoffmangel durch Umverteilung zu kompensieren und die Aufrechterhaltung des zentralen Metabolismus sicher zu stellen (Mugford *et al.*, 2011). Es wurde gezeigt, dass Schwefelmangel eine erhöhte Expression der Gene der primären Schwefelassimilation induziert, insbesondere für APR. Demgegenüber wurde für APKs eine verringerte Genaktivität gefunden (Takahashi *et al.*, 1997). Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass die Synthese von Glucosinolaten zur Einsparung von Schwefel reduziert wird (Hirai und Saito 2004a; Maruyama-Nakashita *et al.*, 2003). Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigten ähnliche Ergebnisse. Es konnte für den Funktionsverlust von ATPS1 eine reduzierte Abundanz einiger Glucosinolate

gefunden werden, die als Folge von verringerter reduktiver Sulfatassimilation gedeutet wurden (Abbildung 3.2).

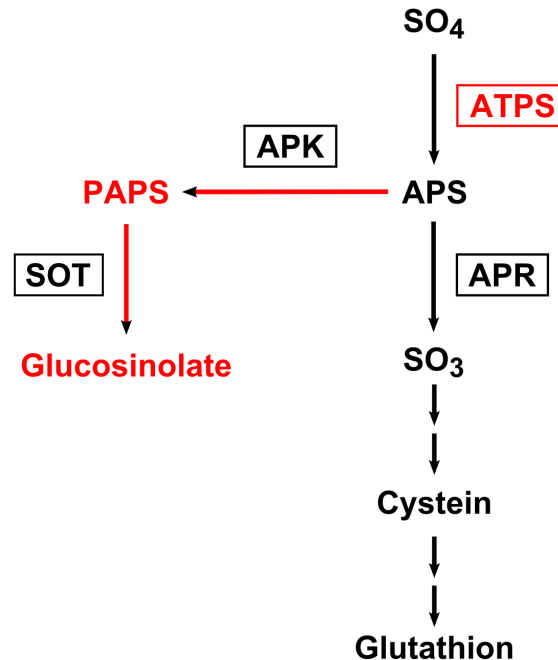


Abbildung 3.2 Veränderter Schwefelstofffluss durch Funktionsverlust von ATPS1

Bei fehlender Aktivität der ATP-Sulfurylase 1 (ATPS1) wurden reduzierte Gehalte von Glucosinolaten beobachtet, während die reduktive Sulfatassimilation mit der Bildung von Cystein und Glutathion unbeeinträchtigt blieb. Im Flusschema werden die beeinträchtigten Komponenten und Reaktionen rot hervorgehoben. Durch die Beeinträchtigung der Sulfatassimilation durch ATPS steht weniger APS zur Verfügung. So wird der Fluss von APS vorwiegend in die Aufrechterhaltung des zentralen Schwefelstoffwechsels geleitet durch weitere Reduktion des Schwefels mittels APS-Reduktase (APR) über Sulfit zu Cystein und Glutathion. Dadurch kann weniger APS durch die APS-Kinase (APK) zu PAPS umgesetzt werden, welches zur Sulfatierung von Metaboliten des spezialisierten Schwefelstoffwechsels durch Sulfotransferasen (SOT) dient, wie den Glucosinolaten.

Es liegen keine Veränderungen des Glutathiongehalts vor und daher wurde angenommen, dass keine Beeinträchtigung des zentralen Schwefelstoffwechsels vorliegt. Dies würde für eine verringerte PAPS-Synthese in Folge geringerer Sulfatverfügbarkeit sprechen und die dadurch induzierte Abnahme sulfatierter Metaboliten zugunsten der Aufrechterhaltung des zentralen, reduktiven Schwefelstoffwechsels. Dem entgegen steht, dass gezeigt wurde das ATPS1 eng mit der Glucosinolatbiosynthese verknüpft ist und daher der Funktionsverlust einen direkten, hemmenden Effekt auf die Biosynthese von Glucosinolaten als solche haben könnte (Yatusevich *et al.*, 2010). ATPS1 ist vor allem assoziiert mit aliphatischen Glucosinolaten. Die in den Daten gefundene veränderte Abundanz ist aber nicht allein auf aliphatische Glucosinolate

beschränkt und konnte auch für Indolglucosinolate gefunden werden. Daher wird angenommen, dass es sich tatsächlich um ein Resultat verminderter Sulfatassimilation handeln kann. Im Rahmen der Schwefelmetabolomanalysen wurde allerdings häufig eine hohe Variabilität der Glucosinolate beobachtet, die nicht immer charakteristisch oder reproduzierbar war. So kann auch die Induktion des Myrosinase-assoziierten Abbaus einzelner Glucosinolate, durch Beschädigung der Keimlinge bei der Ernte, eine Ursache für veränderte Glucosinolatgehalte sein (Andreasson *et al.*, 1999; Pontoppidan *et al.*, 2005, Pontoppidan *et al.*, 2003). Für diesen Fall wäre allerdings zu erwarten, dass Wildtyp und Mutanten in gleichem Maße betroffen wären.

3.2.2 Geringe PAPS-Verfügbarkeit kann zu einer Desulfatierung von Sulfo-Verbindungen führen

Es ist bekannt, dass wichtige metabolische Bausteine wie Stickstoff oder Schwefel remobilisiert und innerhalb der Pflanze neu verteilt werden, wie beispielsweise bei Seneszenz (Hawkesford und Kok 2006). So wurde bereits postuliert das Glucosinolate eine Quelle von remobilisierbarem Schwefel bei Schwefelmangel sein können (Schnug und Haneklaus 1993). Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei der Analyse von PAPS-defizienten Mutanten eine Schwefelmasse gefunden, welche mit der desulfatierten Form eines Hydroxyindolglucosinolats übereinstimmt. In der beschriebenen Biosynthese von Glucosinolaten werden Alkyl-, Benzyl- und Indolmethyldesulfoglucosinolate als Vorstufen gebildet, welche erst nach der Sulfatierung mittels PAPS, durch anschließende Seitenkettenmodifikation Alkenyl-, Hydroxyalkyl- und S-Oxi-Glucosinolate bilden (Abbildung 2.18) (Sønderby *et al.*, 2010). Demnach sollte ein Hydroxyindoldesulfoglucosinolat keine akkumulierte Vorstufe sondern eher ein Produkt einer Desulfatierung sein. PAPS erfüllt in der Pflanze wichtige Funktionen im Kontext der Regulation von Glucosinolaten und Hormonen, wie Jasmonsäure und Brassinosteroid. Jasmonsäure und Brassinosteroid sind nicht nur in die Regulation des Wachstums und der Entwicklung der Pflanze involviert, sondern spielen auch eine Rolle bei Stress und Pathogenresistenz. Hierbei werden die beiden Phytohormone durch Sulfatierung inaktiviert (Matsubayashi und Sakagami 1996; Gidda *et al.*, 2003; Amano *et al.*, 2007; Marsolais *et al.*, 2007). So besteht die Möglichkeit, dass selektiv eine

DISKUSSION

Umverteilung der Sulfatierung durch Remobilisierung von PAPS stattfinden kann, da Glucosinolate beispielweise neben der akuten Pathogenabwehr keine bekannte stationäre Funktion in der Pflanze erfüllen. Zur Remobilisierung wäre eine Abspaltung des Sulfits erforderlich, welches durch die an einen Elektronenakzeptor gebundene Aktivität der APR an ein Adenosin-Bisphosphat zur Bereitstellung von PAPS gebunden werden könnte. Bei dieser Reaktion liegt das Gleichgewicht allerdings stark auf der Seite der Substrate Sulfit und Adenosin-Bisphosphat (Berendt *et al.*, 1995) (Abbildung 3.3). Alternativ kann das Sulfit auch in die zentrale Metabolisierung zu Cystein geleitet werden (Abbildung 3.4).

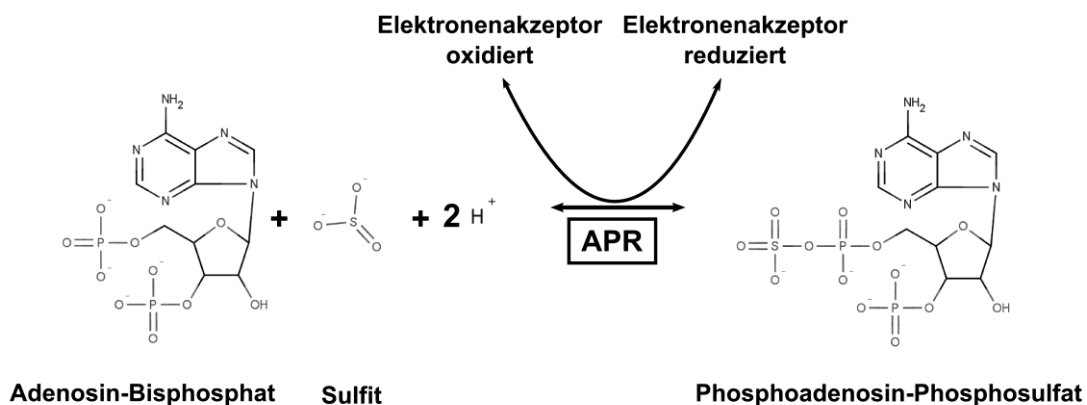


Abbildung 3.3 Hypothetische Remobilisierung von PAPS durch APR-Aktivität

Die APS-Reduktase (APR) kann in Abhängigkeit von einem Elektronenakzeptor reversibel die Freisetzung und Übertragung eines Sulfits an einem Phosphatrest katalysieren. Durch diese Reaktion besteht die Möglichkeit PAPS aus einem Adenosin-Bisphosphat und Sulfit zu regenerieren. Da PAPS eine aktivierte Substanz zur Übertragung eines Sulfatrests ist, liegt allerdings das Gleichgewicht stark auf der Seite des Sulfits. Die Hauptreaktion der APR ist in der reduktiven Schwefelassimilation die Bildung von Sulfit durch Reduktion von APS.

Außerdem besteht die Möglichkeit der Remobilisierung von Sulfat durch Hydrolyse, auch katalysiert durch Sulfatasen. Das hier freigesetzte Sulfat kann schließlich wieder in den Weg der reduktiven Schwefelassimilation eintreten, allerdings kann so kaum die mangelnde PAPS-Synthese durch die fehlende Aktivität von APKs kompensiert werden. Derartige Reaktionen sind bislang nicht beschrieben worden. Bereits früher wurde aber eine Remobilisierung von Schwefel aus Glucosinolaten postuliert, allerdings durch die Aktivität von Thioglucosidasen und Myrosinase-assoziierten *Loci*, welche bei Schwefelmangel eine erhöhte Genaktivität zeigen (Hirai *et al.*, 2003). Üblicherweise wird

bei Schwefelmangel des zentralen Metabolismus zunächst lösliches Sulfat aus der Vakuole sowie aus Glutathion mobilisiert (Blake-Kalff *et al.*, 1998). Die Remobilisierung von Schwefel aus Proteinen ist vor allem in Kontext mit Seneszenz beschrieben (Hawkesford und Kok 2006).

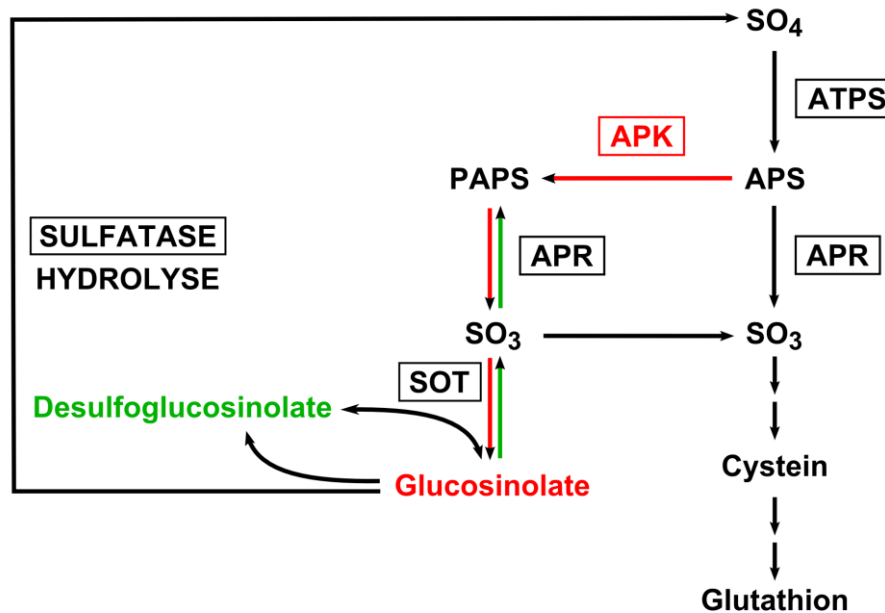


Abbildung 3.4 Desulfatierung von Glucosinolaten bei reduzierter PAPS-Verfügbarkeit

Bei geringer Aktivität der APS-Kinasen (APK) wurde das Fehlen vor allem von Glucosinolaten und anderen sulfatierten Metaboliten beobachtet. Da die Sulfatierung beispielsweise in der Regulation von Jasmonsäure und Brassinosteroiden eine regulatorische Rolle erfüllt wird erwartet das Mechanismen zur Aufrechterhaltung der PAPS-Verfügbarkeit etabliert sind. Das Flussschema zeigt Möglichkeiten der Remobilisierung von Sulfat und PAPS, wobei reduzierte Reaktionen und Produkte mit rot und erhöhter Fluss und Akkumulation mit grün hervorgehoben sind. Die Bereitstellung von PAPS erfolgt in Pflanzen allein durch die Aktivität der APKs. Bei geringer PAPS-Verfügbarkeit erfolgt eine reduzierte Sulfatierung von Metaboliten durch Sulfotransferasen (SOT) und es kommt zu einer Anreicherung unsulfatierter Vorstufen, wie den Desulfoglucosinolaten. Außerdem können sulfatierte Verbindungen durch die Freisetzung von Sulfat oder Sulfits desulfatiert werden. Sulfat kann erneut in die reduktive Schwefelassimilation eintreten und durch ATP-Sulfurylasen (ATPS) zu APS umgesetzt werden. Durch die geringe APK-Aktivität können allerdings nur geringe Anteile von APS zu PAPS umgesetzt werden. Alternativ kann Sulfit mit Adenosin-Bisphosphat erneut zu PAPS umgesetzt werden, wobei allerdings das Reaktionsgleichgewicht auf der Seite des Sulfits liegt.

PAPS ist allerdings ein spezifisches Substrat des spezialisierten Metabolismus und mag eigenen Kontrollmechanismen unterliegen. Beispielsweise ist die Regulation der Glucosinolatbiosynthese eng verknüpft mit der Sulfatassimilation durch ATPS1 (Yatusevich *et al.*, 2010). Bei PAPS-Defizienz konnte daher eine erhöhte Aktivität von ATPS beobachtet werden, wodurch eine erhöhte Akkumulation reduzierter Schwefelverbindungen erfolgte (Mugford *et al.*, 2011). Es wurde außerdem gezeigt das Pflanzen ohne PAPS nicht lebensfähig sind (Mugford *et al.*, 2010). So ist PAPS für die Pflanze hinreichend von Bedeutung,

dass Mechanismen der Mobilisierung und Remobilisierung etabliert sein können.

3.2.3 APK1 hat eine spezifische Funktion

Die Enzyme des zentralen Schwefelmetabolismus in *Arabidopsis* liegen alle in multigenen Familien mit drei bis vier Vertretern vor, mit Ausnahme von der Sulfitreduktase und der Sulfidoxidase (Leustek *et al.*, 2000; Kopriva 2006) (Abbildung 1.2). Eine funktionale Redundanz innerhalb der Enzymfamilien gewährleistet eine Aufrechterhaltung essentieller Stoffwechselwege beim Funktionsverlust einzelner Isoformen (Mugford *et al.*, 2011). Dennoch ist anzunehmen, dass einzelne Vertreter spezifische Funktionen haben. Die Familie der APKs umfasst vier Enzyme, welche eine Übereinstimmung in ihren Aminosäuresequenzen von 62-72 % zeigen. Drei der Isoformen sind im Chloroplastenstroma lokalisiert und eine im Cytosol. Expressionsstudien konnten zeigen, dass jede dieser Isoformen außerdem ein charakteristisches Expressionsmuster aufweist. So ist die Expression von APK2 beispielsweise gegenüber den anderen Isoformen in der Wurzelspitze auf deren Zentrum beschränkt und in Pollen sowie Epidermis- und Schließzellen nicht vorhanden. Pflanzen, welche ausschließlich APK2 exprimieren, konnten nicht generiert werden. Es wurde postuliert, dass aufgrund der fehlenden Expression in Pollen APK2 alleine keine lebensfähigen Pflanzen hervorbringen kann (Mugford *et al.*, 2009). APK1 wurde bislang als die APK mit der Hauptaktivität beschrieben, da APK1 alleine in der Lage ist die fehlende Aktivität der übrigen Isoformen metabolisch zu kompensieren (Mugford *et al.*, 2010). Im Rahmen dieser Arbeit konnten allerdings Schwefelmetaboliten erfasst werden, die in Abhängigkeit von APK1-Aktivität gegenüber dem Wildtyp in der Abundanz variierten. Diese Metaboliten konnten nicht, wie die Desulfoglucosinolate als direktes Ziel einer Sulfatierung identifiziert werden, da keine korrespondierenden Desulfo-Massen im Wildtypspektrum gefunden werden konnten. Basierend auf der bekannten Funktion von APK1 wurde angenommen, dass diese Schwefelmetaboliten entweder ein Substrat für APK1 oder ein Ziel der Sulfatierung sind. Wie für die meisten Enzyme zutreffend, sind die Bindedomänen für ein Substrat fähig auch dem Hauptsubstrat ähnliche Strukturen zu binden. So können APKs mutmaßlich nicht ausschließlich APS binden sondern auch analoge

Verbindungen, welche die strukturellen Kriterien für die Interaktion mit den Bindestellen des Enzyms erfüllen. Allerdings ist es wahrscheinlich, dass aufgrund von hinreichender Spezifität und einer üblicherweise hohen PAPS-Verfügbarkeit putative, andere Substrate nicht ins Gewicht fallen. Bislang wurden derartige Analoga zu PAPS nicht beschrieben. Durch die fehlende APK Aktivität können PAPS sowie andere putative Substrate nicht umgesetzt werden und akkumulieren. Alle der APK1-spezifisch akkumulierten Massen könnten, basierend auf ihrer Summenformel, geeignete Substrate zur Sulfatierung darstellen. Zwei der betreffenden Substanzen könnten sogar eine Sulfophospho-Gruppe enthalten wie sie in APS vorliegt. Bereits in Mugford *et al.* (2009 und 2010) wurde eine putative, eigenständige Rolle von APK1 angenommen. Hier wurde postuliert das APK1 möglicherweise in der Lage sei einen spezifischen Pool von PAPS bereit zu stellen, welcher selektiv für die Sulfatierung spezifischer Substanzen zur Verfügung steht, wie beispielweise Jasmonsäure. Allerdings wurden die korrespondierenden, sulfatierten Metaboliten in dieser Arbeit nicht detektiert. So muss davon ausgegangen werden, dass diese sulfatierten Metaboliten nicht akkumulieren und nur ein intermediäres Produkt darstellen. Bislang ist wenig über die Verteilung von PAPS innerhalb der Zelle bekannt. Die Speicher von PAPS, welche durch die plastidären und cytosolische APK generiert werden können durch Transporter zwischen den Kompartimenten ausgetauscht werden (Mugford *et al.*, 2009; Mugford *et al.*, 2010; Gigolashvili *et al.*, 2012). Charakteristische Funktionen der verschiedenen PAPS-Speicher konnten bislang nicht beobachtet werden. Außerdem bleibt die Funktion von PAPS im Plastiden ungeklärt, da dort keine bekannten PAPS-konsumierenden Enzyme aktiv sind (Klein und Papenbrock 2004; Kopriva *et al.*, 2012). Die Unterschiede, welche Mugford *et al.* (2009 und 2010) im Kontext mit der Sulfatierung von Jasmonsäure dargestellt haben lagen im Rahmen einer Änderung um etwa 10 % und konnten in den Daten dieser Arbeit nicht gefunden werden. Gleiches gilt für die veränderten Gehalte von Cystein und GSH (Mugford *et al.*, 2011). Die Daten von Mugford *et al.* (2009, 2010 und 2011) wurden durch Analyse von fünf Wochen alten Pflanzen generiert. So ist die Vergleichbarkeit mit den Daten dieser Arbeit möglicherweise nicht gegeben. In dieser Arbeit wurden zwei Wochen alte Keimlinge verwendet, welche sich noch in frühen Phasen der Entwicklung und

des Wachstums befinden. Es ist beschrieben, dass die Schwefelassimilation durch ATPS in jungen Geweben deutlich höher ist als in alten (Rotte und Leustek 2000). Es ist möglich, dass die von Mugford *et al.* (2009, 2010 und 2011) beobachteten Unterschiede in jüngeren Geweben durch den hohen Fluss in der Schwefelassimilation nicht determiniert werden können. Wenngleich die Daten des Jasmonsäuremetabolismus und die Abundanz von GSH in dieser Arbeit nicht mit den Daten von Mugford *et al.* (2009, 2010 und 2011) übereinstimmen, fördern dennoch beide Studien die gleiche Hypothese der Alleinstellung von APK1 und der potentiellen spezifischen Funktion in Bezug auf die Verteilung von PAPS innerhalb der Zelle.

3.2.4 In *Arabidopsis* gibt es nicht charakterisierte Glucosinolate und Phytoalexine

Aktuell sind 132 Strukturen natürlich vorkommender Glucosinolate in Pflanzen beschrieben und wenigsten 14 weitere postuliert (Fahey *et al.*, 2001; Agerbirk und Olsen 2012). Durch die Diversität der von Pflanzen synthetisierten, spezialisierten Metaboliten ist das Potential zur Entdeckung neuer Verbindungen groß, gerade im Bereich der Glucosinolate und der mit der Pathogenabwehr-assoziierten Substanzen (Kliebenstein *et al.*, 2001b). So wurden innerhalb der vergangenen 15 Jahre 26 neue Glucosinolate in der Familie der *Brassicaceae*n beschrieben (Fahey *et al.*, 2001; Agerbirk und Olsen 2012). Die Vielfalt von Glucosinolaten generiert ein breites Spektrum der Pathogenabwehr, welches mitunter spezifische Wirksamkeit gegenüber einzelnen Fraßfeinden zeigt (Schrantz *et al.*, 2009). Neben den Glucosinolaten sind außerdem weitere schwefelhaltige Verbindungen mit der Pathogenabwehr verknüpft, wie beispielsweise Camalexin und Alliin (Bednarek 2012) (Abbildung 1.7). In dieser Arbeit wurden insgesamt fünf Kandidaten für Glucosinolate beschrieben, welche ein charakteristisches Abundanzverhalten in den Ökotypen Col-0 und Ler-0 zeigten. Die gefundenen Verbindungen verknüpfen den Glucosinolatkern mit einer Butyl-, Hexyl-, Heptyl und Nonylgruppe. Butyl-, Hexyl- und Methylpentylglucosinolate sind bereits bekannte Verbindungen, allerdings nicht im Kontext mit *Arabidopsis* (Fahey *et al.*, 2001) (Abbildung 3.5). Des Weiteren wurden auch Isohexyl- und Isoheptyl-Glucosinolate in Meerrettich postuliert, allerdings wurde der endgültige, strukturelle Nachweis für diese

DISKUSSION

Verbindungen nicht geführt (Grob und Matile 1980). Isomere Kandidaten für ein Nonylglucosinolat sind bisher unbekannt. Diese beschriebenen Verbindungen würden in der Glucosinolatbiosynthese als Derivate von Alanin, Valin oder Isoleucin gebildet werden. Die aliphatischen Glucosinolate, welche bislang in *Arabidopsis* nachgewiesen wurden, werden aus Methionin als Vorstufe synthetisiert (Fahey *et al.*, 2001).

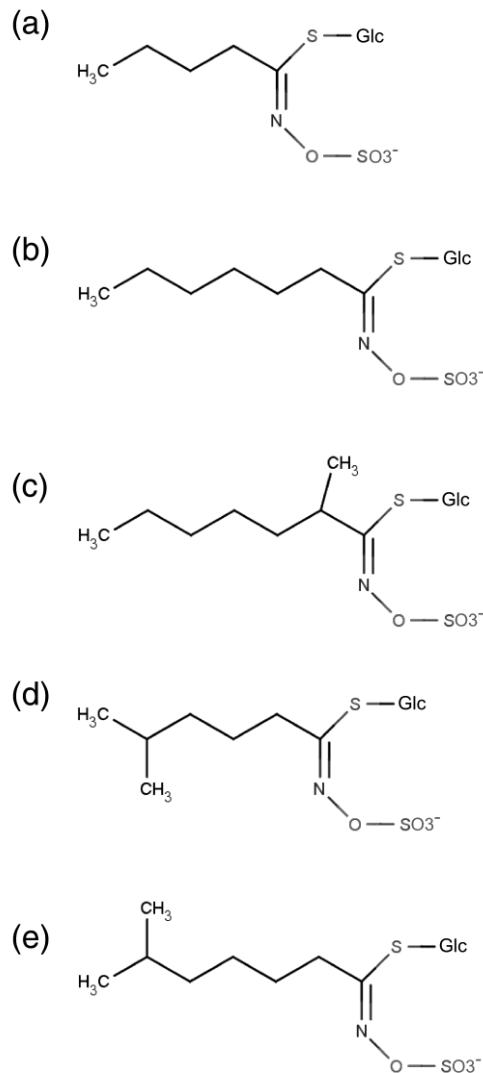


Abbildung 3.5 Kandidaten für Glucosinolate in *Arabidopsis*

Die Kandidaten Butylglucosinolat (a), Hexylglucosinolat (b), Methylpentylglucosinolat (c), Isohexylglucosinolat (d) und Isoheptylglucosinolat (e) korrelieren mit spezifisch veränderten Schwefelmassen in den *Arabidopsis* Ökotypen Col-0 und Ler-0.

Darüber hinaus konnte eine Verbindung detektiert werden, welche mit der chemischen Komposition eines Hydroxyhexylglucosinolats übereinstimmen würde. Auch diese Verbindung ist bislang unbekannt. Von diesen

Schwefelmetaboliten die als putative Glucosinolate charakterisiert wurden, ist das Butylglucosinolat verstärkt in *Ler-0* zu finden. Die übrigen Kandidaten zeigten in *Ler-0* nur sehr geringe Abundanz dem gegenüber aber deutliche Präsenz in *Col-0* (Abbildung 2.20). So ist es nicht auszuschließen, dass hier ein verantwortlicher Genort natürlicher Variabilität der Ökotypen unterliegt. Der *Locus GS-Elong*, welcher für die zyklische Kettenverlängerung der Aminosäuren verantwortlich ist, ist einer von fünf bekannten natürlichen Varianten im Glucosinolatmetabolismus von *Arabidopsis*. Es wurde gezeigt, dass in abhängig von *GS-Elong* der Ökotyp *Ler-0* charakteristischerweise C₄-Einheiten und *Col-0* C₃-Einheiten synthetisiert (Kroymann *et al.*, 2003). Dies würde zu der Akkumulation von Hexyl-, Hydroxyhexyl- und Nonylglucosinolat in *Col-0* sowie von Butylglucosinolat in *Ler-0* passen und die Hypothese der neuen Glucosinolate untermauern.

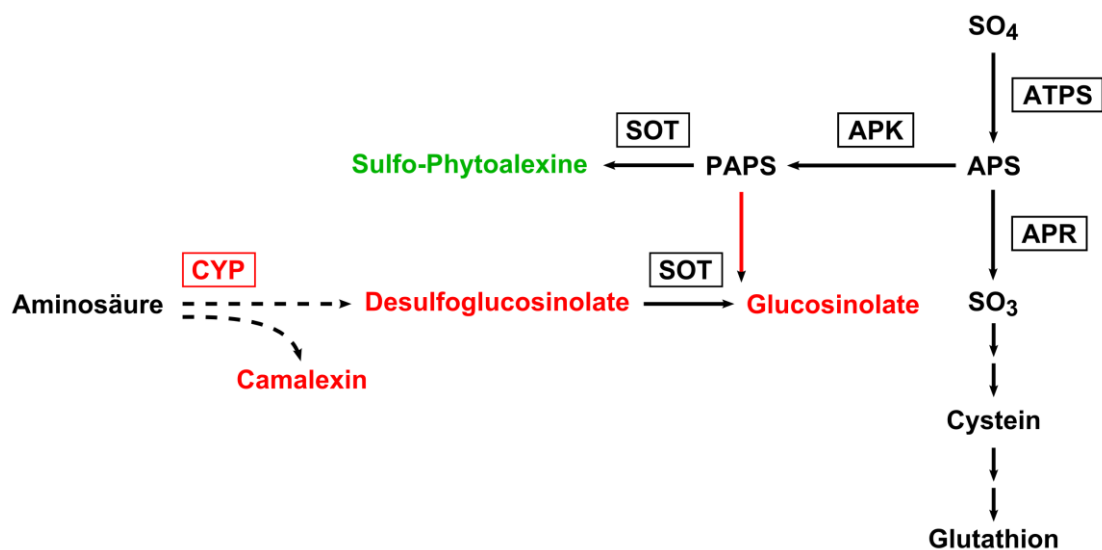


Abbildung 3.6 Synthese von Metaboliten der Pathogenabwehr in *Arabidopsis*

Bei Fehlen von Indolglucosinolaten und Camalexin wurde die Akkumulation einer sulfatierten Verbindung beobachtet, die mit bekannten Resveratrolglucosiden korreliert. Reduzierte Metaboliten und Reaktionen sind im Flusschema rot, akkumulierte Metaboliten grün hervorgehoben. Durch die Hemmung der Synthese der Glucosinolate und von Camalexin durch den Aktivitätsverlust von Zytochrom P450-Enzymen (CYP) ist der Gehalt an wichtigen, in der Pathogenabwehr involvierten Metaboliten reduziert und der Verbrauch von PAPS für deren Sulfatierung durch Sulfotransferasen (SOT) gering. Zur Kompensation des Mangels an Abwehrmetaboliten, werden alternative, sulfatierte Phytoalexine wie das Resveratrolglucosid akkumuliert. Hierbei kann der Reduzierte PAPS-Fluss in Glucosinolate als Sensor dienen.

Neben den Kandidaten für bislang nicht beschriebene Glucosinolate in *Arabidopsis* wurde in Mutanten deren Indolglucosinolatbiosynthese inhibiert ist

die Akkumulation eines putativen Phytoalexins gefunden. Phytoalexine sind als niedermolekulare, antimikrobielle Substanzen charakterisiert, welche in Pflanzen in Folge von Stress gebildet werden (Ahuja *et al.*, 2012). Diese Substanzen sind nicht durch eine Strukturhomologie verknüpft und sind häufig charakteristisch für eine Pflanzenspezies (Glawischnig 2007). Das bekannteste Phytoalexin in *Arabidopsis* ist Camalexin, welches wie die Indolglucosinolate ein Derivat von Indolacetaldoxim ist (Abbildung 2.49). In den untersuchten Mutanten ist auch die Biosynthese von Camalexin unterbrochen, wodurch die Akkumulation eines alternativen Phytoalexins induziert sein könnte (Abbildung 3.6). Resveratrol ist ein Phytoalexin, welches vor allem durch sein Vorkommen in Wein bekannt ist. Das Polyphenol mit antioxidativer Wirkung wurde schon in der traditionellen, chinesischen Medizin angewendet und wird in Verbindung mit der Prävention von Gefäßerkrankungen und Krebs assoziiert (Tang *et al.*, 2014). Resveratrol wird häufig in Form von Glukosederivaten gefunden (Khater *et al.*, 2012).

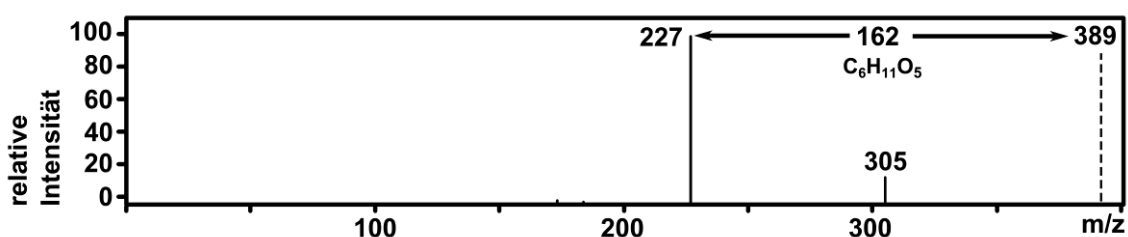


Abbildung 3.7 Fragmentierung eines Resveratrol-O-Glucosids

Die Fragmentierung des Resveratrolglucosids mit der nominalen Masse 389 zeigt ein Hauptfragment bei 227 m/z, welches der Masse von Resveratrol entspricht. Das abgespaltene Fragment von 162 stimmt mit dem Rest einer Deoxyglucose überein. Die relative Intensität ist bezogen auf das Hauptfragment 227, welches mit einem Wert von 100 dargestellt ist.

Nach den Ergebnissen von Püssa *et al.*, 2006.

Die im Rahmen dieser Arbeit detektierte Schwefelverbindung korreliert mit der chemischen Zusammensetzung bekannter, sulfatierter Resveratrolglucoside. Diese Annahme konnte mittels Fragmentierungsanalysen der Verbindung gestärkt werden (Abbildung 2.48). Allerdings wurden bislang für *Arabidopsis* weder Resveratrol noch seine Derivate beschrieben und auch kein homologes Enzym zur Resveratrolsynthese charakterisiert. Darüber hinaus wurde in Fragmentierungsanalysen von Resveratrolglucosiden die Abspaltung des Glucosylrests gezeigt, welche nicht mit der Fragmentierung in dieser Arbeit

übereinstimmt (Püssa *et al.*, 2006) (Abbildung 3.7). So bleibt fragwürdig ob es sich bei der gefundenen Schwefelverbindung tatsächlich um ein sulfatiertes Resveratrolglucosid handeln kann.

3.3 Das Schwefelmetabolom von *Arabidopsis thaliana*

Das Metabolom von *Arabidopsis* ist als Gesamtheit der durch die Pflanze synthetisierten Verbindungen zu betrachten. Es wird angenommen, dass das *Arabidopsis*-Metabolom etwa 5000 Verbindungen umfasst, von denen etwa 3000 experimentell detektiert werden konnten (Bino *et al.*, 2004; Matsuda *et al.*, 2010; Afendi *et al.*, 2012) (Abbildung 3.8). Nicht alle dieser Substanzen sind bislang eindeutig identifiziert worden. Durch die vollständige Sequenzierung des *Arabidopsis*-Genoms sind die Zusammenhänge der Stoffwechselwege auf der Ebene von Genom und dessen Expression gut erforscht, dennoch mangelt es häufig an der Aufklärung des metabolischen Kontexts (Hirai *et al.*, 2004b). Bislang wurde das Schwefelmetabolom von *Arabidopsis thaliana* basierend auf den aufgeklärten Stoffwechselwegen der reduktiven Sulfatassimilation sowie den Wegen der resultierenden Produkte beschrieben (Abbildung 1.2). Die bekannten Metaboliten können Datenbanken wie MetaCyc und KNApSACK entnommen werden. Unter 3000 beschriebenen Metaboliten sind rund 450 schwefelhaltige Verbindungen, das entspricht 15 % aller *Arabidopsis*-assoziierten Metaboliten. Die Anzahl von experimentell nachgewiesenen Schwefelmetaboliten in *Arabidopsis*, die im Rahmen dieser Arbeit anhand von Datenbanken ermittelt werden konnten umfasst 436 Verbindungen. Darunter sind auch Intermediate des Stoffwechsels, Abbauprodukte und Substrate sowie Substanzen die spezifisch für die Entwicklung oder die Anpassung an biotische und abiotische Umwelteinflüsse sind, welche nur bedingt miteinander koexistieren (Fiehn *et al.*, 2000; Hall *et al.*, 2002; Goda *et al.*, 2008). Die schwefelhaltigen Verbindungen sind grundsätzlich in niedermolekulare Metaboliten und Proteine zu unterscheiden, wobei der proteingebundene Schwefel einen Anteil von wenigstens 20 % des Gesamtschwefels ausmacht (Jander und Joshi 2009).

In den durchgeführten Metabolomstudien dieser Arbeit wurde mittels massenspektrometrischer Analyse bestimmt, dass etwa 3,6 % der simultan detektierten Massen schwefelhaltig sind. Die hier analysierten Massen sind ausschließlich

verknüpft mit niedermolekularen Metaboliten von 100 bis 1000 amu. Der Anteil von 3,6 % umfasst alle im Spektrum verifizierten Schwefelmassen. Diese Schwefelmassen können als Anteil schwefelhaltiger Massen erachtet werden, welche stabile Endprodukte biologischer Prozesse sind und miteinander koexistieren können. Diese Massen enthalten Isomere und Addukte und sind bei negativer Ionisierung detektierbar. Der Anteil singulärer, chemischer Kompositionen wurde durch die Annotation chemischer Summenformeln und Berücksichtigung von Addukten der Ionisierung bestimmt und beträgt etwa 1,2 %. Die Analysen zeigten eine große Diskrepanz zwischen detektierbaren Schwefelverbindungen und solchen die bekannt waren. So konnten lediglich 20-30 % der gefundenen Schwefelmetaboliten aus den Analysen bei positiver und negativer Ionisierung der Extrakte annotiert werden. Unter der Annahme, dass sich die Ergebnisse dieser Arbeit auf alle Metabolitklassen übertragen ließen, wäre mit einem vielfachgrößeren Metabolom von *Arabidopsis* zu rechnen als es bislang postuliert wurde. Verschiedene metabolische Studien mit *Arabidopsis* haben gezeigt, dass mit hochauflösenden, massenspektrometrischen Methoden über 1500 einzigartige Verbindungen innerhalb einer einzelnen Analyse detektiert werden können (Roepenack-Lahaye *et al.*, 2004; Giavalisco *et al.*, 2011). Alle bislang durchgeführten Analysen zum Schwefelmetabolom in Pflanzen haben sich die Markierung mit stabilen Isotopen zur Selektion der Metaboliten zu Nutze gemacht (Hsieh *et al.*, 2012; Giavalisco *et al.*, 2011; Gläser *et al.*, 2014). Die Stabilisotopen-gestützte Analyse von Proteinen und Metaboliten ist für viele Organismen etabliert worden. Durch Beobachtung der Metabolisierung einzelner isotopenmarkierter Substrate wurden Stoffwechselwege wie der Calvin-Benson-Zyklus und der Entner-Dourdoroff-Weg aufgeklärt (Calvin und Benson 1948; Entner und Dourdoroff 1952). Heute wird Isotopenmarkierung zunehmend in ungerichteten Metabolomanalysen zur Analyse globaler Einflüsse von Genfunktionen und enzymatischer Interaktionen auf das Metabolitprofil und den Metabolitumsatz eingesetzt (Huang *et al.*, 2014; Nakayama *et al.*, 2014). Derartige Analysen zeigen, dass eine Vielzahl der gefundenen Metaboliten nicht annotiert ist.

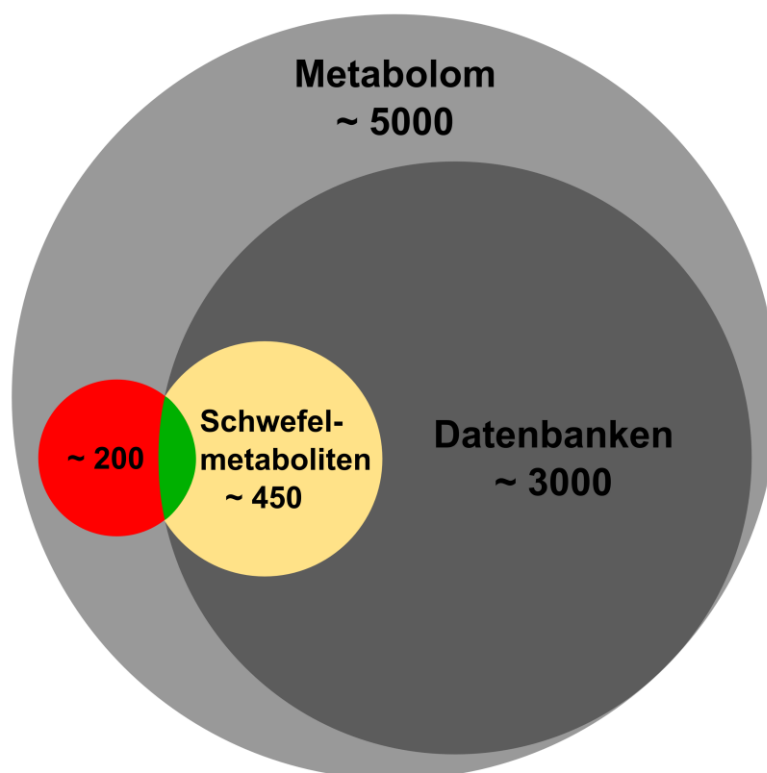


Abbildung 3.8 Das Metabolom von *Arabidopsis thaliana*

Es wird angenommen, dass das Metabolom von *Arabidopsis* etwa 5000 Metaboliten (hellgrau) umfasst, von denen bislang lediglich 3000 Verbindungen (dunkelgrau) beschrieben wurden und in Datenbanken erfasst sind. Das Schwefelmetabolom, wie es aus den Datenbanken abzuleiten ist wird durch etwa 450 Verbindungen (gelb) repräsentiert. In den Metabolomstudien dieser Arbeit konnten rund 200 Schwefelmetaboliten (rot) detektiert und charakterisiert werden. Darunter wurden nur 31 bekannte Metaboliten (grün) gefunden.

Hsieh *et al.* (2011) zeigte die Etablierung der isotopen Schwefelmarkierung und ihre Anwendbarkeit am Beispiel von GSH, GSSG und Methionin. Giavalisco *et al.* (2011) haben schließlich unter Verwendung von multipler Markierung mit den stabilen Isotopen ^{13}C , ^{15}N und ^{34}S 1203 singuläre Metabolitkompositionen in polaren Extrakten von *Arabidopsis*-Keimlingen detektiert. Darunter konnten 114 als Schwefelverbindungen identifiziert werden, von denen 40 mit bekannten, nicht isomeren Schwefelmetaboliten in *Arabidopsis* annotiert werden konnten. Im Vergleich dazu konnten im Rahmen dieser Arbeit 201 verschiedene Schwefelverbindungen durch DI-ICR-FT/MS-Analyse ermittelt und charakterisiert werden (Gläser *et al.*, 2014). Hierbei konnten 36 Schwefelmetaboliten *Arabidopsis*-assoziierten Schwefelverbindungen zugeordnet werden. Für die gefundenen, annotierten Metaboliten der beiden Studien kann eine Überlappung von 16 Schwefelverbindungen festgestellt werden. Die Ursache für die unterschiedlichen, gefunden Metaboliten in dieser Arbeit und

Giavalisco *et al.* (2011) ist im Detail der Analysen zu suchen, da hohe Auflösung und hohe Sensitivität auch eine hohe Unterscheidbarkeit der Probenherkunft und Anzucht generieren. Die angewendeten Parameter der Analysen sind im Vergleich in Tabelle 3.1 dargestellt. Es ist ersichtlich, dass die maßgeblichen Unterschiede dieser Arbeit und der Studie von Giavalisco *et al.* (2011) in den Anzuchtbedingungen, der Extraktion und der chromatographischen Trennung zu finden sind. Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde, war die Abhängigkeit der Metabolitextraktion von unterschiedlichen Lösungsmittelgemischen aus Wasser und Methanol gering. Demgegenüber war die Methode der Extraktion ausschlaggebend für die Extraktionseffizienz der Testmetaboliten (siehe 2.2). Da die verwendeten Extraktionsmethoden der Studien ähnlich waren wird nicht angenommen, dass die deutliche Variabilität der gefundenen Metaboliten auf die Extraktion selbst zurückzuführen ist. Die chromatographische Trennung, wie sie in Giavalisco *et al.* (2011) verwendet wurde steht der Möglichkeit der Anreicherung der Ionen mittels DI-ICR-FT/MS gegenüber. Der Vorteil der Trennung ist die Ausdünnung der Matrix und somit eine Verringerung des Potentials für Ionensuppression und Interferenz (Ohta *et al.*, 2010). Der Nachteil ist der durch die Trennung vorgegebene Fluss der fraktionierten Probe, welcher nur eine geringe Anzahl von Aufnahmen des Spektrums jeder Fraktion zulässt. Durch die Anreicherung der Ionen in der DI-ICR-FT/MS können vor allem die Massen mit geringer Abundanz mit höherer Wahrscheinlichkeit detektiert werden (Payne *et al.*, 2009). Die analytische Methode ist daher eine mögliche Quelle für die beobachtete Varianz der gefundenen Schwefelmetaboliten. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass der Unterschied des Metabolitspektrums spezifisch für die gewählten Anzuchtbedingungen ist. Es ist naheliegend, dass der Metabolismus in Pflanzen, welche unter Dauerlicht angezogen wurden wie in dieser Arbeit, unterschiedlich ist zu Pflanzen bei Langtagbedingungen wie in Giavalisco *et al.* (2011). Es ist bekannt, dass der Lichtzyklus die physiologischen Prozesse der Pflanzen beeinflusst (Staiger 2002). Diese endogene, biochemische Oszillation wird als circadiane Rhythmik beschrieben, welche unter anderem im Schwefel-metabolismus Einfluss auf die Kontrolle von SULTR, APR und SAT nimmt (Harmer *et al.*, 2000) (Abbildung 1.2). So ist es wahrscheinlich, dass die unterschiedlichen Anzuchtbedingungen der beiden Studien den größten

Einfluss auf die tatsächliche Metabolitzusammensetzung der untersuchten Pflanzen haben.

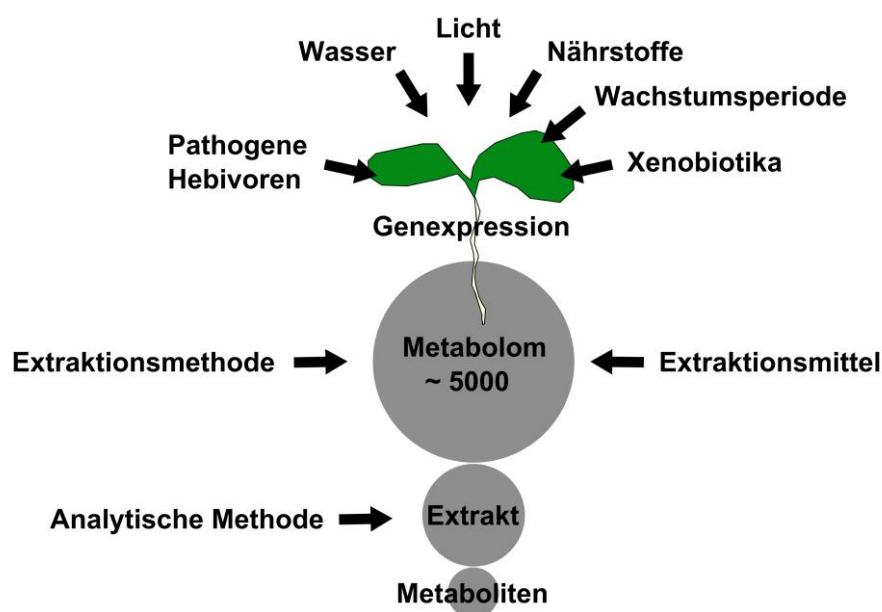


Abbildung 3.9 Einflüsse auf das Metabolom und dessen Analyse

Biotische und abiotische Effektoren beeinflussen den Stoffwechsel von Pflanzen. Die Pflanze adaptiert sich an ihre Umweltbedingungen durch Regulation ihrer Genexpression, welche unmittelbar Einfluss auf den Metabolismus der Pflanze hat. So ist das Metabolom charakteristisch für die gegenwärtigen Umweltbedingungen. Die Selektivität von Extraktionsmittel und Extraktionsmethode sind verantwortlich für die Metabolitzusammensetzung im Extrakt des Pflanzenmaterials. Die anschließende Detektion der Metaboliten ist eng verknüpft mit Art, Auflösung und Sensitivität der verwendeten analytischen Methode.

Durch den Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit denen von Giavalisco *et al.* (2011) wird deutlich wie eingeschränkt die Vergleichbarkeit von Metabolomanalysen sein kann und wie hoch die Variabilität des Metaboloms in Bezug auf Änderung der Umweltbedingungen ist. Um die Vergleichbarkeit und die Annotationsleistung in metabolischen Studien zu erhöhen wurde durch mehrere Metabolomics-assoziierte Arbeitsgruppen ein *Arabidopsis Metabolomics Consortium* gebildet (Quanbeck *et al.*, 2012). Ziel des Konsortiums ist die systematische Erfassung und Charakterisierung des Metaboloms von *Arabidopsis*-T-DNA-Insertionslinien durch standardisierte Anzucht- und Extraktionsbedingungen sowie die Anwendung unterschiedlicher analytischer Methoden. Hierdurch konnten bislang etwa 2000 unterschiedliche Metaboliten in *Arabidopsis* detektiert werden, von denen etwa 1000 Metaboliten eindeutig identifiziert werden konnten (Bais *et al.*, 2012). Dies verdeutlicht zum einen,

dass Metabolomanalysen immer eine Momentaufnahme eines sich im Fluss befindlichen Systems sind, welches durch Alter, Anzucht, Ernte und Extraktion beeinflusst werden kann und zum anderen, dass das Metabolom immer noch eine große Unbekannte darstellt. So sind, um ein Metabolom vollständig zu beschreiben, nicht nur multiple, parallele Extraktions- und Analysemethoden nötig, sondern darüber hinaus auch unterschiedliche Entwicklungsstadien des Probenmaterials sowie die Exposition von unterschiedlichen Umweltbedingungen und Stressoren, um nur einige Beispiele zu nennen (Abbildung 3.9).

Die Metabolomanalyse, wie sie in dieser Arbeit etabliert wurde ist eine wichtige Grundlage für die Erforschung metabolischer Zusammenhänge. Die erhobenen Daten ermöglichen ein tiefergehendes Verständnis des Schwefelmetaboloms von *Arabidopsis* und die Charakterisierung bislang unbekannter Verbindungen, welche die Aufklärung metabolischer Verknüpfungen und neuer Stoffwechselwege fördern werden. So ist eine eindeutige Charakterisierung von Stoffwechselwegen und Genfunktionen entkoppelt von den unterliegenden metabolischen Prozessen nicht mehr denkbar.

DISKUSSION

Tabelle 3.1 Vergleich unterschiedlicher Schwefelmetabolomstudien polarer Metaboliten

	Gläser <i>et al.</i> , (2014)	Giavalisco <i>et al.</i> , (2011)	Hsieh <i>et al.</i> , (2011)
MS-Methode	DI-ICR-FT/MS	UPLC-FT-MS/MS	LC-MS/MS
Methode der Ionisierung	ESI	ESI	ESI
Chromatographische Trennung	-	<i>reverse</i> Phase H ₂ O/ACN; 0,1 % FA	<i>reverse</i> Phase H ₂ O/ACN; 0,1 % FA
Injektionsfluss	2 µl/min	400 µl/min	250 µl/min
Detektionsbreite des Massenspektrums	100-1000 m/z	100-1500 m/z	-
Messzeit	5 min/250 Scans	17 min	6 min
Lösungsmittel zur Extraktion	70 % MeOH; 1 % FA	35 % MeOH	10 % MeOH; 0,1 % PCA
Probenvolumen	500 µl	100 µl	560 µl
Extrahiertes Material	100 mg	100 mg	110 mg
Analysiertes Probenvolumen	0,4 µl/250 Scans	2 µl	-
Anzuchtmedium	0,5-fach M-S Agar-basiert	0,5-fach M-S Agar-basiert	0,5-fach M-S hydroponisch
Schwefelgehalt	375 µM	250 µM	980 µM
Kultivierungszeitraum (Tage)	14	14	21
Kultivierungsbedingungen	Dauerlicht (70 µmol m ⁻² s ⁻¹)	16 h /8 h Licht/Dunkelheit (40 µmol m ⁻² s ⁻¹)	16 h /8 h Licht/Dunkelheit (95 µmol m ⁻² s ⁻¹)
Dauer der Stratifizierung	24 h	72 h	48 h
Annotationstoleranz	0,5 ppm	7 ppm	-
Ionisierung der Metaboliten	negativ/positiv	negativ/positiv	positiv

4 Material und Methoden

4.1 Verwendete Materialien

4.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Soweit nicht anders angegeben wurden Chemikalien und Lösungsmittel von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München) bezogen. Der analytische Standard von Glucobrassicin stammt von AppliChem GmbH (Darmstadt). Benzylglucosinolat wurde freundlicherweise von Erich Glawischnig (TU München, Genetik, Freising) zur Verfügung gestellt. Der isotope Schwefel $^{34}\text{S}_8$ wurde von Isoflex (San Francisco, USA) erworben. Die Makrosalze zur Herstellung der Nährmedien lieferte Roth (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe). Methanol in HPLC Analysequalität wurde von J. T. Baker (Avantor Performance Materials B.V., Deventer, Niederlande) bezogen.

4.1.2 Enzyme und Größenstandards zur Analyse von Nukleinsäuren

Enzyme, Enzympuffer und Größenstandards wurden, soweit nicht anders angegeben von Fermentas (Fisher Scientific Germany GmbH, Schwerte) verwendet. Die GoTaq-DNA-Polymerase wurde von Promega GmbH (Mannheim) bezogen und die Kapa3G Plant DNA-Polymerase von PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen). Die gereinigte Pferde- γ -Glutamyltransferase konnte bei Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München) erworben werden.

4.1.3 Oligonukleotide

Alle eingesetzten Oligonukleotide wurden von MWG Eurofins (Ebersberg) synthetisiert. Die Oligonukleotide wurden in sterilem Wasser gelöst und auf eine Konzentration von 100 μM eingestellt. Die Lagerung der Oligonukleotide erfolgte bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Anhang 8.2 gelistet.

4.1.4 Geräte

Tabelle 4.1 Verwendete Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Elektrophorese-Netzteil	E844	Consort
ICR-FT/MS Massenspektrometer	SolariX	Bruker Daltonics
ESI Quelle	Apollo II	Bruker Daltonics
Magnet	12 T supraleitender Magnet	Magnex scientific
Leitfähigkeit	FE30	Mettler-Toledo
PCR-Cycle	T-Gradient	Biometra
pH-Meter	pH 526	WTW
Photometer	Ultrospec 2000	Pharmacia Biotech
Rundschüttler	RC-406	Infors HT
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf
Ultraschall	Sonoplus HD2070	Bandelin
Vortex	MS1 Minishaker	IKA
Waagen	BP 3100 S	Sartorius
	A 200 S	Sartorius
Zentrifugen	E5424	Eppendorf
	E5424R	Eppendorf
Geldoc UV System	UV 312 nm	Bachhofer
	Doc-It	UVP
	P91D	Mitsubishi

4.1.5 Pflanzenmaterial

Soweit nicht anders angegeben wurden alle verwendeten Pflanzenlinien vom Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre (NASC, Loughborough, UK) erworben.

Linien anderer Herkunft wurden freundlicherweise von S. Kopriva (SK, Universität Köln, Botanisches Institut) und E. Glaswischnig (EG, TU München, Genetik, Freising) zur Verfügung gestellt oder waren Lehrstuhl-interne Kreuzungen von R. Blum (RB, TU München, Botanik, Freising). Die verwendete Zellkulturlinie vom *Arabidopsis*-Ökotyp Columbia (Col-0) wurden am Lehrstuhl für Botanik der TU München eigens etabliert. Alle T-DNA-Insertionslinien

MATERIAL UND METHODEN

wurden mittels PCR auf die Anwesenheit der Insertion getestet und homozygot selektiert. Die dazu verwendeten Oligonukleotide sind in Anhang 8.2 aufgeführt.

Tabelle 4.2 Verwendete Pflanzenlinien

Linie	Ökotyp	Locus	Bezeichnung	Quelle (Bestellnummer)	Literaturverweis
<i>apk1</i>	Col-0	AT2G14750	Salk_053427C	NASC (N662489)	(Mugford <i>et al.</i> , 2009)
<i>apk2</i>	Col-0	AT4G39940	Salk_093072C	NASC (N656766)	(Mugford <i>et al.</i> , 2009)
<i>apk3</i>	Col-0	AT3G03900	Salk_115182C	NASC (N668895)	(Mugford <i>et al.</i> , 2009)
<i>apk4</i>	Col-0	AT5G67520	Salk_035815C	NASC (N682222)	(Mugford <i>et al.</i> , 2009)
<i>apk1x</i> <i>apk2</i>	Col-0	AT2G14750 AT4G39940	Salk_053427C Salk_093072C	SK	(Mugford <i>et al.</i> , 2010)
<i>apk1x</i> <i>apk4</i>	Col-0	AT2G14750 AT5G67520	Salk_053427C Salk_035815C	SK	(Mugford <i>et al.</i> , 2010)
<i>apr1</i>	Col-0	AT4G04610	GK-460B02	NASC (N393609)	(Kopriva <i>et al.</i> , 2009)
<i>apr2</i>	Col-0	AT1G62180	GK-108G02	NASC (N305938)	(Loudet <i>et al.</i> , 2007)
<i>atps1</i>	Col-0	AT3G22890	GK-850C05	NASC (N766650)	(Liang <i>et al.</i> , 2010)
<i>atps2</i>	Col-0	AT1G19920	Sail_775_D12	NASC (N834661)	
<i>cyp79B2x</i> <i>cyp79B3</i>	WS	AT4G39950 AT2G22330		EG	(Zhao <i>et al.</i> , 2002)
<i>ggt1</i>	Ler-0	AT4G39640	SGT6375	NASC (N100370)	(Ohkama-Ohtsu <i>et al.</i> , 2007a)
<i>ggt2</i>	Col-0	AT4G39650	Salk_147881	NASC (N647881)	(Ohkama-Ohtsu <i>et al.</i> , 2007a)
<i>ggt4-1</i>	Ler-0	AT4G29210	GT_5_57895	NASC (N161036)	(Ohkama-Ohtsu <i>et al.</i> , 2007b)
<i>ggt4-2</i>	Col-0	AT4G29210	GK-631A04.01	NASC (N326107)	
Δ PCS	Col-0	AT5G44070 AT1G03980		RB	(Blum <i>et al.</i> , 2007)
Δ PCSx <i>ggt1</i>	Col-0 Ler-0	AT5G44070 AT1G03980 AT4G39640		RB	
Δ PCSx <i>ggt4-1</i>	Col-0 Ler-0	AT5G44070 AT1G03980 AT4G29210		RB	(Blum <i>et al.</i> , 2010)
Δ PCS1x <i>ggt1x</i> <i>ggt4-1</i>	Col-0 Ler-0	AT5G44070 AT4G39640		RB	
TR1	Col-0	AT4G39940 AT3G03900 AT5G67520	Salk_093072C Salk_115182C Salk_035815C	SK	(Mugford <i>et al.</i> , 2010)
TR3	Col-0	AT2G14750 AT4G39940 AT5G67520	Salk_053427C Salk_093072C Salk_035815C	SK	(Mugford <i>et al.</i> , 2010)

4.1.6 Nährmedien

Zur Anzucht und Kultivierung von *Arabidopsis* Keimlingen und Zellkultur wurde modifiziertes Murashige und Skoog (M-S) Nährmedium verwendet (Tabelle 4.3). *Arabidopsis*-Keimlinge wurden auf 0,5-fach konzentriertem, mit 1 % Agar verfestigtem Medium angezogen und kultiviert. Zur Kultivierung der Keimlinge in Flüssigkultur oder für Expositionsversuche wurde M-S-Medium in 0,25-facher Konzentration eingesetzt. Zellkultur wurde in M-S-Vollmedium, supplementiert mit den Hormonen Kinetin und Naphthyllessigsäure (NAA) kultiviert.

Tabelle 4.3 Zusammensetzung von Murashige-Skoog-Vollmedium

Makrosalze	mM
NH ₄ NO ₃	20
KNO ₃	19
KH ₂ PO ₄	1,25
CaCl ₂	3
MgCl ₂	1,5
Na ₂ SO ₄	1,5
FeCl ₂	120
Mikrosalze	µM
H ₃ BO ₃	50
MnCl ₂	100
Zn(CH ₃ COO)	37
KI	5
Na ₂ MoO ₄	1
Cu(H ₃ COO) ₂	0,1
CoCl ₂	0,1
Hormone	µM
Kinetin	2,7
NAA	0,5

4.2 Verwendete Methoden

4.2.1 Anzucht von *Arabidopsis*-Keimlingen

Die Anzucht von *Arabidopsis*-Keimlingen erfolgte steril auf 0,5-fach konzentriertem, Agar-verfestigtem M-S-Medium in Petrischalen (Tabelle 4.3). Zur Anzucht wurde *Arabidopsis*-Saatgut oberflächensterilisiert. Hierzu wurde ein Aliquot Samen zunächst 20 min bei 600 upm in 10-20 Volumen 80 % Ethanol, 0,1 % Triton X-100 gewaschen und schließlich in entsprechendem Volumen mit 3 % Natriumhypochlorid für 2 min sterilisiert. Zur Entfernung des Hypochlorids wurden die Samen im Anschluss fünfmal mit sterilem Wasser gewaschen. Mittels Pipette wurden die in sterilem Wasser suspendierten Samen einzeln auf das Medium ausgebracht. Die Petrischalen wurden mit Parafilm verschlossen und für 24 h bei 4 °C stratifiziert. Anschließend wurden die Samen bei 23 °C und Dauerlicht ($70 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) kultiviert.

4.2.2 *Arabidopsis*-Suspensionszellkultur

Erhaltungskulturen von *Arabidopsis* Zellkultur wurden wöchentlich steril 1:10 in frisches M-S-Vollmedium, supplementiert mit Kinetin und NAA umgesetzt (Tabelle 4.3). Die Kultivierung erfolgte in Erlenmeyer-Kolben bei 23 °C und Dauerlicht ($70 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) auf einem Rundschüttler bei (100 upm).

4.2.3 Isolation von genomischer DNA aus Pflanzenmaterial

Zur Isolation genomischer DNA aus Pflanzenmaterial wurden 30-50 mg Keimlinge oder Blattmaterial in Stickstoff gefroren und mittels eines vorgekühlten Glasstabs homogenisiert. Nach Zugabe von 300 μl CTAB-Aufschlusspuffer (2 % Cetyl-trimethyl-ammoniumbromid, 1,4 M Natriumchlorid, 100 mM Tris-HCl pH 8, 20 mM EDTA) wurde der Ansatz für 10 min bei 65 °C inkubiert. Nach Abkühlen der Proben wurden 300 μl Chloroform zugegeben und gründlich durchmischt. Nach anschließender Zentrifugation ($16.000 \times g$) für 5 min, wurde die obere, wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 300 μl Isopropanol gefällt. Die DNA wurde abzentrifugiert bei $16.000 \times g$ für 5-10 min. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Zur weiteren

Analyse wurde die DNA in 50 µl sterilem Wasser gelöst (Murray und Thompson 1980).

4.2.4 Amplifikation von DNA-Fragmenten

Zur schnellen Analyse von pflanzlicher DNA wurde das KAPA3G Plant Kit von Promega GmbH (Mannheim) verwendet. Dieses ermöglicht die PCR-Analyse direkt am aufgeschlossenen Blattmaterial. Hierzu wurden einzelne Keimlingsblätter verwendet und entsprechend dem Protokoll des Herstellers zur PCR mit der KAPA3G-DNA-Polymerase eingesetzt. Falls die Ergebnisse mit KAPA3G nicht zufriedenstellend waren wurde die PCR-Analyse mit CTAB-DNA-Präparationen, welche hohe Ausbeute und Reinheitsgrad aufweisen und GoTaq-DNA-Polymerase durchgeführt.

Tabelle 4.4 Allgemeiner PCR-Ansatz für KAPA3G-DNA-Polymerase

Komponente	Endkonzentration	Volumen (µl)
DNA-Vorlage	0,1-20 ng/l	0,5
Puffer mit dNTPs (2 x)	1 x	12,5
Oligonukleotid vorwärts (5 µM)	175 nM	0,7
Oligonukleotid rückwärts (5 µM)	175 nM	0,7
DNA-Polymerase (2,5 u/µl)	0,25 u	0,1
Wasser		ad 25

Tabelle 4.5 Allgemeiner PCR-Ansatz für GoTaq-DNA-Polymerase

Komponente	Endkonzentration	Volumen (µl)
DNA-Vorlage	0,1-20 ng/l	1
Puffer (5 x)	1 x	4
dNTP Mix (10 mM)	1 mM	2
Oligonukleotid vorwärts (5 µM)	500 nM	2
Oligonukleotid rückwärts (5 µM)	500 nM	2
DNA-Polymerase (5 u/µl)	0,05 u	0,04
Wasser		ad 20

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde zur Verifikation und Selektion der verwendeten T-DNA-Insertionslinien verwendet. Hierzu wurden genspezifische und T-DNA spezifische Oligonukleotide verwendet (Anhang 8.2). Die spezifische Anlagerungstemperatur (T_a) der Oligonukleotide wurde in Abhängigkeit von deren Schmelztemperatur (T_m) gewählt. So wurde in der Regel eine Anlagerungstemperatur von $T_a=T_m-5\text{ °C}$ verwendet. Für die Verwendung der Oligonukleotide in der KAPA3G-PCR gilt eine Anlagerungstemperatur von $T_a=T_m+2\text{ °C}$.

Tabelle 4.6 Allgemeines PCR-Protokoll für die Verwendung mit der KAPA3G-DNA-Polymerase

Vorgang	Temperatur (°C)	Zeit
Initiale Denaturierung	95	10 min
40 Zyklen		
Denaturierung	95	20 s
Anlagerung der Oligonukleotide	variabel	15 s
Elongation		30 s/kb
Finale Elongation		30 s/kb

Tabelle 4.7 Allgemeines PCR-Protokoll für die Verwendung mit der GoTaq-DNA-Polymerase

Vorgang	Temperatur (°C)	Zeit
Initiale Denaturierung	95	5 min
30 Zyklen		
Denaturierung	95	45 s
Anlagerung der Oligonukleotide	variabel	45 s
Elongation		1 min/kb
Finale Elongation		5 min

4.2.5 Isolation von RNA aus Pflanzenmaterial

Die Isolation von RNA aus *Arabidopsis* erfolgte mit dem RNeasy Plant Mini Kit der Firma Qiagen (Hilden). Zur Isolation wurden 50 mg Pflanzenmaterial in Stickstoff eingefroren und mittels vorgekühltem Glasstab homogenisiert. Das vorbereitete Pflanzenmaterial wurde nach dem Protokoll des Herstellers zur Isolation der RNA weiterverarbeitet. Für die abschließende Elution der RNA wurden 30 µl RNase-freies Wasser eingesetzt.

4.2.6 cDNA Synthese von pflanzlicher RNA mittel reverser Transkriptase

Zur cDNA-Synthese mittels reverser Transkriptase (RT) wurden 50 ng der isolierten RNA eingesetzt. Zur Eliminierung von Kontamination der RNA mit genomischer DNA wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. Hierzu wurden 8 µl mit einem absoluten RNA-Gehalt von 50 ng mit 1 µl DNase (1 u/µl) und 1 µl DNase-Puffer versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die DNase durch Zugaben von 0,5 µl EDTA (50 mM) und Inkubation bei 65 °C für 10 min inaktiviert. Zur cDNA-Synthese wurden der DNA-freien RNA 1 µl Oligo-dT-Nukleotid (50 µM) zugegeben und der Ansatz auf 13 µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Diesem Ansatz wurden 4 µl RT-Puffer (5 x), 2 µl dNTPs (10 mM) und 1 µl RT (200 u/µl) zugegeben, gefolgt von einer Inkubation von 60 min bei 42 °C und der anschließenden Inaktivierung bei 72 °C für 10 min.

4.2.7 Semiquantitative RT-PCR

Zur semi-quantitativen Analyse des RNA-Gehalts in der Pflanze wurde die auf Basis der isolierten RNA synthetisierte cDNA eingesetzt. Die zur Amplifikation eingesetzten Oligonukleotide generieren genspezifische Fragmente von etwa 500 bp. Als Referenz wurde das Haushaltsgen Aktin verwendet. Die Amplifikation der cDNA wurde mit der GoTaq-DNA-Polymerase durchgeführt, gemäß den Angaben in Tabelle 4.5 und Tabelle 4.7.

4.2.8 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Hierzu wurden Gele von 0,8 % Agarose in TAE-

Puffer (50 mM Trisbase, 0,1 % Eisessig, 1 mM EDTA pH 8) verwendet. Den Gelen wurden zur UV-Visualisierung der DNA-Fragmente 0,1 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Die Elektrophorese erfolgte horizontal bei 200 V Gleichspannung in der Gelkammer. Als Größenstandard wurde ein 1 kb-Marker verwendet. Die DNA-Proben wurden zur Gelelektrophorese mit 6 x Ladebuffer (50 % Glycerol, 0,25 % OrangeG) zu einer Endkonzentration von 1 x versetzt.

4.2.9 Synthese von Natriumsulfat

Der reine Schwefel der stabilen Isotope $^{32}\text{S}_8$ (94 %) und $^{34}\text{S}_8$ (99,9 %) wurde jeweils unter Sauerstoffatmosphäre verbrannt und oxidiert zu SO_2 . Das Gas wurde in eine Waschflasche mit 200 mM Natronlauge, 10 % Wasserstoffperoxid eingeleitet. In der Lösung wurde SO_2 zu Natriumsulfat (Na_2SO_4) auf oxidiert. Nach vollständiger Umsetzung des Schwefels wurde der Reaktionsansatz mit Salzsäure neutralisiert und zunächst bei 70 °C, dann bei 120 °C zur Trockne eingengt. Das hergestellte Natriumsulfat wurde schließlich eingewogen und resultierend in einer Arbeitskonzentration von 750 mM in Wasser gelöst. Die Stammlösung wurde standardmäßig in einer Verdünnung von 1:2000 eingesetzt.

4.2.10 Markierung von *Arabidopsis* mit stabilem, isotopem Schwefel

4.2.10.1 Keimlinge

Zur Markierung von *Arabidopsis*-Keimlingen mit isotopen Schwefel wurden oberflächensterilisiertes Saatgut auf 0,5-fach konzentriertes Standardnährmedium (Tabelle 4.3), supplementiert mit ^{32}S - und ^{34}S -isotopem Schwefel (375 µM) und verfestigt mit 1 % Agar ausgebracht. Nach der Stratifikation des Materials für 24 h bei 4 °C wurden die Keimlinge für 14 Tage bei Kulturbedingungen angezogen (siehe 4.2.1). Zur Analyse der Keimlinge wurden diese nach Ende der Kultivierungsperiode vorsichtig vom Medium geerntet und in Wasser gewaschen um Reste von Medium und Samenschalen zu entfernen. Die Keimlinge wurden anschließen auf Papiertüchern getrocknet und in Aliquots von 100 mg eingewogen und in Stickstoff schockgefroren. Bis zur Verwendung des Materials wurden die Aliquots bei -80 °C gelagert.

Die Kultivierung der Keimlinge in Flüssigkultur für Expositionsversuche erfolgte in 0,25-fach konzentriertem Medium, supplementiert mit ^{32}S - und ^{34}S -isotopem

Schwefel (375 μM). Hierzu wurden jeweils etwa 200 mg vorkultivierte Keimlinge in 50 ml Erlenmeyerkolben in 5 ml Medium überführt und mit der entsprechenden Konzentration des Expositionsreagens versetzt. Anschließend wurden die Kolben auf einem Rundschüttler bei 100 upm für die Dauer der Exposition weiter kultiviert. Die Ernte der Keimlinge erfolgte analog der Ernte des auf Agar-verfestigtem Medium angezogenen Materials.

4.2.10.2 Suspensionszellkultur

Die stabile Isotopenmarkierung des Schwefels in Suspensionszellkultur erfolgte in Vollmedium supplementiert mit jeweils 375 μM $\text{Na}_2^{32}\text{SO}_4$ und $\text{Na}_2^{34}\text{SO}_4$ und versetzt mit den Hormonen Kinetin und NAA (Tabelle 4.3). Um eine hinreichende Markierung der Kulturen zu erhalten, mussten wenigstens zwei Zyklen des Austauschs des Mediums durchlaufen werden (s. 4.2.2). Die Ernte der Zellkultur erfolgte durch Vakuumfiltration in einem Büchner-Trichter mit Filterpapier. Hierbei wurde die Zellkultur bei angelegtem Vakuum auf das Filterpapier gegossen und anschließend zur Entfernung der übrigen Nährsalze mit 10 Kulturvolumen Wasser gewaschen. Nachdem die Flüssigkeit vollständig aus der Kultur abgesaugt war wurden Aliquots von jeweils 100 mg eingewogen und in Stickstoff eingefroren. Bis zur Verwendung des Materials wurden die Aliquots bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert

4.2.11 Bestimmung des Wurzelwachstums von Keimlingen

Zur Bestimmung des Wurzelwachstums von *Arabidopsis*-Keimlingen in Abhängigkeit des Nährsalzgehalts des Mediums wurde oberflächensteriles Saatgut zunächst auf Agar-verfestigtem Vollmedium für 3 Tage vorkultiviert. Je Konzentration wurden etwa 50 Keimlinge benötigt. Anschließend wurden die Keimlinge auf die unterschiedlichen Nährsalzkonzentrationen umgesetzt und die Position der Wurzelspitze markiert. Die Keimlinge wurden nun für 4 Tage weiterkultiviert. Für die 7 Tage alten Keimlinge wurde nun der absolute Wurzelzuwachs gemessen. Dazu wurden die Platten eingescannt und mittels Software ausgewertet (<http://imagej.nih.gov/ij/index.html>).

4.2.12 Bestimmung des Photopigmentgehalts in Keimlingen

Für die Bestimmung des Photopigmentgehalts in *Arabidopsis*-Keimlingen wurden jeweils 50 mg der zu untersuchenden Keimlinge eingewogen und in Stickstoff eingefroren. Das Pflanzenmaterial wurde mittels eines vorgekühlten Glasstabs homogenisiert und in 1 ml Methanol aufgenommen. Der Ansatz wurde für 5 min auf Eis inkubiert und schließlich bei 16.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde 1:2 in Methanol verdünnt und die Extinktion der Proben bei 700, 665, 652 und 470 nm bestimmt. Die Extinktion bei 700 nm ist die Trübungskontrolle und sollte einen Wert von 0,01 Einheiten nicht übersteigen. Die Berechnung des Photopigmentgehalts in µg/ml Extrakt erfolgte nach folgenden Formeln:

Formel 4.1 Berechnung des Gehalts an Chlorophyll a

$$\text{Chlorophyll a} = 16,72 \times E_{665} - 9,16 \times E_{652}$$

Formel 4.2 Berechnung des Gehalts an Chlorophyll b

$$\text{Chlorophyll b} = 34,09 \times E_{652} - 15,28 \times E_{665}$$

Formel 4.3 Berechnung des Gehalts an Carotinoiden

$$\text{Carotinoide} = (1000 \times E_{470} - 1,63 \times \text{Chl a} - 104,96 \times \text{Chl b})/221$$

Die Ergebnisse wurden anschließend in µg/g Frischgewicht umgerechnet.

4.2.13 Bestimmung des Gesamtthiolgehalts in Keimlingen

Zur Bestimmung des Gesamtthiolgehalts in *Arabidopsis*-Keimlingen wurden 50 mg Pflanzenmaterial eingesetzt. Vor der Bestimmung der Proben wurde eine Standardkurve mit GSH aufgenommen. Dazu wurde eine Konzentrationsreihe von 0,2-4 mg/ml in 0,1 N Salzsäure hergestellt. Die Konzentrationsstufen wurden jeweils 1:40 in Ellman's Reagenz (300 µM 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8) verdünnt zu einem absoluten GSH-Gehalt von 5-100 µg. Die Konzentrationsreihe wurde nach Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min bei 410 nm photometrisch gemessen und grafisch ausgewertet. Als Referenz wurde 0,1 N Salzsäure 1:40 in Ellman's Reagenz verdünnt verwendet. Schließlich wurde das aliquotierte, in Stickstoff gefrorene Keimlingsmaterial mittels eines Glasstabs homogenisiert. Nach

Zugabe von 0,1 N Salzsäure (5 µl/mg) wurden die das Material bei 95 % Intensität für 30 s mit der Ultraschallsonde aufgeschlossen und anschließend für 5 min bei 16.000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils 1:40 mit Ellman's Reagenz versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bestimmung des Thiolgehalts erfolgte photometrisch bei 410 nm. Die Berechnung des Thiolgehalts erfolgte basierend auf der Standardkurve (Ellman 1959; Kranner und Grill 1996).

4.2.14 Metabolitextraktion aus *Arabidopsis*-Keimlingen

Zur Extraktion der Metaboliten aus Keimlingen zur massenspektrometrischen Analyse wurden jeweils 100 mg Keimlingsmaterial eingesetzt. Das Pflanzenmaterial wurde in Stickstoff eingefroren und mit einem vorgekühlten Glasstab homogenisiert. Nach dem Beginn des Aufschlusses wurden die Ansätze stets auf Eis gehalten. Dem Material wurden 250 µl 50 % Methanol, 0,1 % Ameisensäure zugegeben und die Ansätze wurden bei 85 % Intensität für 10 s mit der Ultraschallsonde aufgeschlossen. Die Keimlingsfragmente wurden bei 4 °C für 20 min bei 20.000 x g abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Keimlingsfragmente wurden erneut in 250 µl 100 % Methanol, 0,1 % Ameisensäure mit Ultraschall aufgeschlossen und anschließend zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde mit dem ersten vereint und wiederum zentrifugiert. Das klare Extrakt wurde in einem neuen Reaktionsgefäß gesammelt und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert. Die Proben wurden grundsätzlich frühestens einen Tag vor der Analyse vorbereitet.

4.2.15 DI-ICR-FT/MS Analytik

Die Metabolitanalyse von Extrakten aus *Arabidopsis*-Keimlingen wurde mittels direkter Injektion im Ionenzyklotronresonanz-Fouriertransformations-Massenspektrometer (DI-ICR-FT/MS) durchgeführt. Die verwendeten Messparameter des Massenspektrometers waren ein Massenbereich von 123-1000 m/z und eine Akkumulationszeit der Ionen für 0,3 s. Die externe Kalibrierung des Systems erfolgte mit einer Standardlösung von Arginin in Wasser (1000 ppm). Nach Verdünnung der Stammlösung in Methanol zu 5 ppm oder 10 ppm wurden die Übereinstimmung der zu kalibrierenden Massen mit einer Abweichung von < 0.1 ppm eingestellt.

Zur Analyse wurden die Metabolitextrakte üblicherweise 1:25 in 70 % Methanol verdünnt und direkt in die ESI-Quelle mit einem Fluss von 120 $\mu\text{l/h}$ injiziert. Es wurden mindesten vier biologisch Replikate, welche zwei Replikate je Markierungssituation beinhalteten, und zwei technische Replikate gemessen. Zur Datenaufzeichnung wurde je Messung 250-1000 Scans akkumuliert. Die resultierenden Massenspektren wurden anschließend intern auf die monoisotopen Massen der aliphatische Fettsäuren $\text{C}_{12}\text{-C}_{24}$ sowie die Schwefelmetaboliten γEC , GSH und MOI3M auf eine Abweichung $< 0,05$ ppm mittels der Data Analysis Software (Bruker Daltonix, Bremen) kalibriert. Der Export der Massenspektren zu tabellarischen Massenlisten, welche Massesignal und Intensitätsinformationen enthalten wurde mit einem *signal-to-noise*-Verhältnis von 4 und einer Massenpräzision von 5 Dezimalstellen durchgeführt (Janz *et al.*, 2010).

4.2.16 Annotation massenspektrometrischer Daten mit bekannten Schwefelmetaboliten

Die Zuordnung von beschriebenen Schwefelmetaboliten erfolgt basierend auf den erstellten Biomarkerlisten für positive und negative Ionisierung (siehe 2.3.2). Die Biomarkerlisten enthalten die monoisotopen Massen, der selektierten, beschriebene Schwefelmetaboliten sowie die hetero- und monoisotopen Massen der korrespondierende ^{34}S -Isotopologen und für häufige Addukte der Ionisierung die ^{32}S - und $^{34}\text{S}_1$ -Massen. Die Biomarkerlisten wurden automatisiert mit einem MATLAB-Programm (The MathWorks GmbH, Ismaning), programmiert und zur Verfügung gestellt durch B. Kanawati (Biogeochemie, Helmholtz Zentrum München) mit den Massenlisten der Spektren abgeglichen. Hierbei wurde eine Abweichung von 1 ppm toleriert. Die zugeordneten Massen wurden anschließend unter den miteinander verknüpften Analysen aus biologischen und technischen Replikaten sowie der unterschiedlichen Isotopenmarkierung, verglichen und die reproduzierbaren Kandidaten selektiert. Die selektierten Kandidaten sollten im ^{34}S -Spektrum ^{32}S - und $^{34}\text{S}_{1-n}$ -Zustände aufweisen im erwarteten Markierungsverhältnis von 40:60 sowie die $^{13}\text{C}_1$ -Masse im ^{32}S - und im ^{34}S -markierten Spektrum mit der natürlichen Abundanz von 1 % je C-Atom der Verbindung. Alle Kandidaten wurden zusätzlich visuell im Massenspektrum überprüft um die Annotation zu bestätigen.

4.2.17 Identifikation von Schwefelmassen in massenspektrometrischen Daten

Zur Identifikation von Schwefelmassen nicht-annotierter Schwefelmetaboliten können zwei Formeln formuliert werden, welche die Charakteristika der experimentellen Daten beschreiben und die ihre Selektion aus massenspektrometrischen Daten erlauben (siehe 2.3.3).

Formel 2.1 Auswahl der ^{32}S -Signale für putative Schwefelmassen

$$0 < [\text{signal}_i^{32\text{S}}]_{34\text{S}} < [\text{signal}_i^{32\text{S}}]_{32\text{S}}$$

Formel 2.2 Verifikation der Isotopenmassenverschiebung durch ^{34}S

$$[\text{signal}_i^{32\text{S}}]_{34\text{S}} < [\text{signal}_i^{34\text{S}}]_{34\text{S}}$$

Mittels eines MATLAB-basierten (The MathWorks GmbH, Ismaning) Algorithmus, programmiert und zur Verfügung gestellt von B. Kanawati (Biogeochemie, Helmholtz Zentrum München) können die Massen, welche den definierten Parametern entsprechen automatisiert aus einem korrespondierenden Probenpaar von ^{32}S - und ^{34}S -Isotopenmarkierung selektiert werden. Hierzu müssen die Massenlisten des Probenpaares zur Eingabe in das Programm die Dateinamen N.asc für ^{32}S - und L.asc für ^{34}S -markiertes Spektrum haben. Die Ausgabedatei out2.txt enthält alle Kandidatenmassen des Probenpaares die eine Übereinstimmung in $^{34}\text{S}_1$ zeigen. Die Ausgabedatei bildet eine Massenliste der Schwefelkandidaten mit ^{32}S -monoisotoper Masse und korrespondierender Intensität des original ^{32}S -Spektrums.

4.2.18 Vergleichende Analysen des Schwefelmetaboloms durch hierarchische Clusteranalyse

Zur vergleichenden Analyse des Schwefelmetaboloms zweier Pflanzenlinien oder zweier Zustände innerhalb einer Pflanzenlinie wurden alle Massenlisten der selektierten Schwefelmassen der zu vergleichenden Proben in einer Matrix zusammengefasst. Hierbei ist zu beachten, dass nur Proben aus derselben Analyse miteinander verglichen werden können. Zur Erstellung der Matrix wurden die Massenlisten in den Matrix Generator (M. Frommberger, Biogeochemie, Helmholtz Zentrum München) geladen und mit einer tolerierten

Abweichung der auszurichtenden Massen von 1 ppm prozessiert. In der resultierenden Matrix wurden schließlich alle Massen aussortiert die nicht mindestens innerhalb eines Probencluster in der Hälfte der Replikate reproduzierbar waren. Die bereinigte Matrix wurde anschließend mittels HCA auf spezifische Abundanzprofile von Schwefelmassen zwischen den zu vergleichenden Probenclustern untersucht. Die HCA wurde mit Hilfe des Hierarchical Clustering Explorers 3.5 (<http://www.cs.umd.edu/hcil/hce/>) durchgeführt. Es erfolgte eine programminterne Normalisierung der Daten beim Einlesen der Matrix. Dabei wurden die Inhalte der Matrix (m) nach folgender Formel standardisiert. Wobei X eine Zufallsvariable und σ die Standardabweichung ist.

Formel 4.4 Standardisierung der Matrix

$$\frac{X - m}{\sigma}$$

Das Clustering erfolgte mit der Methode des durchschnittlichen Abstands (D; *unweighted group Average linkage*, UPGMA) der Probencluster A und B .

Formel 4.5 Durchschnittlicher Abstand nach UPGMA

$$D(A, B) := \frac{1}{(|A| + |B|)(|A| + |B|) - 1} \sum_{x, y \in A \cup B} d(x, y)$$

Wobei das Maß der Ähnlichkeit durch den Euklidischen Abstand bestimmt wurde. Hier werden die Funktionswerte der Matrix durch i und j beschrieben und p ist die Anzahl binärer Variablen.

Formel 4.6 Euklidische Abstand

$$\sqrt{\sum_{k=1}^p (x_{ik} - x_{jk})^2}$$

Das Clustering wurde nach Zeilen der Matrix, also in Abhängigkeit der Schwefelmassen durchgeführt. Die Variabilität der Abundanz der einzelnen Massen wird innerhalb der Analyse durch die Pearsonsche Korrelation wiedergegeben, welche sich direkt auf den euklidischen Abstand bezieht.

Formel 4.7 Pearsonsche Korrelation

$$\sqrt{\sum_{k=1}^p \frac{(x_{ik} - x_{jk})^2}{\sigma_k^2}}$$

Mit Hilfe der Profilsuche wurden aus der Clusteranalyse die Masse, welche zwischen den Probenclustern charakteristisch unterschiedlich waren selektiert. Hierzu wurde ein definiertes Profil angewendet. Das Profil selektierte alle Massen die Probencluster-abhängig verstärkt (*low-to-high*-Profil) bzw. reduziert (*high-to-low*-Profil) auftraten und eine Übereinstimmung mit dem Profil mit einem Pearsonschen Korrelationskoeffizienten von 0,9 aufwiesen.

4.2.19 Annotation organischer, molekularer Kompositionen zu Schwefelkandidatenmassen

Zur Charakterisierung der spezifisch abundanten Massen wurde eine Berechnung organischer Summenformeln mit der allgemeinen Zusammensetzung $C_{0-100}H_nN_{0-6}O_{0-80}P_{0-4}S_{1-3}$ mit Formulae 1.2 Megapeak (M. Frommberger, Bio-geochemie, Helmholtz Zentrum München) durchgeführt. Hierfür wurden die selektierten Kandidaten als Masselisten in das Programm geladen und die Summenformeln mit einer Varianz von 0,5 ppm ohne Abgleich mit der Stickstoffregel und ohne Isotopenprüfung berechnet. Die errechneten Summenformeln wurden Anschließend mit den „seven rules“ (siehe 1.2.2 und 2.3.3) auf deren realistische Existenz überprüft. Dazu wurden die molekularen Kompositionen der Formulae-Ausgabedateien in Summenformeln der Struktur $C_nH_nN_nO_nP_nS_n$ zusammengefasst und mit dem VBA-basierten Excel-Tool zur Prüfung der Regeln (http://fiehnlab.ucdavis.edu/projects/Seven_Golden_Rules/) ausgewertet. Schließlich wurden die existierenden Summenformeln selektiert und im Massenspektrum visuell anhand des mit der Summenformel korrelierenden Isotopenmusters verifiziert.

4.2.20 MS/MS-Fragmentierung

Die Fragmentierung ausgesuchter Ionen konnte innerhalb der ICR-FT/MS-Analyse durchgeführt werden. Die Parameter der Messung waren ein Massenbereich von 123-2000 m/z und einer Ionenakkumulationszeit von 10 ms.

Die zu fragmentierenden Ionen wurde im Massenspektrum isoliert und durch den Beschuss mit Argonatomen fragmentiert. Die Fragmentierung erfolgte mit einer kinetischen Energie der Argonatome von 5-15 eV. Das Fragmentierungsmuster wurde mit 20 akkumulierten Scans aufgezeichnet. Anhand von spezifischen Fragmenten konnten unter Umständen Rückschlüsse auf die Struktur oder funktionale Gruppen der Ausgangsverbindung gezogen werden (Saint Paul *et al.*, 2011).

4.2.21 Enzymatische Analyse von γ -Glutamylgruppen

Zu Analyse von γ -Glutamylgruppen in Metabolitextrakten aus *Arabidopsis*-Keimlingen wurden die Extrakte (siehe 4.2.14) bis zur Trockne abgeblasen und in 500 μ l 10 mM Tris-HCl, pH 8 aufgenommen. Anschließend wurden 100 μ l des Extrakts wurden mit gereinigter Pferde- γ -Glutamyltransferase (4×10^{-3} u) versetzt und für 2 h bei 37 °C inkubiert (Tate und Meister 1985). Als Kontrolle wurden Parallelansätze ohne Enzymzugabe sowie jeweils eine Nullwertkontrolle verwendet. Die Reaktionen wurden jeweils durch Zugabe von 10 % Ameisensäure zu einer Endkonzentration von 0,1 % gestoppt. Die Ansätze wurden bis zur Analyse bei -80 °C gelagert.

4.2.22 Behandlung von *Arabidopsis*-Keimlingen mit GGT-Inhibitoren

Zur Behandlung mit den GGT-Inhibitoren Acivicin und 6-Diazo-5-oxo-L-norleucin (DON) wurden Keimlinge auf Agar-verfestigtem Vollmedium für 7 Tage vorkultiviert (siehe 4.2.1). Die Inhibitoren wurden in Wasser mit einer Konzentration von 20 mM gelöst. Zur Exposition der Keimlinge mit Inhibitor wurde Agar-verfestigtes Vollmedium mit unterschiedlichen Konzentrationen der Inhibitoren versetzt (1-50 μ M). Die 7 Tage alten Keimlinge wurden auf das Inhibitormedium umgesetzt und für 7 Tage weiter kultiviert, schließlich standardmäßig geerntet und zur massenspektrometrischen Analyse aufgeschlossen.

4.2.23 Belastung von *Arabidopsis*-Keimlingen mit Cadmiumnitrat

Die Exposition von *Arabidopsis*-Keimlingen mit Cadmiumnitrat wurde in Flüssigkultur durchgeführt. Hierzu wurden die Keimlinge 14 Tage auf Agar-verfestigtem Medium vorkultiviert und schließlich in Flüssigkultur überführt (siehe 4.2.1). Die Flüssigkultur wurde mit einer Stammlösung von 100 mM

Cadmiumnitrat zu einer Endkonzentration von 200 μM versetzt. Die Keimlinge wurde für 4 h unter Dauerlicht auf dem Rundschüttler bei 100 upm weiter kultiviert und schließlich standardmäßig geerntet und zur massenspektrometrischen Analyse aufgeschlossen.

4.2.24 Verwendete Datenbanken und *online*-Ressourcen

- Selektion von *Arabidopsis*-assoziierten Schwefelverbindungen:

<http://kanaya.naist.jp/KNApSAcK/>

<http://metacyc.org/>

<http://www.plantcyc.org/>

<http://www.genome.jp/kegg/>

Annotation massenspektrometrischer Daten:

<http://masstrix3.helmholtz-muenchen.de/masstrix3/start.html>

<http://metlin.scripps.edu/index.php>

Annotation von Fragmentierungsdaten:

<http://spectra.psc.riken.jp/menta.cgi/index>

Chemische Substanzinformationen und Struktursuche:

<http://www.chemspider.com/>

Erstellen chemischer Strukturformeln:

<http://www.chemaxon.com/marvin/sketch/index.php>

Berechnung monoisotoper Massen:

<http://mods.rna.albany.edu/masspec/MoIE>

Design von Oligonukleotiden für T-DNA-Insertionslinien und RT-PCR-Analysen:

<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>

<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>

Informationen über genomische Sequenzen und T-DNA-Insertionslinien:

<http://www.arabidopsis.org/>

5 Zusammenfassung

Schwefel stellt ein essentielles Nährelement für alle Lebensformen dar. Schwefel vermittelt die Etablierung katalytischer und elektrochemischer Interaktionen und besitzt eine strukturbildende Funktion in Proteinen. Schwefel als solcher nimmt in Pflanzen etwa 0,1-1 % der Trockenmasse ein. Seine Bedeutung in Pflanzen ist vor allem geprägt durch deren Cysteinautotrophie. So bilden Pflanzen die Hauptquelle der Aminosäuren Cystein und Methionin für heterotrophe Organismen, insbesondere für Säugetiere. Der Weg des assimilatorischen Schwefelstoffwechsels in Pflanzen ist gut erforscht, dennoch sind viele Zusammenhänge des Netzwerks von Nährstoffmetabolismus und spezialisiertem Metabolismus nicht geklärt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erfolgreich eine Methode zur gezielten Analyse des Schwefelmetaboloms von Pflanzen etabliert. Hierzu wurden die Schwefelmetaboliten von *Arabidopsis thaliana in vivo* mit dem stabilen, schweren Schwefelisotop ^{34}S markiert und durch hochauflösende Massenspektrometrie von Keimlingsextrakten detektiert. Durch vergleichende Analysen von Keimlingsextrakten des natürlichen, leichten Schwefelisotops ^{32}S und dem schweren Isotop ^{34}S konnten gezielt die Schwefelmetaboliten bestimmt werden. Basierend auf der charakteristischen Verteilung der Abundanz der Schwefelisotope in den ^{34}S -markierten Extrakten wurde ein Algorithmus zur automatisierten Selektion der Schwefelmassen aus den Massenspektren entwickelt. Die Annotation bekannter Schwefelmetaboliten zu den selektierten Kandidaten gelang lediglich für ein Drittel der bestätigten, nicht-isomeren Schwefelmassen. Anhand dieser Daten ist zu erwarten, dass bislang weniger als die Hälfte der *Arabidopsis*-assoziierten Schwefelmetaboliten beschrieben wurden. Um solche unbekannt Metaboliten näher zu beschreiben und die zugrunde liegende Verbindung zu identifizieren erfordert es gezielte Strukturanalysen. Die Identifikation nicht beschriebener Verbindungen wird durch die Analyse von bekannten Stoffwechsellmutationen erleichtert. Diese Arbeit zeigt, dass die etablierten Methoden den Vergleich von genetischer Variabilität unterschiedlicher Pflanzen- und Zelllinien zur Ermittlung ihres charakteristischen Schwefelmetaboloms und ihres Einflusses auf ihren endogenen Schwefelmetabolismus ermöglichen. Hierbei wurden zahlreiche

Schwefelmassen gefunden, welche in einzelnen Pflanzenlinien eine spezifisch veränderte Abundanz zeigten. Beispielsweise konnten bei Funktionsverlust der γ -Glutamyltransferase, welche für den vakuolären Abbau von Glutathion-konjugaten verantwortlich ist, neue Kandidaten für Glutathion-konjugierte endogene Substanzen charakterisiert werden. In Mutanten der Genfamilie der Adenosin-Phosphosulfat-Kinasen, welche der Bereitstellung von PAPS für Sulfatierungsreaktionen dienen, wurden Hinweise auf eine Desulfatierung von Glucosinolaten gefunden. Außerdem lieferten Genvariationen im Glucosinolat-metabolismus Kandidaten für bislang unbeschriebenen Glucosinolate und Phytoalexine.

Basierend auf den vorliegenden Informationen sind die meisten, der im Rahmen dieser Arbeit charakterisierten Metaboliten, im spezialisierten Metabolismus von *Arabidopsis* einzuordnen und mutmaßlich an Prozessen der endogenen Entgiftung sowie der Pathogenabwehr beteiligt.

Die in dieser Arbeit etablierten Methoden stellen eine wichtige Grundlage für das Verständnis des Schwefelmetaboloms und der Charakterisierung unbekannter Verbindungen dar, welche die Aufklärung metabolischer Verknüpfungen und neuer Stoffwechselwege fördern werden.

6 Summary

Sulfur is an essential mineral nutrient for all forms of life. Sulfur mediates catalytical and electrochemical interactions and has a structural function in proteins. In plants sulfur comprises about 1 % of the dry matter. Due to their cysteine autotrophy plants are an important source of the amino acids cysteine and methionine for heterotrophic organisms, particularly mammals. The sulfur assimilatory pathway in plants is well described but the associated networks for nutrition and specialized metabolism are still poorly understood.

In this study a method for targeted analysis of the sulfur metabolome of plants was established. To this end sulfur metabolites were labeled *in vivo* with the stable, heavy sulfur isotope ^{34}S and were detected in the extracts of seedlings by high resolution mass spectrometry. By comparable analysis of seedling extracts labeled with both natural light ^{32}S and heavy ^{34}S isotopes the sulfur metabolites were selected from the mass spectra. Comparative analysis of the crude extracts of ^{32}S and ^{34}S labeled seedlings enable the specific determination of the sulfur metabolites. Based on the characteristic abundance of each sulfur isotope within the ^{34}S labeled sample an algorithm for automated selection of the sulfur masses from the mass spectra was developed. The annotation of known sulfur metabolites to the selected candidates was successful for only one third of the non-isomeric sulfur masses. This information leads to the conclusion that to date less than half of the sulfur metabolites in *Arabidopsis* are described. Further structural analyses are required for the characterization of such unknown metabolites and for an identification of the compounds. The identification of unknown metabolites is supported by the analysis of known mutations in metabolic pathways. This study shows that the established method enables the comparison of the genetic variation of plants and their specific sulfur metabolome and its influence on their endogenous sulfur metabolism. Numerous sulfur masses were found that showed specific alteration of abundance for the genotypes. For example loss of function of the γ -glutamyl transpeptidase that is responsible for the degradation of glutathione conjugates in the vacuole shows accumulation of new candidates for endogenous glutathione conjugated compounds. Mutants in the gene family of adenosine-phosphosulfate-kinases that supply PAPS for sulfation reactions

SUMMARY

indicate that glucosinolates can be desulfated due to PAPS starvation. Furthermore genetic variations in glucosinolate metabolism indicate that there are still undescribed glucosinolates and phytoalexins in *Arabidopsis*.

Based on the information gathered during this study most of the characterized metabolites can be placed in the specialized metabolism of *Arabidopsis* and are likely involved in processes of endogenous detoxification and pathogen defense.

The methods established in this study yield fundamental information for the understanding of the sulfur metabolome and the characterization of unknown compounds, which will support the elucidation of metabolic cross talk and of new metabolic pathways.

7 Literatur

Afendi, F.M., Okada, T., Yamazaki, M., Hirai-Morita, A., Nakamura, Y., Nakamura, K., Ikeda, S., Takahashi, H., Altaf-Ul-Amin, M., Darusman, L.K., Saito, K. and Kanaya, S. (2012). KNApSAcK family databases: integrated metabolite-plant species databases for multifaceted plant research. *Plant Cell Physiol.*, **53**. e1.

Agerbirk, N. and Olsen, C.E. (2012). Glucosinolate structures in evolution. *Phytochemistry*, **77**. 16–45.

Aharoni, A., Vos, R.C.H. de, Verhoeven, H.A., Maliepaard, C.A., Kruppa, G., Bino, R.J. and Goodenowe, D.B. (2002). Nontargeted metabolome analysis by use of Fourier Transform Ion Cyclotron Mass Spectrometry. *OMICS*, **6**. 217–234.

Ahuja, I., Kissen, R. and Bones, A.M. (2012). Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends Plant Sci.*, **17**. 73–90.

Akerboom, T.P., Bilzer, M. and Sies, H. (1982). Competition between transport of glutathione disulfide (GSSG) and glutathione S-conjugates from perfused rat liver into bile. *FEBS Lett.*, **140**. 73–76.

Alfenito, M.R., Souer, E., Goodman, C.D., Buell, R., Mol, J., Koes, R. and Walbot, V. (1998). Functional complementation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent glutathione S-transferases. *Plant Cell*, **10**. 1135–1149.

Allwood, J.W., Parker, D., Beckmann, M., Draper, J. and Goodacre, R. (2012). Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry for Plant Metabolite Profiling and Metabolite Identification, **860**. 157–176.

Altman, T., Travers, M., Kothari, A., Caspi, R. and Karp, P.D. (2013). A systematic comparison of the MetaCyc and KEGG pathway databases. *BMC Bioinformatics*, **14**. 112.

Amano, Y., Tsubouchi, H., Shinohara, H., Ogawa, M. and Matsubayashi, Y. (2007). Tyrosine-sulfated glycopeptide involved in cellular proliferation and expansion in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104**. 18333–18338.

Amir, R. (2010). Current understanding of the factors regulating methionine content in vegetative tissues of higher plants. *Amino Acids*, **39**. 917–931.

Andréasson, E., Bolt Jørgensen, L., Höglund, A.S., Rask, L. and Meijer, J. (2001). Different myrosinase and idioblast distribution in Arabidopsis and Brassica napus. *Plant Physiol.*, **127**. 1750–1763.

Andreasson, E., Taipalensuu, J., Rask, L. and Meijer, J. (1999). Age-dependent wound induction of a myrosinase-associated protein from oilseed rape (Brassica napus). *Plant Mol. Biol.*, **41**. 171–180.

AraCyc. Plant Metabolic Network, <http://www.plantcyc.org/>, **04.06.2014**.

Asres, D.D. and Perreault, H. (1997). Monosaccharide permethylation products for gas chromatography - mass spectrometry: how reaction conditions can influence isomeric ratios. *Can. J. Chem.*, **75**. 1385–1392.

Atkinson, H.J. and Babbitt, P.C. (2009). Glutathione transferases are structural and functional outliers in the thioredoxin fold. *Biochemistry*, **48**. 11108–11116.

Bais, P., Moon-Quanbeck, S.M., Nikolau, B.J. and Dickerson, J.A. (2012). Plantmetabolomics.org: mass spectrometry-based Arabidopsis metabolomics-database and tools update. *Nucleic Acids Res.*, **40**. D1216-20.

Baker, J.M., Hawkins, N.D., Ward, J.L., Lovegrove, A., Napier, J.A., Shewry, P.R. and Beale, M.H. (2006). A metabolomic study of substantial equivalence of field-grown genetically modified wheat. *Plant Biotechnol. J.*, **4**. 381–392.

Ball, L., Accotto, G.-P., Bechtold, U., Creissen, G., Funck, D., Jimenez, A., Kular, B., Leyland, N., Mejia-Carranza, J., Reynolds, H., Karpinski, S. and Mullineaux, P.M. (2004). Evidence for a direct link between glutathione biosynthesis and stress defense gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell*, **16**. 2448–2462.

Beck, A., Lenzian, K.J., Oven, M., Christmann, A. and Grill, E. (2003). Phytochelatin synthase catalyzes key step in turnover of glutathione conjugates. *Phytochemistry*, **62**. 423–431.

Bednarek, P. (2012). Sulfur-containing secondary metabolites from Arabidopsis thaliana and other Brassicaceae with function in plant immunity. *Chembiochem*, **13**. 1846–1859.

Bednarek, P., Pislewska-Bednarek, M., Svatoš, A., Schneider, B., Doubsky, J., Mansurova, M., Humphry, M., Consonni, C., Panstruga, R., Sanchez-Vallet, A., Molina, A. and Schulze-Lefert, P. (2009). A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense. *Science*, **323**. 101–106.

Benning, C. (1998). Biosynthesis and function of the sulfolipid sulfoquinovosyl diacylglycerol. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **49**. 53–75.

Berendt, U., Haverkamp, T., Prior, A. and Schwenn, J.D. (1995). Reaction mechanism of thioredoxin: 3'-phospho-adenylsulfate reductase investigated by site-directed mutagenesis. *Eur. J. Biochem.*, **233**. 347–356.

Bick, J.-A., Aslund, F., Chen, Y. and Leustek, T. (1998). Glutaredoxin function for the carboxyl-terminal domain of the plant-type 5'-adenylsulfate reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**. 8404–8409.

- Bindschedler, L.V., Palmblad, M. and Cramer, R.** (2008). Hydroponic isotope labelling of entire plants (HILEP) for quantitative plant proteomics; an oxidative stress case study. *Phytochemistry*, **69**. 1962–1972.
- Bino, R.J., Hall, R.D., Fiehn, O., Kopka, J., Saito, K., Draper, J., Nikolau, B.J., Mendes, P., Roessner-Tunali, U., Beale, M.H., Trethewey, R.N., Lange, B.M., Wurtele, E.S. and Sumner, L.W.** (2004). Potential of metabolomics as a functional genomics tool. *Trends Plant Sci*, **9**. 418–425.
- Blake-Kalff, M.M.A., Harrison, K.R., Hawkesford, M.J., Zhao, F.J. and McGrath, S.P.** (1998). Distribution of sulfur within oilseed rape leaves in response to sulfur deficiency during vegetative growth. *Plant Physiol.*, **118**. 1337–1344.
- Blanusa, M., Varnai, V.M., Piasek, M. and Kostial, K.** (2005). Chelators as antidotes of metal toxicity: therapeutic and experimental aspects. *Curr. Med. Chem.*, **12**. 2771–2794.
- Bleecker, A.B. and Kende, H.** (2000). Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **16**. 1–18.
- Blum, R., Beck, A., Korte, A., Stengel, A., Letzel, T., Lenzian, K.J. and Grill, E.** (2007). Function of phytochelatin synthase in catabolism of glutathione-conjugates. *Plant J*, **49**. 740–749.
- Blum, R., Meyer, K.C., Wünschmann, J., Lenzian, K.J. and Grill, E.** (2010). Cytosolic action of phytochelatin synthase. *Plant Physiol*, **153**. 159–169.
- Böcker, S. and Rasche, F.** (2008). Towards de novo identification of metabolites by analyzing tandem mass spectra. *Bioinformatics*, **24**. i49-i55.
- Bones, A.M. and Rossiter, J.T.** (1996). The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry. *Physiol Plant*, **97**. 194–208.
- Borevitz, J.O., Liang, D., Plouffe, D., Chang, H.-S., Zhu, T., Weigel, D., Berry, C.C., Winzeler, E. and Chory, J.** (2003a). Large-scale identification of single-feature polymorphisms in complex genomes. *Genome Res.*, **13**. 513–523.
- Böttcher, C., Westphal, L., Schmotz, C., Prade, E., Scheel, D. and Glawischnig, E.** (2009). The multifunctional enzyme CYP71B15 (PHYTOALEXIN DEFICIENT3) converts cysteine-indole-3-acetonitrile to camalexin in the indole-3-acetonitrile metabolic network of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **21**. 1830–1845.
- Bowen, B.P. and Northen, T.R.** (2010). Dealing with the unknown: metabolomics and metabolite atlases. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **21**. 1471–1476.

- Brazier-Hicks, M., Evans, K.M., Cunningham, O.D., Hodgson, D.R.W., Steel, P.G. and Edwards, R.** (2008). Catabolism of glutathione conjugates in *Arabidopsis thaliana*. Role in metabolic reactivation of the herbicide safener fenclorim. *J. Biol. Chem*, **283**. 21102–21112.
- 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.
- Buchanan, B.B. and Balmer, Y.** (2005). Redox regulation: a broadening horizon. *Annu Rev Plant Biol*, **56**. 187–220.
- Buchner, P., Takahashi, H. and Hawkesford, M.J.** (2004). Plant sulphate transporters: co-ordination of uptake, intracellular and long-distance transport. *J. Exp. Bot.*, **55**. 1765–1773.
- Burns, J., Yokota, T., Ashihara, H., Lean, M.E.J. and Crozier, A.** (2002). Plant Foods and Herbal Sources of Resveratrol. *J. Agric. Food Chem.*, **50**. 3337–3340.
- Cairns, N.G., Pasternak, M., Wachter, A., Cobbett, C.S. and Meyer, A.J.** (2006). Maturation of *Arabidopsis* seeds is dependent on glutathione biosynthesis within the embryo. *Plant Physiol.*, **141**. 446–455.
- Calderwood, A. and Kopriva, S.** (2014). Hydrogen sulfide in plants: From dissipation of excess sulfur to signaling molecule. *Nitric Oxide*.
- Calvin, M. and Benson, A.A.** (1948). The Path of Carbon in Photosynthesis. *Science*, **107**. 476–480.
- Cantrell, C.L., Dayan, F.E. and Duke, S.O.** (2012). Natural products as sources for new pesticides. *J. Nat. Prod.*, **75**. 1231–1242.
- Cao, M.-J., Wang, Z., Wirtz, M., Hell, R., Oliver, D.J. and Xiang, C.-B.** (2013). SULTR3;1 is a chloroplast-localized sulfate transporter in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **73**. 607–616.
- Catchpole, G.S., Beckmann, M., Enot, D.P., Mondhe, M., Zywicki, B., Taylor, J., Hardy, N., Smith, A., King, R.D., Kell, D.B., Fiehn, O. and Draper, J.** (2005). Hierarchical metabolomics demonstrates substantial compositional similarity between genetically modified and conventional potato crops. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**. 14458–14462.
- Cazalé, A.-C. and Clemens, S.** (2001). *Arabidopsis thaliana* expresses a second functional phytochelatase synthase. *FEBS Lett*, **507**. 215–219.
- Chaneton, B., Hillmann, P., Zheng, L., Martin, A.C.L., Maddocks, O.D.K., Chokkathukalam, A., Coyle, J.E., Jankevics, A., Holding, F.P., Vousden, K.H., Frezza, C., O'Reilly, M. and Gottlieb, E.** (2012). Serine is a natural ligand and allosteric activator of pyruvate kinase M2. *Nature*, **491**. 458–462. MarvinSketch. ChemAxon, <http://www.chemaxon.com/marvin/sketch/index.php>.

ChemSpider. Royal Society of Chemistry, <http://www.chemspider.com/>, 16.06.2014.

Chen, S., Glawischnig, E., Jørgensen, K., Naur, P., Jørgensen, B., Olsen, C.-E., Hansen, C.H., Rasmussen, H., Pickett, J.A. and Halkier, B.A. (2003). CYP79F1 and CYP79F2 have distinct functions in the biosynthesis of aliphatic glucosinolates in Arabidopsis. *Plant J.*, **33**. 923–937.

Chen, W., Zhao, Y., Seefeldt, T. and Guan, X. (2008). Determination of thiols and disulfides via HPLC quantification of 5-thio-2-nitrobenzoic acid. *J Pharm Biomed Anal*, **48**. 1375–1380.

Chiba, Y., Sakurai, R., Yoshino, M., Ominato, K., Ishikawa, M., Onouchi, H. and Naito, S. (2003). S-adenosyl-L-methionine is an effector in the posttranscriptional autoregulation of the cystathionine gamma-synthase gene in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**. 10225–10230.

Chokkathukalam, A., Kim, D.-H., Barrett, M.P., Breitling, R. and Creek, D.J. (2014). Stable isotope-labeling studies in metabolomics: new insights into structure and dynamics of metabolic networks. *Bioanalysis*, **6**. 511–524.

Clay, N.K., Adio, A.M., Denoux, C., Jander, G. and Ausubel, F.M. (2009). Glucosinolate metabolites required for an Arabidopsis innate immune response. *Science*, **323**. 95–101.

Cobbett, C. and Goldsbrough, P. (2002). Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol*, **53**. 159–182.

Cobbett, C.S. (2000). Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol*, **123**. 825–832.

Cobbett, C.S., May, M.J., Howden, R. and Rolls, B. (1998). The glutathione-deficient, cadmium-sensitive mutant, *cad2-1*, of Arabidopsis thaliana is deficient in gamma-glutamylcysteine synthetase. *Plant J*, **16**. 73–78.

Cole, R.A. (1976). Isothiocyanates, nitriles and thiocyanates as products of autolysis of glucosinolates in Cruciferae. *Phytochemistry*, **15**. 759–762.

Cornish-Bowden, A. and Cárdenas, M.L. (2000). From genome to cellular phenotype--a role for metabolic flux analysis? *Nat. Biotechnol.*, **18**. 267–268.

Cotgreave, I.A. and Moldéus, P. (1986). Methodologies for the application of monobromobimane to the simultaneous analysis of soluble and protein thiol components of biological systems. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **13**. 231–249.

Creek, D.J., Chokkathukalam, A., Jankevics, A., Burgess, K.E.V., Breitling, R. and Barrett, M.P. (2012). Stable isotope-assisted metabolomics for network-wide metabolic pathway elucidation. *Anal. Chem.*, **84**. 8442–8447.

Cummins, I., Dixon, D.P., Freitag-Pohl, S., Skipsey, M. and Edwards, R. (2011). Multiple roles for plant glutathione transferases in xenobiotic detoxification. *Drug Metab. Rev*, **43**. 266–280.

Cummins, I., O'Hagan, D., Jablonkai, I., Cole, D.J., Hehn, A., Werck-Reichhart, D. and Edwards, R. (2003). Cloning, characterization and regulation of a family of phi class glutathione transferases from wheat. *Plant Mol. Biol.*, **52**. 591–603.

Davoine, C., Falletti, O., Douki, T., Iacazio, G., Ennar, N., Montillet, J.-L. and Triantaphylidès, C. (2006). Adducts of oxylipin electrophiles to glutathione reflect a 13 specificity of the downstream lipoxygenase pathway in the tobacco hypersensitive response. *Plant Physiol.*, **140**. 1484–1493.

Diaz Vivancos, P., Wolff, T., Markovic, J., Pallardó, F.V. and Foyer, C.H. (2010). A nuclear glutathione cycle within the cell cycle. *Biochem. J.*, **431**. 169–178.

Dixon, D.P., Cole, D.J. and Edwards, R. (1999). Dimerisation of maize glutathione transferases in recombinant bacteria. *Plant Mol. Biol.*, **40**. 997–1008.

Dixon, D.P. and Edwards, R. (2010a). Glutathione transferases. *Arabidopsis Book*, **8**. e0131.

Dixon, D.P., Hawkins, T., Hussey, P.J. and Edwards, R. (2009). Enzyme activities and subcellular localization of members of the Arabidopsis glutathione transferase superfamily. *J. Exp. Bot*, **60**. 1207–1218.

Dixon, D.P., Laphorn, A., Madesis, P., Mudd, E.A., Day, A. and Edwards, R. (2008). Binding and glutathione conjugation of porphyrinogens by plant glutathione transferases. *J. Biol. Chem*, **283**. 20268–20276.

Dixon, D.P., Skipsey, M. and Edwards, R. (2010b). Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, **71**. 338–350.

Dixon, R.A. and Strack, D. (2003). Phytochemistry meets genome analysis, and beyond. *Phytochemistry*, **62**. 815–816.

Draper, J., Enot, D.P., Parker, D., Beckmann, M., Snowdon, S., Lin, W. and Zubair, H. (2009). Metabolite signal identification in accurate mass metabolomics data with MZedDB, an interactive m/z annotation tool utilising predicted ionisation behaviour 'rules'. *BMC Bioinformatics*, **10**. 227.

Dunn, W.B., Bailey, N.J.C. and Johnson, H.E. (2005). Measuring the metabolome: current analytical technologies. *Analyst*, **130**. 606–625.

Dunn, W.B., Erban, A., Weber, R.J.M., Creek, D.J., Brown, M., Breitling, R., Hankemeier, T., Goodacre, R., Neumann, S., Kopka, J. and Viant, M.R. (2013). Mass appeal: metabolite identification in mass spectrometry-focused untargeted metabolomics. *Metabolomics*, **9**. 44–66.

- Edwards, R. and Dixon, D.P.** (2005). Plant glutathione transferases. *Meth. Enzymol.*, **401**. 169–186.
- Eisenreich, W. and Bacher, A.** (2007). Advances of high-resolution NMR techniques in the structural and metabolic analysis of plant biochemistry. *Phytochemistry*, **68**. 2799–2815.
- Ellman, G.L.** (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys*, **82**. 70–77.
- Entner, N. and Dourdoroff, M.** (1952). Glucose and gluconic acid oxidation of *Pseudomonas saccharophila*. *J. Biol. Chem.*, **196**. 853–862.
- Fahey, J.W., Zalcmann, A.T. and Talalay, P.** (2001). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, **56**. 5–51.
- Fahey, R.C.** (2001). Novel thiols of prokaryotes. *Annu. Rev. Microbiol.*, **55**. 333–356.
- Fan, T.W.M., Lane, A.N., Higashi, R.M., Farag, M.A., Gao, H., Bousamra, M. and Miller, D.M.** (2009). Altered regulation of metabolic pathways in human lung cancer discerned by (13)C stable isotope-resolved metabolomics (SIRM). *Mol. Cancer*, **8**. 41.
- Farnsworth, N.R.** (1988). Screening Plants for New Medicines. In *Biodiversity*. (Wilson EO, P.F.M., ed.). Washington (DC).
- Faulkner, I.J. and Rubery, P.H.** (1992). Flavonoids and flavonoid sulphates as probes of auxin-transport regulation in *Cucurbita pepo* hypocotyl segments and vesicles. *Planta*, **186**. 618–625.
- Fernie, A.R. and Schauer, N.** (2009). Metabolomics-assisted breeding: a viable option for crop improvement? *Trends Genet.*, **25**. 39–48.
- Fiehn, O.** (2002). Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol. Biol.*, **48**. 155–171.
- Fiehn, O., Kloska, S. and Altmann, T.** (2001). Integrated studies on plant biology using multiparallel techniques. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **12**. 82–86.
- Fiehn, O., Kopka, J., Dörmann, P., Altmann, T., Trethewey, R.N. and Willmitzer, L.** (2000). Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nat. Biotechnol.*, **18**. 1157–1161.
- Fishbane, S., Durham, J.H., Marzo, K. and Rudnick, M.** (2004). N-acetylcysteine in the prevention of radiocontrast-induced nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **15**. 251–260.
- Foyer, C.H. and Noctor, G.** (2009). Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid. Redox Signal*, **11**. 861–905.

Foyer, C.H. and Noctor, G. (2011). Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiol.*, **155**. 2–18.

Foyer, C.H., Theodoulou, F.L. and Delrot, S. (2001). The functions of inter- and intracellular glutathione transport systems in plants. *Trends Plant Sci.*, **6**. 486–492.

Frendo, P., Jiménez, M.J., Mathieu, C., Duret, L., Gallesi, D., van de Sype, G., Hérouart, D. and Puppo, A. (2001). A *Medicago truncatula* homoglutathione synthetase is derived from glutathione synthetase by gene duplication. *Plant Physiol.*, **126**. 1706–1715.

Fujibuchi, W., Goto, S., Migimatsu, H., Uchiyama, I., Ogiwara, A., Akiyama, Y. and Kanehisa, M. (1998). DBGET/LinkDB: an integrated database retrieval system. *Pac Symp Biocomput.* 683–694.

Fukusaki, E., Jumtee, K., Bamba, T., Yamaji, T. and Kobayashi, A. (2006). Metabolic fingerprinting and profiling of *Arabidopsis thaliana* leaf and its cultured cells T87 by GC/MS. *Z. Naturforsch., C, J. Biosci.*, **61**. 267–272.

Geu-Flores, F., Møldrup, M.E., Böttcher, C., Olsen, C.E., Scheel, D. and Halkier, B.A. (2011). Cytosolic γ -glutamyl peptidases process glutathione conjugates in the biosynthesis of glucosinolates and camalexin in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **23**. 2456–2469.

Geu-Flores, F., Nielsen, M.T., Nafisi, M., Møldrup, M.E., Olsen, C.E., Motawia, M.S. and Halkier, B.A. (2009). Glucosinolate engineering identifies a gamma-glutamyl peptidase. *Nat. Chem. Biol.*, **5**. 575–577.

Giavalisco, P., Hummel, J., Lisec, J., Inostroza, A.C., Catchpole, G.S. and Willmitzer, L. (2008). High-resolution direct infusion-based mass spectrometry in combination with whole ^{13}C metabolome isotope labeling allows unambiguous assignment of chemical sum formulas. *Anal. Chem.*, **80**. 9417–9425.

Giavalisco, P., Köhl, K., Hummel, J., Seiwert, B. and Willmitzer, L. (2009). ^{13}C isotope-labeled metabolomes allowing for improved compound annotation and relative quantification in liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolomic research. *Anal. Chem.*, **81**. 6546–6551.

Giavalisco, P., Li, Y., Matthes, A., Eckhardt, A., Hubberten, H.-M., Hesse, H., Segu, S., Hummel, J., Köhl, K. and Willmitzer, L. (2011). Elemental formula annotation of polar and lipophilic metabolites using (^{13}C) , (^{15}N) and (^{34}S) isotope labelling, in combination with high-resolution mass spectrometry. *Plant J*, **68**. 364–376.

Gidda, S.K., Miersch, O., Levitin, A., Schmidt, J., Wasternack, C. and Varin, L. (2003). Biochemical and molecular characterization of a hydroxyjasmonate sulfotransferase from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.*, **278**. 17895–17900.

Gigolashvili, T., Berger, B., Mock, H.-P., Müller, C., Weisshaar, B. and Flügge, U.-I. (2007). The transcription factor HIG1/MYB51 regulates indolic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **50**. 886–901.

Gigolashvili, T., Engqvist, M., Yatusевич, R., Müller, C. and Flügge, U.-I. (2008). HAG2/MYB76 and HAG3/MYB29 exert a specific and coordinated control on the regulation of aliphatic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.*, **177**. 627–642.

Gigolashvili, T., Geier, M., Ashykhmina, N., Frerigmann, H., Wulfert, S., Krueger, S., Mugford, S.G., Kopriva, S., Haferkamp, I. and Flügge, U.-I. (2012). The *Arabidopsis* thylakoid ADP/ATP carrier TAAC has an additional role in supplying plastidic phosphoadenosine 5'-phosphosulfate to the cytosol. *Plant Cell*, **24**. 4187–4204.

Giovanelli, J., Mudd, S.H. and Datko, A.H. (1985). In vivo regulation of de novo methionine biosynthesis in a higher plant (*lemna*). *Plant Physiol.*, **77**. 450–455.

Gläser, K., Kanawati, B., Kubo, T., Schmitt-Kopplin, P. and Grill, E. (2014). Exploring the *Arabidopsis* sulfur metabolome. *Plant J.*, **77**. 31–45.

Glawischnig, E. (2007). Camalexin. *Phytochemistry*, **68**. 401–406.

Glawischnig, E., Hansen, B.G., Olsen, C.E. and Halkier, B.A. (2004). Camalexin is synthesized from indole-3-acetaldoxime, a key branching point between primary and secondary metabolism in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**. 8245–8250.

Goda, H., Sasaki, E., Akiyama, K., Maruyama-Nakashita, A., Nakabayashi, K., Li, W., Ogawa, M., Yamauchi, Y., Preston, J., Aoki, K., Kiba, T., Takatsuto, S., Fujioka, S., Asami, T., Nakano, T., Kato, H., Mizuno, T., Sakakibara, H., Yamaguchi, S., Nambara, E., Kamiya, Y., Takahashi, H., Hirai, M.Y., Sakurai, T., Shinozaki, K., Saito, K., Yoshida, S. and Shimada, Y. (2008). The AtGenExpress hormone and chemical treatment data set: experimental design, data evaluation, model data analysis and data access. *Plant J.*, **55**. 526–542.

Goodacre, R. (2005). Metabolomics shows the way to new discoveries. *Genome Biol.*, **6**. 354.

Goto, S., Bono, H., Ogata, H., Fujibuchi, W., Nishioka, T., Sato, K. and Kanehisa, M. (1997). Organizing and computing metabolic pathway data in terms of binary relations. *Pac Symp Biocomput.* 175–186.

Goto, S., Nishioka, T. and Kanehisa, M. (1998). LIGAND: chemical database for enzyme reactions. *Bioinformatics*, **14**. 591–599.

Goto, S., Nishioka, T. and Kanehisa, M. (2000). LIGAND: chemical database of enzyme reactions. *Nucleic Acids Res.*, **28**. 380–382.

Grant, K., Carey, N.M., Mendoza, M., Schulze, J., Pilon, M., Pilon-Smits, E.A.H. and van Hoewyk, D. (2011). Adenosine 5'-phosphosulfate reductase (APR2) mutation in Arabidopsis implicates glutathione deficiency in selenate toxicity. *Biochem. J.*, **438**. 325–335.

Grill, E., Löffler, S., Winnacker, E.L. and Zenk, M.H. (1989). Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific gamma-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**. 6838–6842.

Grill, E., Winnacker, E.L. and Zenk, M.H. (1987). Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**. 439–443.

Grob, K. and Matile, P. (1980). Capillary GC of glucosinolate-derived horseradish constituents. *Phytochemistry*, **19**. 1789–1793.

Gruhler, A., Schulze, W.X., Matthiesen, R., Mann, M. and Jensen, O.N. (2005). Stable isotope labeling of Arabidopsis thaliana cells and quantitative proteomics by mass spectrometry. *Mol. Cell Proteomics*, **4**. 1697–1709.

Grzam, A., Martin, M.N., Hell, R. and Meyer, A.J. (2007). gamma-Glutamyl transpeptidase GGT4 initiates vacuolar degradation of glutathione S-conjugates in Arabidopsis. *FEBS Lett*, **581**. 3131–3138.

Grzam, A., Tennstedt, P., Clemens, S., Hell, R. and Meyer, A.J. (2006). Vacuolar sequestration of glutathione S-conjugates outcompetes a possible degradation of the glutathione moiety by phytochelatin synthase. *FEBS Lett*, **580**. 6384–6390.

Gutierrez-Marcos, J.F., Roberts, M.A., Campbell, E.I. and Wray, J.L. (1996). Three members of a novel small gene-family from Arabidopsis thaliana able to complement functionally an Escherichia coli mutant defective in PAPS reductase activity encode proteins with a thioredoxin-like domain and "APS reductase" activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**. 13377–13382.

Haag, A.F., Kerscher, B., Dall'Angelo, S., Sani, M., Longhi, R., Baloban, M., Wilson, H.M., Mergaert, P., Zanda, M. and Ferguson, G.P. (2012). Role of cysteine residues and disulfide bonds in the activity of a legume root nodule-specific, cysteine-rich peptide. *J. Biol. Chem.*, **287**. 10791–10798.

Halkier, B.A. and Du, L. (1997). The biosynthesis of glucosinolates. *Trends in Plant Science*, **2**. 425–431.

Halkier, B.A. and Gershenzon, J. (2006). Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu Rev Plant Biol*, **57**. 303–333.

Hall, R., Beale, M., Fiehn, O., Hardy, N., Sumner, L. and Bino, R. (2002). Plant metabolomics: the missing link in functional genomics strategies. *Plant Cell*, **14**. 1437–1440.

Hall, R.D. (2006). Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. *New Phytol*, **169**. 453–468.

Hansen, C.H., Wittstock, U., Olsen, C.E., Hick, A.J., Pickett, J.A. and Halkier, B.A. (2001). Cytochrome p450 CYP79F1 from arabidopsis catalyzes the conversion of dihomomethionine and trihomomethionine to the corresponding aldoximes in the biosynthesis of aliphatic glucosinolates. *J. Biol. Chem.*, **276**. 11078–11085.

Harmer, S.L., Hogenesch, J.B., Straume, M., Chang, H.S., Han, B., Zhu, T., Wang, X., Kreps, J.A. and Kay, S.A. (2000). Orchestrated transcription of key pathways in Arabidopsis by the circadian clock. *Science*, **290**. 2110–2113.

Hartmann, T. (2008). The lost origin of chemical ecology in the late 19th century. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **105**. 4541–4546.

Hartman, S.C. and Stochaj, E.M. (1973). Glutaminase A of Escherichia coli. Subunit structure and cooperative behavior. *J. Biol. Chem.*, **248**. 8511–8517.

Ha, S.-B., Smith, A.P., Howden, R., Dietrich, W.M., Bugg, S., O'Connell, M.J., Goldsbrough, P.B. and Cobbett, C.S. (1999). Phytochelatin synthase genes from Arabidopsis and the yeast Schizosaccharomyces pombe. *Plant Cell*, **11**. 1153–1164.

Hatzfeld, Y., Lee, S., Lee, M., Leustek, T. and Saito, K. (2000). Functional characterization of a gene encoding a fourth ATP sulfurylase isoform from Arabidopsis thaliana. *Gene*, **248**. 51–58.

Hawkesford, M.J. (2003). Transporter gene families in plants: the sulphate transporter gene family - redundancy or specialization? *Physiol Plant*, **117**. 155–163.

Hawkesford, M.J. and Kok, L.J. de (2006). Managing sulphur metabolism in plants. *Plant Cell Environ.*, **29**. 382–395.

HCE 3.5, <http://www.cs.umd.edu/hcil/hce/>, **13.08.2014**.

Heeg, C., Kruse, C., Jost, R., Gutensohn, M., Ruppert, T., Wirtz, M. and Hell, R. (2008). Analysis of the Arabidopsis O-acetylserine(thiol)lyase gene family demonstrates compartment-specific differences in the regulation of cysteine synthesis. *Plant Cell*, **20**. 168–185.

Hegeman, A.D., Schulte, C.F., Cui, Q., Lewis, I.A., Huttlin, E.L., Eghbalnia, H., Harms, A.C., Ulrich, E.L., Markley, J.L. and Sussman, M.R. (2007). Stable Isotope Assisted Assignment of Elemental Compositions for Metabolomics. *Anal. Chem.*, **79**. 6912–6921.

Hell, R. and Wirtz, M. (2011). Molecular Biology, Biochemistry and Cellular Physiology of Cysteine Metabolism in Arabidopsis thaliana. *Arabidopsis Book*, **9**. e0154.

Herschbach, C., Gessler, A. and Rennenberg, H. (2012). Long-Distance Transport and Plant Internal Cycling of N- and S-Compounds. *Progress in Botany*, **73**. 161–188.

Hirai, M.Y., Fujiwara, T., Awazuhara, M., Kimura, T., Noji, M. and Saito, K. (2003). Global expression profiling of sulfur-starved Arabidopsis by DNA macroarray reveals the role of O-acetyl-L-serine as a general regulator of gene expression in response to sulfur nutrition. *Plant J*, **33**. 651–663.

Hirai, M.Y., Klein, M., Fujikawa, Y., Yano, M., Goodenowe, D.B., Yamazaki, Y., Kanaya, S., Nakamura, Y., Kitayama, M., Suzuki, H., Sakurai, N., Shibata, D., Tokuhisa, J., Reichelt, M., Gershenzon, J., Papenbrock, J. and Saito, K. (2005). Elucidation of gene-to-gene and metabolite-to-gene networks in Arabidopsis by integration of metabolomics and transcriptomics. *J. Biol. Chem*, **280**. 25590–25595.

Hirai, M.Y., Sugiyama, K., Sawada, Y., Tohge, T., Obayashi, T., Suzuki, A., Araki, R., Sakurai, N., Suzuki, H., Aoki, K., Goda, H., Nishizawa, O.I., Shibata, D. and Saito, K. (2007). Omics-based identification of Arabidopsis Myb transcription factors regulating aliphatic glucosinolate biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, **104**. 6478–6483.

Hirai, M.Y. and Saito, K. (2004a). Post-genomics approaches for the elucidation of plant adaptive mechanisms to sulphur deficiency. *J. Exp. Bot*, **55**. 1871–1879.

Hirai, M.Y., Yano, M., Goodenowe, D.B., Kanaya, S., Kimura, T., Awazuhara, M., Arita, M., Fujiwara, T. and Saito, K. (2004b). Integration of transcriptomics and metabolomics for understanding of global responses to nutritional stresses in Arabidopsis thaliana. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, **101**. 10205–10210.

Hoagland, D.R. and Arnon, D.I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station, Circular*.

Howarth, J.R., Domínguez-Solís, J.R., Gutiérrez-Alcalá, G., Wray, J.L., Romero, L.C. and Gotor, C. (2003). The serine acetyltransferase gene family in Arabidopsis thaliana and the regulation of its expression by cadmium. *Plant Mol. Biol.*, **51**. 589–598.

Howarth, J.R., Parmar, S., Barraclough, P.B. and Hawkesford, M.J. (2009). A sulphur deficiency-induced gene, *sdi1*, involved in the utilization of stored sulphate pools under sulphur-limiting conditions has potential as a diagnostic indicator of sulphur nutritional status. *Plant Biotechnol. J.*, **7**. 200–209.

Howden, R., Andersen, C.R., Goldsbrough, P.B. and Cobbett, C.S. (1995). A cadmium-sensitive, glutathione-deficient mutant of Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol.*, **107**. 1067–1073.

- Hsieh, C.-L., Yeh, K.-W., Kok, L.J. de, Pan, R.-N., Kuo, Y.-H. and Tseng, M.-H.** (2012). Simultaneous Determination of Sulphur metabolites in *Arabidopsis thaliana* via LC-ESI-MS/MS and (34) S-metabolic Labelling. *Phytochem Anal*, **23**. 324–331.
- Huang, X., Chen, Y.-J., Cho, K., Nikolskiy, I., Crawford, P.A. and Patti, G.J.** (2014). X 13 CMS: Global Tracking of Isotopic Labels in Untargeted Metabolomics. *Anal. Chem.*, **86**. 1632–1639.
- Huie, C.W.** (2002). A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Anal Bioanal Chem*, **373**. 23–30.
- Hull, A.K., Vij, R. and Celenza, J.L.** (2000). *Arabidopsis* cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**. 2379–2384.
- Iijima, Y., Nakamura, Y., Ogata, Y., Tanaka, K., Sakurai, N., Suda, K., Suzuki, T., Suzuki, H., Okazaki, K., Kitayama, M., Kanaya, S., Aoki, K. and Shibata, D.** (2008). Metabolite annotations based on the integration of mass spectral information. *Plant J.*, **54**. 949–962.
- ImageJ**, <http://imagej.nih.gov/ij/index.html>, **13.08.2014**.
- Izawa, T., Takahashi, Y. and Yano, M.** (2003). Comparative biology comes into bloom: genomic and genetic comparison of flowering pathways in rice and *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **6**. 113–120.
- Jacob Claus** (2006). A scent of therapy: pharmacological implications of natural products containing redox-active sulfur atoms. *Nat Prod Rep*, **23**. 851–863.
- Jander, G. and Joshi, V.** (2009). Aspartate-Derived Amino Acid Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis Book*, **7**. e0121.
- Janz, D., Behnke, K., Schnitzler, J.-P., Kanawati, B., Schmitt-Kopplin, P. and Polle, A.** (2010). Pathway analysis of the transcriptome and metabolome of salt sensitive and tolerant poplar species reveals evolutionary adaptation of stress tolerance mechanisms. *BMC Plant Biol.*, **10**. 150.
- MoIE. Jef Rozenski, <http://mods.rna.albany.edu/masspec/MoIE>, **13.08.2014**.
- Jez, J.M., Cahoon, R.E. and Chen, S.** (2004). *Arabidopsis thaliana* glutamate-cysteine ligase: functional properties, kinetic mechanism, and regulation of activity. *J. Biol. Chem.*, **279**. 33463–33470.
- Jobe, T.O., Sung, D.-Y., Akmakjian, G.Z., Pham, A., Komives, E.A., Mendoza-Cózatl, D.G. and Schroeder, J.I.** (2012). Feedback inhibition by thiols outranks glutathione depletion: a luciferase-based screen reveals glutathione-deficient γ -ECS and glutathione synthetase mutants impaired in cadmium-induced sulfate assimilation. *Plant J*, **70**. 783–795.

Jones, M.G., Hughes, J., Tregova, A., Milne, J., Tomsett, A.B. and Collin, H.A. (2004). Biosynthesis of the flavour precursors of onion and garlic. *J. Exp. Bot.*, **55**. 1903–1918.

Jones-Mortimer, M.C. (1968). Positive control of sulphate reduction in *Escherichia coli*. Isolation, characterization and mapping of cysteineless mutants of *E. coli* K12. *Biochem. J.*, **110**. 589–595.

Jost, R., Berkowitz, O., Wirtz, M., Hopkins, L., Hawkesford, M.J. and Hell, R. (2000). Genomic and functional characterization of the *oas* gene family encoding O-acetylserine (thiol) lyases, enzymes catalyzing the final step in cysteine biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, **253**. 237–247.

Kanawati, B., Saint Paul, V. von, Herrmann, C., Schäffner, A.R. and Schmitt-Kopplin, P. (2011). Mass spectrometric stereoisomeric differentiation between α - and β -ascorbic acid 2-O-glucosides. Experimental and density functional theory study. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **25**. 806–814.

Kanehisa, M. (1997). A database for post-genome analysis. *Trends Genet.*, **13**. 375–376.

Kanehisa, M. and Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.*, **28**. 27–30.

Kanehisa, M., Goto, S., Furumichi, M., Tanabe, M. and Hiraoka, M. (2010). KEGG for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs. *Nucleic Acids Res.*, **38**. D355-60.

Kawashima, C.G., Matthewman, C.A., Huang, S., Lee, B.-R., Yoshimoto, N., Koprivova, A., Rubio-Somoza, I., Todesco, M., Rathjen, T., Saito, K., Takahashi, H., Dalmay, T. and Kopriva, S. (2011). Interplay of SLIM1 and miR395 in the regulation of sulfate assimilation in *Arabidopsis*. *Plant J.*, **66**. 863–876.

Kawashima, C.G., Yoshimoto, N., Maruyama-Nakashita, A., Tsuchiya, Y.N., Saito, K., Takahashi, H. and Dalmay, T. (2009). Sulphur starvation induces the expression of microRNA-395 and one of its target genes but in different cell types. *Plant J.*, **57**. 313–321.

KEGG. Kanehisa Laboratories, <http://www.genome.jp/kegg/>, **16.06.2014**.

Khan, M.S., Haas, F.H., Samami, A.A., Gholami, A.M., Bauer, A., Fellenberg, K., Reichelt, M., Hänsch, R., Mendel, R.R., Meyer, A.J., Wirtz, M. and Hell, R. (2010). Sulfite reductase defines a newly discovered bottleneck for assimilatory sulfate reduction and is essential for growth and development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **22**. 1216–1231.

Khater, F., Fournand, D., Vialet, S., Meudec, E., Cheynier, V. and Terrier, N. (2012). Identification and functional characterization of cDNAs coding for hydroxybenzoate/hydroxycinnamate glucosyltransferases co-expressed with genes related to proanthocyanidin biosynthesis. *J. Exp. Bot.*, **63**. 1201–1214.

Kiefer, P., Portais, J.-C. and Vorholt, J.A. (2008). Quantitative metabolome analysis using liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, **382**. 94–100.

Kim, H.K. and Verpoorte, R. (2010). Sample preparation for plant metabolomics. *Phytochem Anal*, **21**. 4–13.

Kim, J. and Leustek, T. (2000). Repression of cystathionine γ -synthase in *Arabidopsis thaliana* produces partial methionine auxotrophy and developmental abnormalities. *Plant Science*, **151**. 9–18.

Kind, T. and Fiehn, O. (2006). Metabolomic database annotations via query of elemental compositions: mass accuracy is insufficient even at less than 1 ppm. *BMC Bioinformatics*, **7**. 234.

Kind, T. and Fiehn, O. (2007). Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry. *BMC Bioinformatics*, **8**. 105.

Kind, T. and Fiehn, O. (2010). Advances in structure elucidation of small molecules using mass spectrometry. *Bioanal Rev*, **2**. 23–60.

Klapheck, S., Chrost, B., Starke, J. and Zimmermann, H. (1992). γ -Glutamylcysteinylserine - A New Homologue of Glutathione in Plants of the Family Poaceae*. *Botanica Acta*, **105**. 174–179.

Klein, M. and Papenbrock, J. (2004). The multi-protein family of *Arabidopsis* sulphotransferases and their relatives in other plant species. *J. Exp. Bot.*, **55**. 1809–1820.

Kliebenstein, D.J., Kroymann, J., Brown, P.D., Figuth, A., Pedersen, D., Gershenzon, J. and Mitchell-Olds, T. (2001b). Genetic control of natural variation in *Arabidopsis* glucosinolate accumulation. *Plant Physiol.*, **126**. 811–825.

Kliebenstein, D.J., Lambrix, V.M., Reichelt, M., Gershenzon, J. and Mitchell-Olds, T. (2001a). Gene duplication in the diversification of secondary metabolism: tandem 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases control glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **13**. 681–693.

Klonus, D., Höfgen, R., Willmitzer, L. and Riesmeier, J.W. (1994). Isolation and characterization of two cDNA clones encoding ATP-sulfurylases from potato by complementation of a yeast mutant. *Plant J.*, **6**. 105–112.

KNAPSAck. Nara Institute of Science and Technology, <http://kanaya.naist.jp/KNAPSAck/>, **16.06.2014**.

Konishi, Y., Kiyota, T., Draghici, C., Gao, J.-M., Yeboah, F., Acoca, S., Jarussophon, S. and Purisima, E. (2007). Molecular formula analysis by an MS/MS/MS technique to expedite dereplication of natural products. *Anal. Chem.*, **79**. 1187–1197.

Koornneef, M., Alonso-Blanco, C. and Vreugdenhil, D. (2004). Naturally occurring genetic variation in *Arabidopsis thaliana*. *Annu Rev Plant Biol*, **55**. 141–172.

Kopriva, S. (2006). Regulation of sulfate assimilation in *Arabidopsis* and beyond. *Ann. Bot.*, **97**. 479–495.

Kopriva, S., Büchert, T., Fritz, G., Suter, M., Weber, M., Benda, R., Schaller, J., Feller, U., Schürmann, P., Schünemann, V., Trautwein, A.X., Kroneck, P.M. and Brunold, C. (2001). Plant adenosine 5'-phosphosulfate reductase is a novel iron-sulfur protein. *J. Biol. Chem.*, **276**. 42881–42886.

Kopriva, S. and Koprivova, A. (2004). Plant adenosine 5'-phosphosulphate reductase: the past, the present, and the future. *J. Exp. Bot.*, **55**. 1775–1783.

Kopriva, S., Mugford, S.G., Baraniecka, P., Lee, B.-R., Matthewman, C.A. and Koprivova, A. (2012). Control of sulfur partitioning between primary and secondary metabolism in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci*, **3**. 163.

Kopriva, S., Mugford, S.G., Matthewman, C.A. and Koprivova, A. (2009). Plant sulfate assimilation genes: redundancy versus specialization. *Plant Cell Rep*, **28**. 1769–1780.

Koprivova, A., Giovannetti, M., Baraniecka, P., Lee, B.-R., Grondin, C., Loudet, O. and Kopriva, S. (2013). Natural Variation in ATPS1 Isoform of ATP Sulfurylase Contributes to Control of Sulfate Levels in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **163**. 1133-1141.

Koprivova, A., Meyer, A.J., Schween, G., Herschbach, C., Reski, R. and Kopriva, S. (2002). Functional knockout of the adenosine 5'-phosphosulfate reductase gene in *Physcomitrella patens* revives an old route of sulfate assimilation. *J. Biol. Chem.*, **277**. 32195–32201.

Koprivova, A., North, K.A. and Kopriva, S. (2008). Complex signaling network in regulation of adenosine 5'-phosphosulfate reductase by salt stress in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol*, **146**. 1408–1420.

Koprivova, A., Suter, M., Camp, R. op den, Brunold, C. and Kopriva, S. (2000). Regulation of sulfate assimilation by nitrogen in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **122**. 737–746.

Krajewski, M.P., Kanawati, B., Fekete, A., Kowalski, N., Schmitt-Kopplin, P. and Grill, E. (2012). Analysis of *Arabidopsis* glutathione-transferases in yeast. *Phytochemistry*.

Kranner, I. and Grill, D. (1996). Determination of Glutathione and Glutathione Disulphide in Lichens: a Comparison of Frequently Used Methods. *Phytochem. Anal.*, **7**. 24–28.

- Kredich, N.M.** (1971). Regulation of L-cysteine biosynthesis in *Salmonella typhimurium*. I. Effects of growth of varying sulfur sources and O-acetyl-L-serine on gene expression. *J. Biol. Chem.*, **246**. 3474–3484.
- Kreuz, K., Tommasini, R. and Martinoia, E.** (1996). Old Enzymes for a New Job (Herbicide Detoxification in Plants). *Plant Physiol.*, **111**. 349–353.
- Krieger, C.J., Zhang, P., Mueller, L.A., Wang, A., Paley, S., Arnaud, M., Pick, J., Rhee, S.Y. and Karp, P.D.** (2004). MetaCyc: a multiorganism database of metabolic pathways and enzymes. *Nucleic Acids Res.*, **32**. D438–42.
- Kroymann, J., Donnerhacke, S., Schnabelrauch, D. and Mitchell-Olds, T.** (2003). Evolutionary dynamics of an Arabidopsis insect resistance quantitative trait locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100 Suppl 2**. 14587–14592.
- Kruve, A., Kaupmees, K., Liigand, J., Oss, M. and Leito, I.** (2013). Sodium adduct formation efficiency in ESI source. *J Mass Spectrom*, **48**. 695–702.
- Lambrich, V., Reichelt, M., Mitchell-Olds, T., Kliebenstein, D.J. and Gershenzon, J.** (2001). The Arabidopsis epithiospecifier protein promotes the hydrolysis of glucosinolates to nitriles and influences *Trichoplusia ni* herbivory. *Plant Cell*, **13**. 2793–2807.
- Lamoureux, G.L., Stafford, L.E., Shimabukuro, R.H. and Zaylskie, R.G.** (1973). Atrazine metabolism in sorghum: catabolism of the glutathione conjugate of atrazine. *J. Agric. Food Chem.*, **21**. 1020–1030.
- Larsson, C.-M., Larsson, M., Purves, J.V. and Clarkson, D.T.** (1991). Translocation and cycling through roots of recently absorbed nitrogen and sulphur in wheat (*Triticum aestivum*) during vegetative and generative growth. *Physiol Plant*, **82**. 345–352.
- Lass, B. and Ullrich-Eberius, C.I.** (1984). Evidence for proton/sulfate cotransport and its kinetics in *Lemna gibba* G1. *Planta*, **161**. 53–60.
- Lee, B.-R., Huseby, S., Koprivova, A., Chételat, A., Wirtz, M., Mugford, S.T., Navid, E., Brearley, C., Saha, S., Mithen, R., Hell, R., Farmer, E.E. and Kopriva, S.** (2012). Effects of *fou8/fry1* Mutation on Sulfur Metabolism: Is Decreased Internal Sulfate the Trigger of Sulfate Starvation Response? *PLoS ONE*, **7**. e39425.
- Lee, S. and Kang, B.S.** (2005). Expression of Arabidopsis phytochelatin synthase 2 is too low to complement an AtPCS1-defective Cad1-3 mutant. *Mol. Cells (Molecules and Cells)*, **19**. 81–87.
- Lee, S. and Korban, S.S.** (2002). Transcriptional regulation of Arabidopsis thaliana phytochelatin synthase (AtPCS1) by cadmium during early stages of plant development. *Planta*, **215**. 689–693.

Lee, S. and Leustek, T. (1998). APS kinase from *Arabidopsis thaliana*: genomic organization, expression, and kinetic analysis of the recombinant enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **247**. 171–175.

Lehmann, M., Schwarzländer, M., Obata, T., Sirikantaramas, S., Burow, M., Olsen, C.E., Tohge, T., Fricker, M.D., Møller, B.L., Fernie, A.R., Sweetlove, L.J. and Laxa, M. (2009). The metabolic response of *Arabidopsis* roots to oxidative stress is distinct from that of heterotrophic cells in culture and highlights a complex relationship between the levels of transcripts, metabolites, and flux. *Mol Plant*, **2**. 390–406.

Leon, C., Rodriguez-Meizoso, I., Lucio, M., Garcia-Cañas, V., Ibañez, E., Schmitt-Kopplin, P. and Cifuentes, A. (2009). Metabolomics of transgenic maize combining Fourier transform-ion cyclotron resonance-mass spectrometry, capillary electrophoresis-mass spectrometry and pressurized liquid extraction. *J Chromatogr A*, **1216**. 7314–7323.

Leustek and Saito (1999). Sulfate transport and assimilation in plants. *Plant Physiol.*, **120**. 637–644.

Leustek, T. (2002). Sulfate metabolism. *Arabidopsis Book*, **1**. e0017.

Leustek, T., Martin, M.N., Bick, J.-A. and Davies, J.P. (2000). Pathway and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **51**. 141–165.

Leustek, T., Murillo, M. and Cervantes, M. (1994). Cloning of a cDNA encoding ATP sulfurylase from *Arabidopsis thaliana* by functional expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiol.*, **105**. 897–902.

Lewandowska, D., Have, S. ten, Hodge, K., Tillemans, V., Lamond, A.I. and Brown, J.W.S. (2013). Plant SILAC: stable-isotope labelling with amino acids of *Arabidopsis* seedlings for quantitative proteomics. *PLoS ONE*, **8**. e72207.

Liang, G., Yang, F. and Yu, D. (2010). MicroRNA395 mediates regulation of sulfate accumulation and allocation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **62**. 1046–1057.

Lillig, C.H., Schiffmann, S., Berndt, C., Berken, A., Tischka, R. and Schwenn, J.D. (2001). Molecular and catalytic properties of *Arabidopsis thaliana* adenylyl sulfate (APS)-kinase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **392**. 303–310.

Little, J.L., Williams, A.J., Pshenichnov, A. and Tkachenko, V. (2012). Identification of "known unknowns" utilizing accurate mass data and ChemSpider. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **23**. 179–185.

Liu, X., Barkawi, L., Gardner, G. and Cohen, J.D. (2012). Transport of indole-3-butyric acid and indole-3-acetic acid in *Arabidopsis* hypocotyls using stable isotope labeling. *Plant Physiol.*, **158**. 1988–2000.

- Li, Z.S., Alfenito, M., Rea, P.A., Walbot, V. and Dixon, R.A.** (1997). Vacuolar uptake of the phytoalexin medicarpin by the glutathione conjugate pump. *Phytochemistry*, **45**. 689–693.
- Loudet, O., Saliba-Colombani, V., Camilleri, C., Calenge, F., Gaudon, V., Koprivova, A., North, K.A., Kopriva, S. and Daniel-Vedele, F.** (2007). Natural variation for sulfate content in *Arabidopsis thaliana* is highly controlled by APR2. *Nat. Genet.*, **39**. 896–900.
- Lunn, J.E., Droux, M., Martin, J. and Douce, R.** (1990). Localization of ATP Sulfurylase and O-Acetylserine(thiol)lyase in Spinach Leaves. *Plant Physiol.*, **94**. 1345–1352.
- Lu, S.C.** (2000). S-Adenosylmethionine. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **32**. 391–395.
- Maeda, K., Nakajima, Y., Motoyama, T., Kitou, Y., Kosaki, T., Saito, T., Nishiuchi, T., Kanamaru, K., Osada, H., Kobayashi, T. and Kimura, M.** (2014). Effects of acivicin on growth, mycotoxin production and virulence of phytopathogenic fungi. *Lett. Appl. Microbiol.*, **59**. 377-383.
- Malitsky, S., Blum, E., Less, H., Venger, I., Elbaz, M., Morin, S., Eshed, Y. and Aharoni, A.** (2008). The transcript and metabolite networks affected by the two clades of *Arabidopsis* glucosinolate biosynthesis regulators. *Plant Physiol*, **148**. 2021–2049.
- Marrs, K.A.** (1996). The functions and regulation of glutathione s-transferases in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **47**. 127–158.
- Marshall, A.G. and Hendrickson, C.L.** (2008). High-resolution mass spectrometers. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*, **1**. 579–599.
- Marsolais, F., Boyd, J., Paredes, Y., Schinas, A.-M., Garcia, M., Elzein, S. and Varin, L.** (2007). Molecular and biochemical characterization of two brassinosteroid sulfotransferases from *Arabidopsis*, AtST4a (At2g14920) and AtST1 (At2g03760). *Planta*, **225**. 1233–1244.
- Martin, M.N., Saladores, P.H., Lambert, E., Hudson, A.O. and Leustek, T.** (2007). Localization of members of the gamma-glutamyl transpeptidase family identifies sites of glutathione and glutathione S-conjugate hydrolysis. *Plant Physiol*, **144**. 1715–1732.
- Martin, M.N. and Slovin, J.P.** (2000). Purified gamma -Glutamyl Transpeptidases from Tomato Exhibit High Affinity for Glutathione and Glutathione S-Conjugates // Purified gamma-glutamyl transpeptidases from tomato exhibit high affinity for glutathione and glutathione S-conjugates. *Plant Physiol*, **122**. 1417–1426.
- Martin, M.N., Tarczynski, M.C., Shen, B. and Leustek, T.** (2005). The role of 5'-adenylylsulfate reductase in controlling sulfate reduction in plants. *Photosyn. Res.*, **86**. 309–323.

Martinoia, E., Grill, E., Tommasini, R., Kreuz, K. and Amrhein, N. (1993). ATP-dependent glutathione S-conjugate 'export' pump in the vacuolar membrane of plants. *Nature*, **364**. 247–249.

Maruyama-Nakashita, A., Inoue, E., Watanabe-Takahashi, A., Yamaya, T. and Takahashi, H. (2003). Transcriptome profiling of sulfur-responsive genes in Arabidopsis reveals global effects of sulfur nutrition on multiple metabolic pathways. *Plant Physiol*, **132**. 597–605.

Matsubayashi, Y. and Sakagami, Y. (1996). Phytosulfokine, sulfated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis* L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**. 7623–7627.

MassTRIX. Helmholtz Zentrum München, <http://masstrix3.helmholtz-muenchen.de/masstrix3/start.html>, **16.06.2014**.

Matsuda, F., Hirai, M.Y., Sasaki, E., Akiyama, K., Yonekura-Sakakibara, K., Provart, N.J., Sakurai, T., Shimada, Y. and Saito, K. (2010). AtMetExpress development: a phytochemical atlas of Arabidopsis development. *Plant Physiol.*, **152**. 566–578.

Matsuda, F., Shinbo, Y., Oikawa, A., Hirai, M.Y., Fiehn, O., Kanaya, S., Saito, K. and El-Shemy, H.A. (2009a). Assessment of Metabolome Annotation Quality: A Method for Evaluating the False Discovery Rate of Elemental Composition Searches. *PLoS ONE*, **4**. e7490.

Matsuda, F., Yonekura-Sakakibara, K., Niida, R., Kuromori, T., Shinozaki, K. and Saito, K. (2009b). MS/MS spectral tag-based annotation of non-targeted profile of plant secondary metabolites. *Plant J*, **57**. 555–577.

Matthewman, C.A., Kawashima, C.G., Húska, D., Csorba, T., Dalmay, T. and Kopriva, S. (2012). miR395 is a general component of the sulfate assimilation regulatory network in Arabidopsis. *FEBS Lett.*, **586**. 3242–3248.

Maughan, S.C., Pasternak, M., Cairns, N., Kiddle, G., Brach, T., Jarvis, R., Haas, F., Nieuwland, J., Lim, B., Müller, C., Salcedo-Sora, E., Kruse, C., Orsel, M., Hell, R., Miller, A.J., Bray, P., Foyer, C.H., Murray, J.A.H., Meyer, A.J. and Cobbett, C.S. (2010). Plant homologs of the Plasmodium falciparum chloroquine-resistance transporter, PfCRT, are required for glutathione homeostasis and stress responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **107**. 2331–2336.

May, M.J. and Leaver, C.J. (1993). Oxidative Stimulation of Glutathione Synthesis in Arabidopsis thaliana Suspension Cultures. *Plant Physiol.*, **103**. 621–627.

May, M.J., Vernoux, T., Leaver, C., Montagu, M. van and Inzé, D. (1998). Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *Journal of Experimental Botany*, **49**. 649–667.

Meinke, D.W., Cherry, J.M., Dean, C., Rounsley, S.D. and Koornneef, M. (1998). *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science*, **282**. 662, 679-82.

Meister, A. (1988). On the discovery of glutathione. *Trends Biochem. Sci.*, **13**. 185–188.

Meister, A. (1995). Glutathione biosynthesis and its inhibition. *Meth. Enzymol*, **252**. 26–30.

Mendoza-Cózatl, D.G., Butko, E., Springer, F., Torpey, J.W., Komives, E.A., Kehr, J. and Schroeder, J.I. (2008). Identification of high levels of phytochelatins, glutathione and cadmium in the phloem sap of *Brassica napus*. A role for thiol-peptides in the long-distance transport of cadmium and the effect of cadmium on iron translocation. *Plant J*, **54**. 249–259.

Mendoza-Cózatl, D.G., Jobe, T.O., Hauser, F. and Schroeder, J.I. (2011). Long-distance transport, vacuolar sequestration, tolerance, and transcriptional responses induced by cadmium and arsenic. *Curr. Opin. Plant Biol*, **14**. 554–562.

Mendoza-Cózatl, D.G. and Moreno-Sánchez, R. (2006). Control of glutathione and phytochelatin synthesis under cadmium stress. Pathway modeling for plants. *J. Theor. Biol*, **238**. 919–936.

Meringer, M. (2004) *Mathematische Modelle für die kombinatorische Chemie und die molekulare Strukturaufklärung*. Berlin: Logos-Verl.

Messerli, G., Partovi Nia, V., Trevisan, M., Kolbe, A., Schauer, N., Geigenberger, P., Chen, J., Davison, A.C., Fernie, A.R. and Zeeman, S.C. (2007). Rapid classification of phenotypic mutants of *Arabidopsis* via metabolite fingerprinting. *Plant Physiol.*, **143**. 1484–1492.

MetaCyc, <http://metacyc.org/>, **04.06.2014**.

Metlin. SRI International, <http://metlin.scripps.edu/index.php>, **17.06.2014**.

Meuwly, P., Thibault, P. and Rauser, W.E. (1993). gamma-Glutamylcysteinylglutamic acid--a new homologue of glutathione in maize seedlings exposed to cadmium. *FEBS Lett.*, **336**. 472–476.

Meyer, A.J. and Hell, R. (2005). Glutathione homeostasis and redox-regulation by sulfhydryl groups. *Photosyn. Res*, **86**. 435–457.

Miersch, O., Neumerkel, J., Dippe, M., Stenzel, I. and Wasternack, C. (2008). Hydroxylated jasmonates are commonly occurring metabolites of jasmonic acid and contribute to a partial switch-off in jasmonate signaling. *New Phytol.*, **177**. 114–127.

- Mikkelsen, M.D., Hansen, C.H., Wittstock, U. and Halkier, B.A.** (2000). Cytochrome P450 CYP79B2 from *Arabidopsis* catalyzes the conversion of tryptophan to indole-3-acetaldoxime, a precursor of indole glucosinolates and indole-3-acetic acid. *J. Biol. Chem.*, **275**. 33712–33717.
- Mueller, L.A., Zhang, P. and Rhee, S.Y.** (2003). AraCyc: a biochemical pathway database for *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **132**. 453–460.
- Mueller, S., Hilbert, B., Dueckershoff, K., Roitsch, T., Krischke, M., Mueller, M.J. and Berger, S.** (2008). General detoxification and stress responses are mediated by oxidized lipids through TGA transcription factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **20**. 768–785.
- Mugford, S.G., Lee, B.-R., Koprivova, A., Matthewman, C.A. and Kopriva, S.** (2011). Control of sulfur partitioning between primary and secondary metabolism. *Plant J*, **65**. 96–105.
- Mugford, S.G., Matthewman, C.A., Hill, L. and Kopriva, S.** (2010). Adenosine-5'-phosphosulfate kinase is essential for *Arabidopsis* viability. *FEBS Lett.*, **584**. 119–123.
- Mugford, S.G., Yoshimoto, N., Reichelt, M., Wirtz, M., Hill, L., Mugford, S.T., Nakazato, Y., Noji, M., Takahashi, H., Kramell, R., Gigolashvili, T., Flügge, U.-I., Wasternack, C., Gershenzon, J., Hell, R., Saito, K. and Kopriva, S.** (2009). Disruption of adenosine-5'-phosphosulfate kinase in *Arabidopsis* reduces levels of sulfated secondary metabolites. *Plant Cell*, **21**. 910–927.
- Müller, C., Dietz, I., Tziotis, D., Moritz, F., Rupp, J. and Schmitt-Kopplin, P.** (2013). Molecular cartography in acute *Chlamydia pneumoniae* infections--a non-targeted metabolomics approach. *Anal Bioanal Chem*, **405**. 5119–5131.
- Mullineaux, P.M. and Rausch, T.** (2005). Glutathione, photosynthesis and the redox regulation of stress-responsive gene expression. *Photosyn. Res.*, **86**. 459–474.
- Murashige, T. and Skoog, F.** (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant*, **15**. 473–497.
- Murillo, M. and Leustek, T.** (1995). Adenosine-5'-triphosphate-sulfurylase from *Arabidopsis thaliana* and *Escherichia coli* are functionally equivalent but structurally and kinetically divergent: nucleotide sequence of two adenosine-5'-triphosphate-sulfurylase cDNAs from *Arabidopsis thaliana* and analysis of a recombinant enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.*, **323**. 195–204.
- Murray, M. and Thompson, W.** (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl Acids Res*, **8**. 4321–4326.

Nakabayashi, R., Sawada, Y., Yamada, Y., Suzuki, M., Hirai, M.Y., Sakurai, T. and Saito, K. (2013b). Combination of Liquid Chromatography–Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance–Mass Spectrometry with ¹³C-Labeling for Chemical Assignment of Sulfur-Containing Metabolites in Onion Bulbs // Metabolomics for unknown plant metabolites. *Anal. Chem.*, **85** // **405**. 1310–1315 // 5005–5011.

Nakano, Y., Okawa, S., Yamauchi, T., Koizumi, Y. and Sekiya, J. (2006a). Purification and properties of soluble and bound gamma-glutamyltransferases from radish cotyledon. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**. 369–376.

Nakayama, Y., Tamada, Y., Tsugawa, H., Bamba, T. and Fukusaki, E. (2014). Novel strategy for non-targeted isotope-assisted metabolomics by means of metabolic turnover and multivariate analysis. *Metabolites*, **4**. 722–739.

Nebert, D.W. and Dalton, T.P. (2006). The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer*, **6**. 947–960.

Newman, D.J. and Cragg, G.M. (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.*, **75**. 311–335.

Nikiforova, V.J., Daub, C.O., Hesse, H., Willmitzer, L. and Hoefgen, R. (2005a). Integrative gene-metabolite network with implemented causality deciphers informational fluxes of sulphur stress response. *J. Exp. Bot*, **56**. 1887–1896.

Nikiforova, V.J., Freitag, J., Kempa, S., Adamik, M., Hesse, H. and Hoefgen, R. (2003). Transcriptome analysis of sulfur depletion in *Arabidopsis thaliana*: interlacing of biosynthetic pathways provides response specificity. *Plant J*, **33**. 633–650.

Nikiforova, V.J., Gakière, B., Kempa, S., Adamik, M., Willmitzer, L., Hesse, H. and Hoefgen, R. (2004). Towards dissecting nutrient metabolism in plants: a systems biology case study on sulphur metabolism. *J. Exp. Bot*, **55**. 1861–1870.

Nikiforova, V.J., Kopka, J., Tolstikov, V., Fiehn, O., Hopkins, L., Hawkesford, M.J., Hesse, H. and Hoefgen, R. (2005b). Systems rebalancing of metabolism in response to sulfur deprivation, as revealed by metabolome analysis of *Arabidopsis* plants. *Plant Physiol*, **138**. 304–318.

Noctor, Arisi, Jouanin and Foyer (1998). Manipulation of glutathione and amino acid biosynthesis in the chloroplast. *Plant Physiol.*, **118**. 471–482.

Noctor, G., Arisi, A.-C.M., Jouanin, L., Kunert, K.J., Rennenberg, H. and Foyer, C.H. (1998). Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *Journal of Experimental Botany*, **321**. 623–647.

Noctor, G. and Foyer, C.H. (1998). ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **49**. 249–279.

Noctor, G., Gomez, L., Vanacker, H. and Foyer, C.H. (2002). Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *J. Exp. Bot.*, **53**. 1283–1304.

Noctor, G., Queval, G., Mhamdi, A., Chaouch, S. and Foyer, C.H. (2011). Glutathione. *Arabidopsis Book*, **9**. e0142.

Noctor, G., Strohm, M., Jouanin, L., Kunert, K.J., Foyer, C.H. and Rennenberg, H. (1996). Synthesis of Glutathione in Leaves of Transgenic Poplar Overexpressing [gamma]-Glutamylcysteine Synthetase. *Plant Physiol.*, **112**. 1071–1078.

Noji, M. and Saito, K. (2002). Molecular and biochemical analysis of serine acetyltransferase and cysteine synthase towards sulfur metabolic engineering in plants. *Amino Acids*, **22**. 231–243.

OECD (2006). Series on the Safety of Novel Foods and Feeds. *OECD Environment, Health and Safety Publications*.

Ogawa, S., Yoshidomi, T. and Yoshimura, E. (2011). Cadmium(II)-stimulated enzyme activation of Arabidopsis thaliana phytochelatin synthase 1. *J. Inorg. Biochem*, **105**. 111–117.

Ohkama-Ohtsu, N., Oikawa, A., Zhao, P., Xiang, C., Saito, K. and Oliver, D.J. (2008). A gamma-glutamyl transpeptidase-independent pathway of glutathione catabolism to glutamate via 5-oxoproline in Arabidopsis. *Plant Physiol*, **148**. 1603–1613.

Ohkama-Ohtsu, N., Radwan, S., Peterson, A., Zhao, P., Badr, A.F., Xiang, C. and Oliver, D.J. (2007a). Characterization of the extracellular gamma-glutamyl transpeptidases, GGT1 and GGT2, in Arabidopsis. *Plant J*, **49**. 865–877.

Ohkama-Ohtsu, N., Sasaki-Sekimoto, Y., Oikawa, A., Jikumaru, Y., Shinoda, S., Inoue, E., Kamide, Y., Yokoyama, T., Hirai, M.Y., Shirasu, K., Kamiya, Y., Oliver, D.J. and Saito, K. (2011). 12-oxo-phytodienoic acid-glutathione conjugate is transported into the vacuole in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol*, **52**. 205–209.

Ohkama-Ohtsu, N., Zhao, P., Xiang, C. and Oliver, D.J. (2007b). Glutathione conjugates in the vacuole are degraded by gamma-glutamyl transpeptidase GGT3 in Arabidopsis. *Plant J*, **49**. 878–888.

Ohta, D., Kanaya, S. and Suzuki, H. (2010). Application of Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometry to metabolic profiling and metabolite identification. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **21**. 35–44.

Oikawa, A., Nakamura, Y., Ogura, T., Kimura, A., Suzuki, H., Sakurai, N., Shinbo, Y., Shibata, D., Kanaya, S. and Ohta, D. (2006). Clarification of pathway-specific inhibition by Fourier transform ion cyclotron resonance/mass spectrometry-based metabolic phenotyping studies. *Plant Physiol.*, **142**. 398–413.

Okazaki, Y. and Saito, K. (2012). Recent advances of metabolomics in plant biotechnology. *Plant Biotechnol Rep*, **6**. 1–15.

Oksman-Caldentey, K.-M. and Inzé, D. (2004). Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends Plant Sci.*, **9**. 433–440.

Oliver, S.G., Winson, M.K., Kell, D.B. and Baganz, F. (1998). Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol.*, **16**. 373–378.

Omranian, N., Mueller-Roeber, B. and Nikoloski, Z. (2012). PageRank-based identification of signaling crosstalk from transcriptomics data: the case of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Biosyst*, **8**. 1121–1127.

Ong, S.-E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D.B., Steen, H., Pandey, A. and Mann, M. (2002). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol. Cell Proteomics*, **1**. 376–386.

Ong, S.-E. and Mann, M. (2006). A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *Nat Protoc*, **1**. 2650–2660.

Oven, M., Page, J.E., Zenk, M.H. and Kutchan, T.M. (2002). Molecular characterization of the homo-phytochelatin synthase of soybean *Glycine max*: relation to phytochelatin synthase. *J. Biol. Chem*, **277**. 4747–4754.

Pappa, G., Lichtenberg, M., Iori, R., Barillari, J., Bartsch, H. and Gerhäuser, C. (2006). Comparison of growth inhibition profiles and mechanisms of apoptosis induction in human colon cancer cell lines by isothiocyanates and indoles from Brassicaceae. *Mutat. Res.*, **599**. 76–87.

Parisy, V., Poinssot, B., Owsianowski, L., Buchala, A., Glazebrook, J. and Mauch, F. (2007). Identification of PAD2 as a gamma-glutamylcysteine synthetase highlights the importance of glutathione in disease resistance of *Arabidopsis*. *Plant J*, **49**. 159–172.

Patron, N.J., Durnford, D.G. and Kopriva, S. (2008). Sulfate assimilation in eukaryotes: fusions, relocations and lateral transfers. *BMC Evol. Biol.*, **8**. 39.

Payne, T.G., Southam, A.D., Arvanitis, T.N. and Viant, M.R. (2009). A signal filtering method for improved quantification and noise discrimination in fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry-based metabolomics data. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **20**. 1087–1095.

Petersen, B.L., Chen, S., Hansen, C.H., Olsen, C.E. and Halkier, B.A. (2002). Composition and content of glucosinolates in developing *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, **214**. 562–571.

Pichersky, E. and Lewinsohn, E. (2011). Convergent evolution in plant specialized metabolism. *Annu Rev Plant Biol*, **62**. 549–566.

Piotrowski, M., Schemenewitz, A., Lopukhina, A., Müller, A., Janowitz, T., Weiler, E.W. and Oecking, C. (2004). Desulfoglucosinolate sulfotransferases from *Arabidopsis thaliana* catalyze the final step in the biosynthesis of the glucosinolate core structure. *J. Biol. Chem.*, **279**. 50717–50725.

Pontoppidan, B., Hopkins, R., Rask, L. and Meijer, J. (2003). Infestation by cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae*) on oilseed rape (*Brassica napus*) causes a long lasting induction of the myrosinase system. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **109**. 55–62.

Pontoppidan, B., Hopkins, R., Rask, L. and Meijer, J. (2005). Differential wound induction of the myrosinase system in oilseed rape (*Brassica napus*): contrasting insect damage with mechanical damage. *Plant Science*, **168**. 715–722.

Popper, Z.A., Michel, G., Hervé, C., Domozych, D.S., Willats, W.G.T., Tuohy, M.G., Kloareg, B. and Stengel, D.B. (2011). Evolution and diversity of plant cell walls: from algae to flowering plants. *Annu Rev Plant Biol*, **62**. 567–590.

Prior, A., Uhrig, J.F., Heins, L., Wiesmann, A., Lillig, C.H., Stoltze, C., Soll, J. and Schwenn, J.D. (1999). Structural and kinetic properties of adenylyl sulfate reductase from *Catharanthus roseus* cell cultures. *Biochim. Biophys. Acta*, **1430**. 25–38.

PT200600: Sucrose; MS2; Q-ToF; [M-H]⁻. Matsuda F, S.M.S.Y., <http://spectra.psc.riken.jp/menta.cgi/respect/datail/datail?accession=PT200600>, **09.09.2014**.

Püssa, T., Floren, J., Kuldkepp, P. and Raal, A. (2006). Survey of grapevine *Vitis vinifera* stem polyphenols by liquid chromatography-diode array detection-tandem mass spectrometry, **54**. 7488–7494.

Quanbeck, S.M., Brachova, L., Campbell, A.A., Guan, X., Perera, A., He, K., Rhee, S.Y., Bais, P., Dickerson, J.A., Dixon, P., Wohlgemuth, G., Fiehn, O., Barkan, L., Lange, I., Lange, B.M., Lee, I., Cortes, D., Salazar, C., Shuman, J., Shulaev, V., Huhman, D.V., Sumner, L.W., Roth, M.R., Welti, R., Ilarslan, H., Wurtele, E.S. and Nikolau, B.J. (2012). Metabolomics as a Hypothesis-Generating Functional Genomics Tool for the Annotation of *Arabidopsis thaliana* Genes of "Unknown Function". *Front Plant Sci*, **3**. 15.

Rask, L., Andréasson, E., Ekbom, B., Eriksson, S., Pontoppidan, B. and Meijer, J. (2000). Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant Mol. Biol.*, **42**. 93–113.

Rausch, T. and Wachter, A. (2005). Sulfur metabolism: a versatile platform for launching defence operations. *Trends Plant Sci*, **10**. 503–509.

Rea, P.A. (1999). MRP subfamily ABC transporters from plants and yeast. *Journal of Experimental Botany*, **50**. 895–913.

Reintanz, B., Lehnen, M., Reichelt, M., Gershenzon, J., Kowalczyk, M., Sandberg, G., Godde, M., Uhl, R. and Palme, K. (2001). Bus, a bushy Arabidopsis CYP79F1 knockout mutant with abolished synthesis of short-chain aliphatic glucosinolates. *Plant Cell*, **13**. 351–367.

Renosto, F., Patel, H.C., Martin, R.L., Thomassian, C., Zimmerman, G. and Segel, I.H. (1993). ATP sulfurylase from higher plants: kinetic and structural characterization of the chloroplast and cytosol enzymes from spinach leaf. *Arch. Biochem. Biophys.*, **307**. 272–285.

Richau, K.H., Kaschani, F., Verdoes, M., Pansuriya, T.C., Niessen, S., Stüber, K., Colby, T., Overkleeft, H.S., Bogyo, M. and van der Hoorn, R.A.L. (2012). Subclassification and biochemical analysis of plant papain-like cysteine proteases displays subfamily-specific characteristics. *Plant Physiol.*, **158**. 1583–1599.

ReSpect for Phytochemicals. RIKEN Center for Sustainable Resource Science : Metabolomics Research Group, <http://spectra.psc.riken.jp/menta.cgi/index>, **10.09.2014**.

Roepenack-Lahaye, E. von, Degenkolb, T., Zerjeski, M., Franz, M., Roth, U., Wessjohann, L., Schmidt, J., Scheel, D. and Clemens, S. (2004). Profiling of Arabidopsis secondary metabolites by capillary liquid chromatography coupled to electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Plant Physiol.*, **134**. 548–559.

Romanyuk, N.D., Rigden, D.J., Vatamaniuk, O.K., Lang, A., Cahoon, R.E., Jez, J.M. and Rea, P.A. (2006). Mutagenic definition of a papain-like catalytic triad, sufficiency of the N-terminal domain for single-site core catalytic enzyme acylation, and C-terminal domain for augmentative metal activation of a eukaryotic phytochelatin synthase. *Plant Physiol*, **141**. 858–869.

Romero, L.C., Aroca, M.Á., Laureano-Marín, A.M., Moreno, I., García, I. and Gotor, C. (2014). Cysteine and Cysteine-Related Signaling Pathways in Arabidopsis thaliana. *Mol Plant*, **7**. 264–276.

Rosa, E.A.S., Heaney, R.K., Fenwick, G.R. and Portas, C.A.M. (1997). Glucosinolates in Crop Plants. In *Horticultural reviews*. (Janick, J., ed.). New York: John Wiley & Sons.

Rosman, K.J.R. and Taylor, P.D.P. (1998). Isotopic compositions of the elements 1997 (Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, **70**.

Rotte, C. and Leustek, T. (2000). Differential subcellular localization and expression of ATP sulfurylase and 5'-adenylylsulfate reductase during ontogenesis of Arabidopsis leaves indicates that cytosolic and plastid forms of ATP sulfurylase may have specialized functions. *Plant Physiol.*, **124**. 715–724.

Ruiz, J.M. and Blumwald, E. (2002). Salinity-induced glutathione synthesis in Brassica napus. *Planta*, **214**. 965–969.

Ruotolo, R., Peracchi, A., Bolchi, A., Infusini, G., Amoresano, A. and Ottonello, S. (2004). Domain organization of phytochelatin synthase: functional properties of truncated enzyme species identified by limited proteolysis. *J. Biol. Chem.*, **279**. 14686–14693.

Saint Paul, V. von, Zhang, W., Kanawati, B., Geist, B., Faus-Kessler, T., Schmitt-Kopplin, P. and Schäffner, A.R. (2011). The Arabidopsis glucosyltransferase UGT76B1 conjugates isoleucic acid and modulates plant defense and senescence. *Plant Cell*, **23**. 4124–4145.

Saito, K. (2013). Phytochemical genomics--a new trend. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **16**. 373–380.

Saito, K. and Matsuda, F. (2010). Metabolomics for functional genomics, systems biology, and biotechnology. *Annu Rev Plant Biol*, **61**. 463–489.

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

Sandermann, H. (1994). Higher plant metabolism of xenobiotics: the 'green liver' concept. *Pharmacogenetics*, **4**. 225–241.

Sato, S., Soga, T., Nishioka, T. and Tomita, M. (2004). Simultaneous determination of the main metabolites in rice leaves using capillary electrophoresis mass spectrometry and capillary electrophoresis diode array detection. *Plant J.*, **40**. 151–163.

Sauter, M., Cornell, K.A., Beszteri, S. and Rzewuski, G. (2004). Functional analysis of methylthioribose kinase genes in plants. *Plant Physiol*, **136**. 4061–4071.

Sauter, M., Moffatt, B., Saechao, M.C., Hell, R. and Wirtz, M. (2013). Methionine salvage and S-adenosylmethionine: essential links between sulfur, ethylene and polyamine biosynthesis. *Biochem. J.*, **451**. 145–154.

Schlaeppli, K., Bodenhausen, N., Buchala, A., Mauch, F. and Reymond, P. (2008). The glutathione-deficient mutant pad2-1 accumulates lower amounts of glucosinolates and is more susceptible to the insect herbivore *Spodoptera littoralis*. *Plant J*, **55**. 774–786.

Schmid, D.G., Grosche, P., Bandel, H. and Jung, G. (2000). FTICR-mass spectrometry for high-resolution analysis in combinatorial chemistry. *Biotechnol. Bioeng.*, **71**. 149–161.

Schmidt, A. (1972). On the mechanism of photosynthetic sulfate reduction. An APS-sulfotransferase from *Chlorella*. *Arch Mikrobiol*, **84**. 77–86.

Schmidt, A. and Jäger, K. (1992). Open Questions about Sulfur Metabolism in Plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.*, **43**. 325–349.

Schnölzer, M., Jedrzejewski, P. and Lehmann, W.D. (1996). Protease-catalyzed incorporation of ^{18}O into peptide fragments and its application for protein sequencing by electrospray and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Electrophoresis*, **17**. 945–953.

Schnug, E. and Haneklaus, S. (1993). Physiological backgrounds of different sulphur utilisation in *Brassica napus* varieties. In *Physiology of varieties*. Wellesbourne, Warwick: AAB.

Schranz, M.E., Manzaneda, A.J., Windsor, A.J., Clauss, M.J. and Mitchell-Olds, T. (2009). Ecological genomics of *Boechera stricta*: identification of a QTL controlling the allocation of methionine- vs branched-chain amino acid-derived glucosinolates and levels of insect herbivory. *Heredity (Edinb)*, **102**. 465–474.

Schütz, W., Hausmann, N., Krug, K., Hampp, R. and Macek, B. (2011). Extending SILAC to proteomics of plant cell lines. *Plant Cell*, **23**. 1701–1705.

Seki, H., Sawai, S., Ohyama, K., Mizutani, M., Ohnishi, T., Sudo, H., Fukushima, E.O., Akashi, T., Aoki, T., Saito, K. and Muranaka, T. (2011). Triterpene functional genomics in licorice for identification of CYP72A154 involved in the biosynthesis of glycyrrhizin. *Plant Cell*, **23**. 4112–4123.

Setya, A., Murillo, M. and Leustek, T. (1996). Sulfate reduction in higher plants: molecular evidence for a novel 5'-adenylylsulfate reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**. 13383–13388.

Seven Golden Rules. Kind, T. and Fiehn, O., http://fiehnlab.ucdavis.edu/projects/Seven_Golden_Rules/, **13.08.2014**.

Shevchenko, A., Chernushevich, I., Ens, W., Standing, K.G., Thomson, B., Wilm, M. and Mann, M. (1997). Rapid 'de novo' peptide sequencing by a combination of nanoelectrospray, isotopic labeling and a quadrupole/time-of-flight mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **11**. 1015–1024.

Shinbo, Y., Nakamura, Y., Altaf-UI-Amin, M., Asahi, H., Kurokawa, K., Arita, M., Saito, K., Ohta, D., Shibata, D. and Kanaya, S. (2006). KNApSACK: A Comprehensive Species-Metabolite Relationship Database. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, **57**. 165–181.

SIGnAL, <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>, **13.08.2014**.

Singh, R., White, M.A., Ramana, K.V., Petrash, J.M., Watowich, S.J., Bhatnagar, A. and Srivastava, S.K. (2006). Structure of a glutathione conjugate bound to the active site of aldose reductase. *Proteins*, **64**. 101–110.

- Smith, C.A., O'Maille, G., Want, E.J., Qin, C., Trauger, S.A., Brandon, T.R., Custodio, D.E., Abagyan, R. and Siuzdak, G.** (2005). METLIN: a metabolite mass spectral database. *Ther Drug Monit*, **27**. 747–751.
- Smith, F.W., Ealing, P.M., Hawkesford, M.J. and Clarkson, D.T.** (1995). Plant members of a family of sulfate transporters reveal functional subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**. 9373–9377.
- Smith, R.** (2000). Evolution of esi–mass spectrometry and fourier transform ion cyclotron resonance for proteomics and other biological applications. *International Journal of Mass Spectrometry*, **200**. 509–544.
- Soga, T., Igarashi, K., Ito, C., Mizobuchi, K., Zimmermann, H.-P. and Tomita, M.** (2009). Metabolomic profiling of anionic metabolites by capillary electrophoresis mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **81**. 6165–6174.
- Sommer, A. and Böger, P.** (1999). Characterization of Recombinant Corn GlutathioneS-Transferase Isoforms I, II, III, and IV. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **63**. 127–138.
- Sønderby, I.E., Geu-Flores, F. and Halkier, B.A.** (2010). Biosynthesis of glucosinolates--gene discovery and beyond. *Trends Plant Sci*, **15**. 283–290.
- Sousa Silva, M., Gomes, R.A., Ferreira, A.E.N., Ponces Freire, A. and Cordeiro, C.** (2013). The glyoxalase pathway: the first hundred years... and beyond. *Biochem. J.*, **453**. 1–15.
- Staiger, D.** (2002). Circadian rhythms in Arabidopsis: time for nuclear proteins. *Planta*, **214**. 334–344.
- Stewart, B.J., Navid, A., Kulp, K.S., Knaack, J.L.S. and Bench, G.** (2013). D-Lactate production as a function of glucose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **30**. 81–91.
- Storozhenko, S., Belles-Boix, E., Babiyshuk, E., Hérouart, D., Davey, M.W., Slooten, L., van Montagu, M., Inzé, D. and Kushnir, S.** (2002). Gamma-glutamyl transpeptidase in transgenic tobacco plants. Cellular localization, processing, and biochemical properties. *Plant Physiol.*, **128**. 1109–1119.
- Sud, M., Fahy, E., Cotter, D., Brown, A., Dennis, E.A., Glass, C.K., Merrill, A.H., Murphy, R.C., Raetz, C.R.H., Russell, D.W. and Subramaniam, S.** (2007). LMSD: LIPID MAPS structure database. *Nucleic Acids Res.*, **35**. D527-32.
- Suhre, K. and Schmitt-Kopplin, P.** (2008). MassTRIX: mass translator into pathways. *Nucleic Acids Res.*, **36**. W481-4.
- Sumner, L.W., Amberg, A., Barrett, D., Beale, M.H., Beger, R., Daykin, C.A., Fan, T.W.-M., Fiehn, O., Goodacre, R., Griffin, J.L., Hankemeier, T., Hardy, N., Harnly, J., Higashi, R., Kopka, J., Lane, A.N., Lindon, J.C., Marriott, P., Nicholls, A.W., Reilly, M.D., Thaden, J.J. and Viant, M.R.** (2007). Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. *Metabolomics*, **3**. 211–221.

Sunarpi and Anderson, J.W. (1996). Effect of Sulfur Nutrition on the Redistribution of Sulfur in Vegetative Soybean Plants. *Plant Physiol.*, **112**. 623–631.

Sunarpi and Anderson, J.W. (1998). Direct evidence for the involvement of the root in the redistribution of sulfur between leaves. *Journal of Plant Nutrition*, **21**. 1273–1286.

Sung, D.-Y., Kim, T.-H., Komives, E.A., Mendoza-Cózatl, D.G. and Schroeder, J.I. (2009). ARS5 is a component of the 26S proteasome complex, and negatively regulates thiol biosynthesis and arsenic tolerance in Arabidopsis. *Plant J.*, **59**. 802–813.

Suter, M., Ballmoos, P. von, Kopriva, S., den Camp, R.O., Schaller, J., Kuhlemeier, C., Schürmann, P. and Brunold, C. (2000). Adenosine 5'-phosphosulfate sulfotransferase and adenosine 5'-phosphosulfate reductase are identical enzymes. *J. Biol. Chem.*, **275**. 930–936.

TAIR. Phoenix Bioinformatics Corporation, <http://www.arabidopsis.org/>, **13.08.2014**.

Tajc, S.G., Tolbert, B.S., Basavappa, R. and Miller, B.L. (2004). Direct Determination of Thiol p Ka by Isothermal Titration Microcalorimetry. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**. 10508–10509.

Takahashi, H. (2010). Regulation of sulfate transport and assimilation in plants. *Int Rev Cell Mol Biol*, **281**. 129–159.

Takahashi, H., Kopriva, S., Giordano, M., Saito, K. and Hell, R. (2011). Sulfur assimilation in photosynthetic organisms: molecular functions and regulations of transporters and assimilatory enzymes. *Annu Rev Plant Biol*, **62**. 157–184.

Takahashi, H., Yamazaki, M., Sasakura, N., Watanabe, A., Leustek, T., Almeida-Engler, J. de, Engler, G., Montagu, M. van and Saito, K. (1997). Regulation of sulfur assimilation in higher plants: a sulfate transporter induced in sulfate-starved roots plays a central role in Arabidopsis thaliana. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**. 11102–11107.

Takaoka, M. (1939). Resveratrol, a new phenolic compound, from *Veratrum grandiflorum*. *Journal of the Chemical Society of Japan*, **60**. 1090–1100.

Tang, P.C.-T., Ng, Y.-F., Ho, S., Gyda, M. and Chan, S.-W. (2014). Resveratrol and cardiovascular health - Promising therapeutic or hopeless illusion? *Pharmacol. Res. E-pub ahead of print*

Tate, S.S. and Meister, A. (1985). gamma-Glutamyl transpeptidase from kidney. *Meth. Enzymol.*, **113**. 400–419.

Thelen, J.J. and Peck, S.C. (2007). Quantitative proteomics in plants: choices in abundance. *Plant Cell*, **19**. 3339–3346.

Theodoridis, G.A., Gika, H.G., Want, E.J. and Wilson, I.D. (2012). Liquid chromatography-mass spectrometry based global metabolite profiling: a review. *Anal. Chim. Acta*, **711**. 7–16.

Tohge, T., Nishiyama, Y., Hirai, M.Y., Yano, M., Nakajima, J.-i., Awazuhara, M., Inoue, E., Takahashi, H., Goodenowe, D.B., Kitayama, M., Noji, M., Yamazaki, M. and Saito, K. (2005). Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of Arabidopsis plants over-expressing an MYB transcription factor. *Plant J.*, **42**. 218–235.

Tohge, T., Ramos, M.S., Nunes-Nesi, A., Mutwil, M., Giavalisco, P., Steinhauser, D., Schellenberg, M., Willmitzer, L., Persson, S., Martinoia, E. and Fernie, A.R. (2011). Toward the storage metabolome: profiling the barley vacuole. *Plant Physiol.*, **157**. 1469–1482.

Truchet, G., Roche, P., Lerouge, P., Vasse, J., Camut, S., Billy, F. de, Promé, J.-C. and Dénarié, J. (1991). Sulphated lipo-oligosaccharide signals of Rhizobium meliloti elicit root nodule organogenesis in alfalfa. *Nature*, **351**. 670–673.

Tsuboi, S., Fujiwara, E., Ogata, K., Sakaue, A., Nakayama, T. and Ohmori, S. (1993). Inhibitory effects of S-(1,2-dicarboxyethyl)glutathione on collagen-induced platelet aggregation; enhancements of cyclic AMP level and adenylate cyclase activity in platelets by S-(1,2-dicarboxyethyl)glutathione. *Biol. Pharm. Bull.*, **16**. 1083–1086.

Tsuboi, S., Kobayashi, M., Nanba, M., Imaoka, S. and Ohmori, S. (1990). S-(1,2-dicarboxyethyl)glutathione and activity for its synthesis in rat tissues. *J. Biochem.*, **107**. 539–545.

Tsuji, N., Nishikori, S., Iwabe, O., Matsumoto, S., Shiraki, K., Miyasaka, H., Takagi, M., Miyamoto, K. and Hirata, K. (2005). Comparative analysis of the two-step reaction catalyzed by prokaryotic and eukaryotic phytochelatin synthase by an ion-pair liquid chromatography assay. *Planta*, **222**. 181–191.

Tucker, S., Ahl, M., Bush, A., Westaway, D., Huang, X. and Rogers, J.T. (2005). Pilot study of the reducing effect on amyloidosis in vivo by three FDA pre-approved drugs via the Alzheimer's APP 5' untranslated region. *Curr Alzheimer Res*, **2**. 249–254.

Underhill, E.W., Wetter, L.R. and Chisholm, M.D. (1973). Biosynthesis of glucosinolates. *Biochem. Soc. Symp.* 303–326.

Primer3. Untergrasser A., <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>.

Vatamaniuk, O.K., Mari, S., Lang, A., Chalasani, S., Demkiv, L.O. and Rea, P.A. (2004). Phytochelatin synthase, a dipeptidyltransferase that undergoes multisite acylation with gamma-glutamylcysteine during catalysis: stoichiometric and site-directed mutagenic analysis of arabidopsis thaliana PCS1-catalyzed phytochelatin synthesis. *J. Biol. Chem.*, **279**. 22449–22460.

- Vatamaniuk, O.K., Mari, S., Lu, Y.P. and Rea, P.A.** (1999). AtPCS1, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis*: isolation and in vitro reconstitution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**. 7110–7115.
- Vauclare, P., Kopriva, S., Fell, D., Suter, M., Sticher, L., Ballmoos, P. von, Krähenbühl, U., Camp, R. op den and Brunold, C.** (2002). Flux control of sulphate assimilation in *Arabidopsis thaliana*: adenosine 5'-phosphosulphate reductase is more susceptible than ATP sulphurylase to negative control by thiols. *Plant J*, **31**. 729–740.
- Vernoux, T., Wilson, R.C., Seeley, K.A., Reichheld, J.P., Muroy, S., Brown, S., Maughan, S.C., Cobbett, C.S., van Montagu, M., Inzé, D., May, M.J. and Sung, Z.R.** (2000). The ROOT MERISTEMLESS1/CADMIUM SENSITIVE2 gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development. *Plant Cell*, **12**. 97–110.
- Vestergaard, M., Matsumoto, S., Nishikori, S., Shiraki, K., Hirata, K. and Takagi, M.** (2008). Chelation of cadmium ions by phytochelatin synthase: role of the cysteine-rich C-terminal. *Anal Sci*, **24**. 277–281.
- Vivares, D., Arnoux, P. and Pignol, D.** (2005). A papain-like enzyme at work: native and acyl-enzyme intermediate structures in phytochelatin synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**. 18848–18853.
- Vos, R.C.H. de, Moco, S., Lommen, A., Keurentjes, J.J.B., Bino, R.J. and Hall, R.D.** (2007). Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat Protoc*, **2**. 778–791.
- Wachter, A., Wolf, S., Steininger, H., Bogs, J. and Rausch, T.** (2005). Differential targeting of GSH1 and GSH2 is achieved by multiple transcription initiation: implications for the compartmentation of glutathione biosynthesis in the Brassicaceae. *Plant J.*, **41**. 15–30.
- Wada, K., Hiratake, J., Irie, M., Okada, T., Yamada, C., Kumagai, H., Suzuki, H. and Fukuyama, K.** (2008). Crystal structures of *Escherichia coli* gamma-glutamyltranspeptidase in complex with azaserine and acivicin: novel mechanistic implication for inhibition by glutamine antagonists. *J. Mol. Biol.*, **380**. 361–372.
- Walker, S.H., Budhathoki-Uprety, J., Novak, B.M. and Muddiman, D.C.** (2011). Stable-isotope labeled hydrophobic hydrazide reagents for the relative quantification of N-linked glycans by electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **83**. 6738–6745.
- Wang, W. and Ballatori, N.** (1998). Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. *Pharmacol. Rev.*, **50**. 335–356.
- Wang, Y.** (2008). Needs for new plant-derived pharmaceuticals in the post-genome era: an industrial view in drug research and development. *Phytochem Rev*, **7**. 395–406.

Ward, J.L., Baker, J.M. and Beale, M.H. (2007). Recent applications of NMR spectroscopy in plant metabolomics. *FEBS J.*, **274**. 1126–1131.

Watanabe, M., Mochida, K., Kato, T., Tabata, S., Yoshimoto, N., Noji, M. and Saito, K. (2008). Comparative genomics and reverse genetics analysis reveal indispensable functions of the serine acetyltransferase gene family in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **20**. 2484–2496.

Weber, M., Suter, M., Brunold, C. and Kopriva, S. (2000). Sulfate assimilation in higher plants characterization of a stable intermediate in the adenosine 5'-phosphosulfate reductase reaction. *Eur. J. Biochem.*, **267**. 3647–3653.

Weinshilboum, R.M. and Otterness, D.M. (1994). Sulphotransferase Enzymes. In *Conjugation-Deconjugation Reactions in Drug Metabolism and Toxicity*. (Kauffman, F.C., ed.). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Weinshilboum, R.M., Otterness, D.M., Aksoy, I.A., Wood, T.C., Her, C. and Raftogianis, R.B. (1997). Sulfation and sulfotransferases 1: Sulfotransferase molecular biology: cDNAs and genes. *FASEB J.*, **11**. 3–14.

Wirtz, M. and Hell, R. (2007). Dominant-negative modification reveals the regulatory function of the multimeric cysteine synthase protein complex in transgenic tobacco. *Plant Cell*, **19**. 625–639.

Wishart, D.S., Knox, C., Guo, A.C., Eisner, R., Young, N., Gautam, B., Hau, D.D., Psychogios, N., Dong, E., Bouatra, S., Mandal, R., Sinelnikov, I., Xia, J., Jia, L., Cruz, J.A., Lim, E., Sobsey, C.A., Shrivastava, S., Huang, P., Liu, P., Fang, L., Peng, J., Fradette, R., Cheng, D., Tzur, D., Clements, M., Lewis, A., Souza, A. de, Zuniga, A., Dawe, M., Xiong, Y., Clive, D., Greiner, R., Nazyrova, A., Shaykhutdinov, R., Li, L., Vogel, H.J. and Forsythe, I. (2009). HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. *Nucleic Acids Res.*, **37**. D603-10.

Wittstock, U. and Burow, M. (2010). Glucosinolate breakdown in *Arabidopsis*: mechanism, regulation and biological significance. *Arabidopsis Book*, **8**. e0134.

Wittstock, U. and Halkier, B.A. (2000). Cytochrome P450 CYP79A2 from *Arabidopsis thaliana* L. Catalyzes the conversion of L-phenylalanine to phenylacetaldoxime in the biosynthesis of benzylglucosinolate. *J. Biol. Chem.*, **275**. 14659–14666.

Wolf, A.E., Dietz, K.J. and Schröder, P. (1996). Degradation of glutathione S-conjugates by a carboxypeptidase in the plant vacuole. *FEBS Lett.*, **384**. 31–34.

Xiang, C. and Oliver, D.J. (1998). Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **10**. 1539–1550.

Xiang, C., Werner, B.L., Christensen, E.M. and Oliver, D.J. (2001). The biological functions of glutathione revisited in *Arabidopsis* transgenic plants with altered glutathione levels. *Plant Physiol.*, **126**. 564–574.

Yatusevich, R., Mugford, S.G., Matthewman, C., Gigolashvili, T., Frerigmann, H., Delaney, S., Koprivova, A., Flügge, U.-I. and Kopriva, S. (2010). Genes of primary sulfate assimilation are part of the glucosinolate biosynthetic network in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **62**. 1–11.

Yonekura-Sakakibara, K., Tohge, T., Matsuda, F., Nakabayashi, R., Takayama, H., Niida, R., Watanabe-Takahashi, A., Inoue, E. and Saito, K. (2008). Comprehensive flavonol profiling and transcriptome coexpression analysis leading to decoding gene-metabolite correlations in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **20**. 2160–2176.

Zandalinas, S.I., Vives-Peris, V., Gómez-Cadenas, A. and Arbona, V. (2012). A fast and precise method to identify indolic glucosinolates and camalexin in plants by combining mass spectrometric and biological information. *J. Agric. Food Chem.*, **60**. 8648–8658.


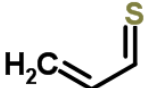
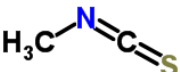

Zhao, F.J., Hawkesford, M.J. and McGrath, S.P. (1999). Sulphur Assimilation and Effects on Yield and Quality of Wheat. *Journal of Cereal Science*, **30**. 1–17.

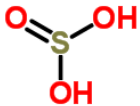
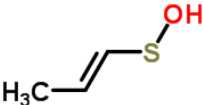
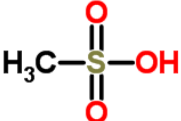
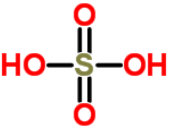
Zhao, Y., Hull, A.K., Gupta, N.R., Goss, K.A., Alonso, J., Ecker, J.R., Normanly, J., Chory, J. and Celenza, J.L. (2002). Trp-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. *Genes Dev.*, **16**. 3100–3112.

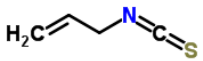
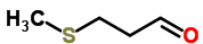
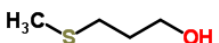

8 Anhang

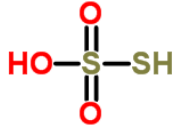
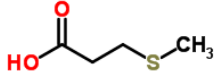
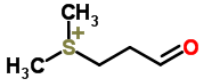
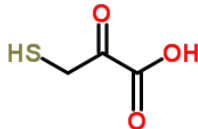
Anhang 8.1 Referezzliste aller Schwefelmetaboliten beschrieben für *Arabidopsis thaliana*


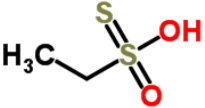
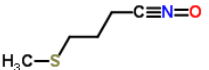
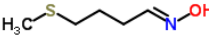
Schwefelmetabolit	Struktur	Summenformel	monoisotopie Masse	CAS ID	Chemspider ID	KEGG ID	Synonyms	Isomers (CAS/ChemSpider ID)
S ²⁻		S	31.972071	7704-34-9	4515054			
Hydrogen sulfide		H ₂ S	33.98772106	7783-06-4	391		Hydrogen sulfide	
methanethiol	$\text{H}_3\text{C}-\text{SH}$	CH ₄ S	48.00337112	74-93-1	855		Methanethiol, Methyl Mercaptan, methylsulfide, Thiomethane	


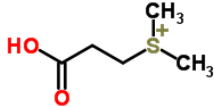
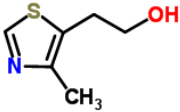
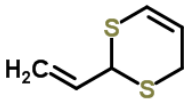
Thiocyanic acid		CH1NS	58.98297003	463-56-9	760		
thioacrolein		C3H4S	72.00337112	53439-64-8	126194		2-Propenethial, thioacrylaldehyde, thia- 1,3-butadiene, prop-2- enethial
Methyl isothiocyanate		C2H3NS	72.99862009	556-61-6	10694		Isothiocyanatomethan methyl thiocyanate (556-64-9/10695)
2-mercaptoethanol		C2H6OS	78.01393578	60-24-2	1512		Mercaptoethanol, 2- Sulfanylethanol, Monothioethylene glycol, β-Hydroxyethanethiol, β- Hydroxyethylmercaptan ethylsulfenate (-/20473703), dimethyl sulfoxide (67-68-5/659)

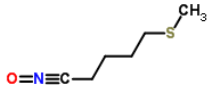
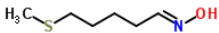
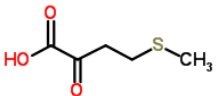
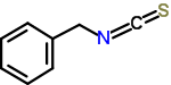
Sulfurous acid		H2O3S	81.97246486	7782-99-2	1069	Dihydrogen sulfite, bisulfite, dihydroxysulfoxide	
1-propenylsulfenate		C3H6OS	90.01393578		15421666	(E)-1-Propene-1-sulfenic acid	allylsulfenate (-/15261538), Propanethial S-oxide (32157-29- 2/390214), 1-Mercapto-2-propanone (24653-75-6/453707), S-Methyl thioacetate (1534-08-3/66391) , , (Methylthio)acetaldehyde (23328-62- 3/9063092)
methanesulfonate		CH4O3S	95.98811492	75-75-2	6155	Methanesulfonic acid	
Sulfate		H2O4S	97.96737946	7664-93-9	1086	Sulfuric acid	

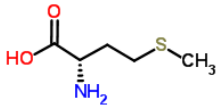
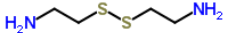
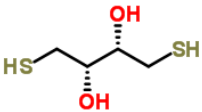
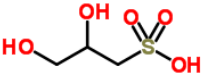
Allyl isothiocyanate		C4H5NS	99.01427015	57-06-7	21105854	3-isothiocyanatoprop-1-ene, 2-propenyl isothiocyanate, AITC	3-Thiocyanato-1-propene (764-49-8/21171732), 4-Methylthiazole (693-95-8/12224), 5-Methylthiazole (3581-89-3/121625), 3,4-Epithiobutanenitrile (58130-93-1/131180)
3-methylthiopropenal		C4H8OS	104.0295858	3268-49-3	17597	Methional	S-Ethyl thioacetate (625-60-5/55117), S-Methyl propanethioate (5925-75-7/455231), 3-Mercapto-2-butanone (40789-98-8/35442), (Methylthio)acetone (14109-72-9/4936052), 4-Mercapto-2-butanone 34619-12-0, tetrahydrothiophene sulfoxide (1600-44-8/1096)
3-Methylthiopropanol		C4H10OS	106.0452359	505-10-2	10016	methionol, (Methylmercapto)propyl alcohol	3-Mercapto-2-butanol (54812-86-1/55924), 4-Mercapto-2-butanol
thiourea dioxide		CH4N2O2S	107.9993483	1758-73-2	55213	Aminoiminomethanesulfonic acid, Formamidinesulfonic Acid, AIMS	

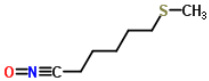
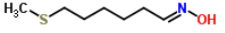
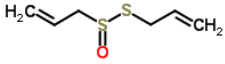
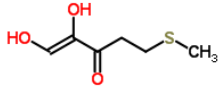
thiosulfate		H1O3S2	112.9367108	13686-28-7	22886	Thiosulfic acid
3-S-methylmercaptopropionate		C4H7O2S	119.0166754	646-01-5	547	4-Thiapentanoic acid, 3-(methylsulfanyl)propionic acid, 3-(Methylthio)propanoic acid
3-dimethylsulfoniopropionaldehyde		C5H11OS	119.0530609		21378581	dimethyl(3-oxopropyl)sulfonium
3-mercaptopyruvate		C3H4O3S	119.9881149	2464-23-5	96	3-mercapto-pyruvic acid, 2-Oxo-3-sulfanylpropanoic acid, β-thiopyruvate

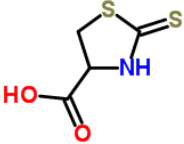
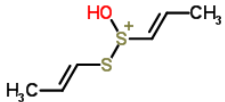
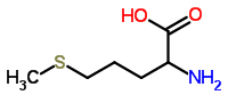
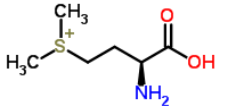
L-Cysteine		C3H7NO2S	121.0197494	3374-22-9	5653	cysteine
methylmethanethiosulfonate		C2H6O2S2	125.9809214	2949-92-0	5288902	Methyl methanethiosulfonate, Ethanesulfonothioic O- acid, 2- thioethanesulfonic acid
4-methylthiobutanonitrile oxide		C5H9NOS	131.0404849		24785674	[4- (Methylsulfanyl)butylidyn e]azane oxide
4-methylthiobutanaldoxime		C5H11NOS	133.0561349	/	24784893	4- Methylthiobutanaldoxime , (1E)-N-Hydroxy-4- (methylsulfanyl)-1- butanimine

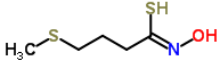
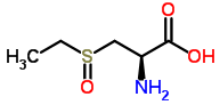

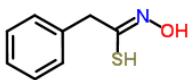
L-Homocysteine		C4H9NO2S	135.0353995	6027-13-0	82666	(2S)-2-Ammonio-4-sulfanylbutoanoate, 2-Amino-4-mercaptobutyric acid	S-Methyl-L-cysteine (1187-84-4/22826)
dimethylsulfonylpropionate		C5H11O2S	135.0479755	7314-30-9	22196	(2-Carboxyethyl)dimethylsulfonium, S,S-Dimethyl-beta-propiothetin	
4-methyl-5-(β-hydroxyethyl)thiazole		C6H9NOS	143.0404849	137-00-8	1104	Sulfuroil, 2-(4-Methylthiazole-5-yl)ethanol, 4-methyl-5-(2'-hydroxyethyl)-thiazole	2-Propionyl-2-thiazoline (29926-42-9/4934367), 5-Acetyl-2,3-dihydro-1,4-thiazine (164524-93-0/459257), (-)-5-(2-Propenyl)-2-oxazolidinethione (15216-29-2/2300696), Raphanusamide (104730-65-6/30777534), 5-(1-Hydroxyethyl)-4-methylthiazole (45657-12-3/505664)
2-vinyl-[4H]-1,3-dithin		C6H8S2	144.0067422	80028-57-5	117630	2-Vinyl-4H-1,3-dithiine	3-vinyl-[4H]-1,2-dithin , 3-(Methylthio)methylthiophene (61675-72-7/14787358)

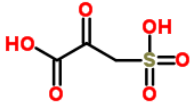
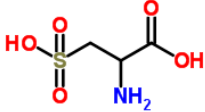
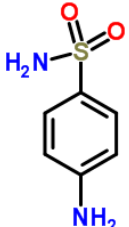

5-methylthiopentanitrile oxide		C6H11NOS	145.0561349		24785259	[5-(Methylsulfanyl)pentylidene]azane oxide,	
5-methylthiopentanaloxime		C6H13NOS	147.071785	/	24785237	(1E)-N-Hydroxy-5-(methylsulfanyl)-1-pentanimine	
2-oxo-4-methylthiobutanoate		C5H8O3S	148.019415	583-92-6	460	4-(Methylsulfanyl)-2-oxobutanoic acid, ketomethiobutyric acid, 2-keto-4-methylthiobutyric acid, 2-Oxo-4-methylthiobutyric acid	
benzylisothiocyanate		C8H7NS	149.0299202	622-78-6	2256	Benzyl isothiocyanate	Benzyl thiocyanate (3012-37-1/17163), 2-Methylbenzothiazole (120-75-2/8138)


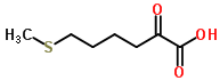
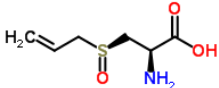
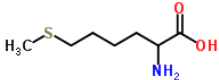
L-Methionine		C5H11NO2S	149.0510495	59-51-8	5907	2-Amino-4-methylthiobutanoate, (2S)-2-amino-4-(methylsulfanyl)butanoic acid
cystamine		C4H12N2S2	152.0441904	56-17-7	2812	2-((2-aminoethyl)dithio)ethylamine, 2,2'-Disulfanediyldiethanamine, 2,2'-Dithiobisethanamine
dithiothreitol		C4H10O2S2	154.0122215	6892-68-8	393541	(2S,3S)-1,4-Disulfanyl-2,3-butandiol, 1,4-Dithiothreitol
2,3-dihydroxypropane 1-sulfonate		C3H8O5S	156.0092442	10296-76-1	100440	2,3-Dihydroxy-1-propanesulfonic acid, 3-sulfopropanediol

6-methylthiohexanonitrile oxide		C7H13NOS	159.071785		24785403	[6-(Methylsulfanyl)hexylidyn e]azane oxide	
6-methylthiohexanaldoxime		C7H15NOS	161.0874351	/	24784873	(1E)-N-Hydroxy-6-(methylsulfanyl)-1-hexanimine	Ethiolate (2941-55-1/17058)
allicin		C6H10OS2	162.0173069	539-86-6	58548	Diallyldisulfaniumolate, 2-propene-1-sulfinothioic acid, S-2-propen-1-yl ester, S-Allyl prop-2-ene-1-sulfinothioate, allylthiosulfinate	S-2-Propenyl 1-propenesulfinothioate 134595-70-3, S-1-Propenyl 2-propenesulfinothioate 134568-42-6, R-2-Propenyl 1-propenesulfinothioate 143038-12-4, R-1-Propenyl 2-propenesulfinothioate 136516-39-7
1,2-dihydroxy-5-(methylthio)pent-1-en-3-one		C6H10O3S	162.0350651		4575316	1,2-dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene, (1Z)-1,2-Dihydroxy-5-(methylsulfanyl)-1-penten-3-one, 2-oxo-5-methylthiopentanoate, 5-(Methylsulfanyl)-2-oxopentanoate, 2-oxo-5-methylthiopentanoic-acid	5-(Methylthio)-2-oxo-pentanoic acid (-/11290589)


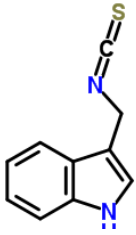
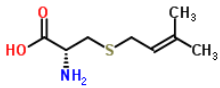
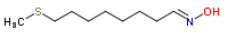
2-Thioxo1,3-thiazolidine-4-carboxylic acid		C4H5NO2S2	162.9761704	20933-67-9	2299167	Raphanusamic acid, TTCA, Thiazolidine-2- thione-4-carboxylic acid	2-Thiophenesulfonamide (6339-87- 3/65713)
thiosulfinate		C6H11OS2	163.0251319	/	24785038	1-Hydroxy-1,2-di[(1E)-1- propen-1-yl]disulfanium	
homomethionine		C6H13NO2S	163.0666996	/	9473123	5- (Methylsulfanyl)norvaline , 2-amino-5- (methylsulfanyl)pentanoi c acid	Ethionine (13073-35-3/5970), S- Propyl-L-cysteine (1115-93-1/92126), S-Methylpenicillamine (29913-84- 6/2339830)
S-methyl-L-methionine		C6H14NO2S	164.0745246	/	128519	(2S)-2-Ammonio-4- (dimethylsulfonio)butano ate, S-Methylmethionine, [(3S)-3-Amino-3- carboxypropyl](dimethyl) sulfonium	

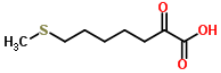
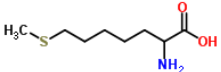

4-methylthiobutylhydroximate		C5H11NOS2	165.0282059	/	24784879	(1Z)-N-Hydroxy-4-(methylsulfanyl)butanimidothioic acid	
ethiin		C5H11NO3S	165.0459641	17795-08-3	129141	S-Ethylcysteine sulfoxide, 3-(Ethylsulfanyl)-L-alanine	2-amino-4-(methylsulfanyl)butanoic acid (3226-65-1/824)
thioguanine		C5H5N5S	167.0265662	154-42-7	2005804	2-Amino-1,9-dihydro-6H-purine-6-thione, 2-Amino-6-methoxy purine	
phenylacetothiohydroximate		C8H9NOS	167.0404849		2543884	(1Z)-N-Hydroxy-2-phenylethanimidothioic acid, N-hydroxy-2-phenylethanimidothioic acid	

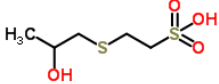
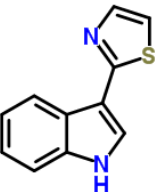
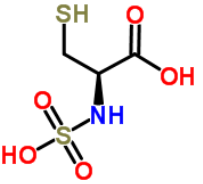

3-sulfopyruvate		C3H4O6S	167.9728587		389590	2-Oxo-3-sulfopropanoic acid, SPV, 2-O-sulfolactate
(R)-cysteate		C3H7NO5S	169.0044932		23942	3-Sulfoalanin, 2-Amino-3-sulfopropionate, Cysteic acid, CYA
sulfanilamide		C6H8N2O2S	172.0306484	63-74-1	5142	4-Aminobenzenesulfonamide, p-Aminobenzenesulfonamide
7-methylthioheptanonitrile oxide		C8H15NOS	173.0874351		24785095	[7-(Methylsulfanyl)heptylidene]azane oxide


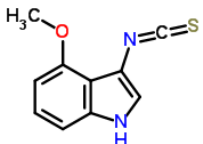
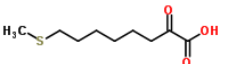
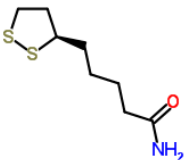
7-methylthioheptanaloxime		C8H17NOS	175.1030851	/	24785090	(1E)-N-Hydroxy-7-(methylsulfanyl)-1-heptanimine	
2-oxo-6-methylthiohexanoate		C7H12O3S	176.0507152		11290591	6-(Methylsulfanyl)-2-oxohexanoate, 2-oxo-6-methylthiohexanoic acid, 6-(Methylsulfanyl)-2-oxohexanoic acid	
alliin		C6H11NO3S	177.0459641	556-27-4	7850537	Allyl[(2R)-2-amino-2-carboxyethyl]sulfoniumolate, (S)-S-Allyl-L-cysteine sulfoxide, 3-[(S)-2-propenylsulfanyl]-L-Alanine	Isoalliin (23315-20-0/4444557), Cycloalliin (455-41-4/167735), N-Formylmethionine (4289-98-9/887),
Dihomomethionine		C7H15NO2S	177.0823497	/	198597	6-(Methylsulfanyl)norleucine, 2-Ammonio-6-(methylsulfanyl)hexanoate, 2-azaniumyl-6-(methylsulfanyl)hexanoate	

cysteinyglycine		C5H10N2O3S	178.0412131	19246-18-5	58762	[(2-ammonio-3-sulfanylpropanoyl)amino] acetate	
5-methylthiopentylhydroximate		C6H13NOS2	179.043856		24784710	N-Hydroxy-5-(methylsulfanyl)pentanet hioamide	
S-methyl-5-thio-D-ribose		C6H12O4S	180.0456298	23656-67-9	4925344	5-Deoxy-5-(methylthio)ribose	
L-methionine-D,L-sulphoximine		C5H12N2O3S	180.0568632	15985-39-4	80339	(2S)-2-Amino-4-(S-methylsulfonyl)buta noic acid	2S,5S-Methionine sulfoximine 21752-31-8

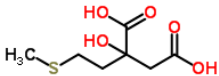
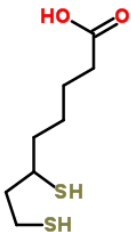
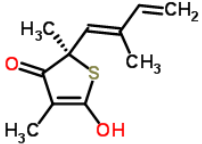
8-methylthiooctanonitrile oxide		C9H17NOS	187.1030851		24785113	[8-(Methylsulfanyl)octylidyn e]azane oxide	
indolymethylisothiocyanate		C10H8N2S	188.0408192		10709968	3-(Isothiocyanatomethyl)-1H-indole, indol-3-ylmethylisothiocyanate	
S-prenyl-L-cysteine		C8H15NO2S	189.0823497	/	20076	S-(3-Methyl-2-buten-1-yl)-L-cysteine, 3-[(3-Methyl-2-butenyl)thio]-L-alanine, 2-Amino-3-prenylmercaptopropionic acid, Prenisteinum	
8-Methylthiooctanaloxime		C9H19NOS	189.1187352	/	24785473	(1E)-N-Hydroxy-8-(methylsulfanyl)-1-octanimine	Epthame (759-94-4/12428)

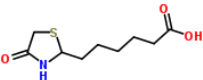
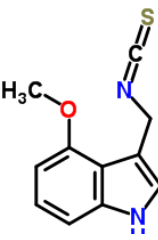
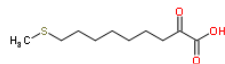
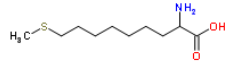
2-oxo-7-methylthioheptanoate		C8H14O3S	190.0663652		11290596	2-Oxo-7-methylthioheptanoic acid, 7-(Methylsulfanyl)-2-oxoheptanoic acid
trihomomethionine		C8H17NO2S	191.0979997	/	11290587	2-Amino-7-(methylsulfanyl)heptanoic acid, 2-ammonio-7-(methylsulfanyl)heptanoate
6-methylthiohexylhydroximate		C7H15NOS2	193.0595061		24785170	N-Hydroxy-6-(methylsulfanyl)hexanethioamide, berteroin
2-propenyl-thiohydroximate-O-sulfate		C4H7NO4S2	196.9816496			

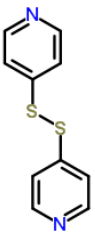
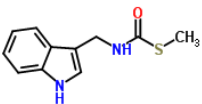

2-hydroxypropyl-CoM		C5H12O4S2	200.0177008	244301-87-9	3687045	2-[(2-Hydroxypropyl)sulfanyl]methanesulfonic acid	
Camalexin		C11H8N2S	200.0408192	135531-86-1	552646	3-(1,3-Thiazol-2-yl)-1H-indole	
S-sulfo-L-cysteine		C3H7NO5S2	200.9765642		19978575	Sulfocysteine	
9-methylthiononanonitrile oxide		C10H19NOS	201.1187352		24784910	[9-(Methylsulfanyl)nonylidene]azane oxide	

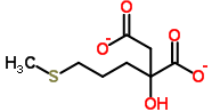
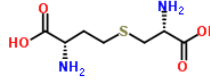
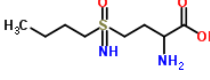
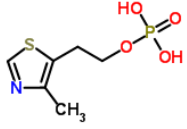
9-Methylthiononanaldoxime		C10H21NOS	203.1343852	/	24785710	(1E)-N-Hydroxy-9-(methylsulfanyl)-1-nonanimine	Pebulate (1114-71-2/13579), Vernolate (1929-77-7/15204)
Rapalexin A		C10H8N2OS	204.0357338		17260025	3-Isothiocyanato-4-methoxy-1H-indole	Sinalexin (-/30776933)
2-oxo-8-methylthiooctanoate		C9H16O3S	204.0820153		24808203	2-Oxo-8-methylthiooctanoic acid	
lipoamide		C8H15NOS2	205.0595061	940-69-2	5360246	Thioami, 5-[(3R)-1,2-Dithiolan-3-yl]pentanamide, vitamin N	1-Isothiocyanato-6-(methylsulfinyl)hexane (4430-35-7/7991398)

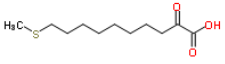
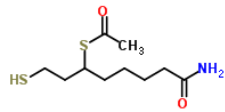
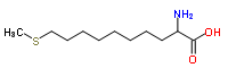

Tetrahomomethionine		C9H19NO2S	205.1136498	/	21865786	2-Amino-8-(methylsulfanyl)octanoic acid	
(R)-lipoate		C8H14O2S2	206.0435216	1200-22-2	5886	lipoic acid, 5-[(3R)-1,2-Dithiolan-3-yl]pentanoic acid	
indolylmethylthiohydroximate		C10H10N2OS	206.0513839		24785009	(1E)-2-(1H-Indol-3-yl)ethanehydroximate, 3-Indolylmethylthiohydroximate	
7-methylthioheptylhydroximate		C8H17NOS2	207.0751561		24785337	N-Hydroxy-7-(methylsulfanyl)heptanethioamide	dihydrolipoamide (3884-47-7/643)

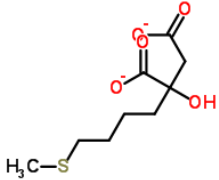
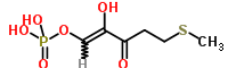
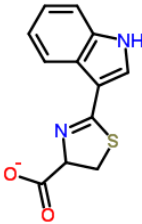
2-(2'-methylthio)ethylmalic-acid		C7H12O5S	208.0405444		21865721	2-(2-methylthioethyl)malate, 2-Hydroxy-2-[2-(methylsulfanyl)ethyl]succinate, 2-(2'-Methylthio)ethylmalic acid	3-(2'-methylthio)ethylmalic-acid (-/24808176)
dihydrolipoate		C8H16O2S2	208.0591717	462-20-4	408	Dihydrolipoic acid, 6,8-disulfanyloctanoic acid	
thiolactomycin		C11H14O2S	210.0714506	82079-32-1	393212	(2R)-5-hydroxy-2,4-dimethyl-2-[(1E)-2-methylbuta-1,3-dien-1-yl]thiophen-3(2H)-one	
3-butenyl-thiohydroximate-O-sulfate		C5H9NO4S2	210.9972997				

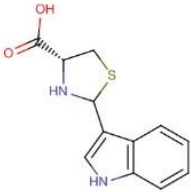
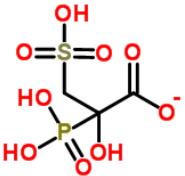
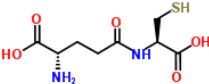
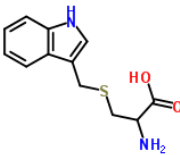
acidomycin		C9H15NO3S	217.0772643		84986	4-Thiazolidone-2-caproic Acid	
4-methoxy-3-indolylmethylisothiocyanate		C11H10N2OS	218.0513839		10709969	3-(Isothiocyanatomethyl)-4-methoxy-1H-indole	3-(Isothiocyanatomethyl)-1-methoxy-1H-indole 126769-93-5
2-oxo-9-methylthiononanoate		C10H18O3S	218.0976653		24808175	9-(Methylsulfanyl)-2-oxononanoate, 9-(Methylsulfanyl)-2-oxononanoic acid, 2-Oxo-9-methylthiononanoic acid	
Pentahomomethionine		C10H21NO2S	219.1292998		21865787	2-Amino-9-(methylsulfanyl)nonanoic acid	

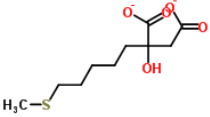
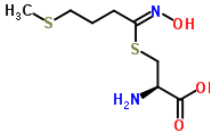
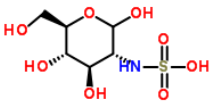
4,4'-dithiodipyridine		C10H8N2S2	220.0128902	2645-22-9	68355	4-Pyridin-4-yl disulfanyldipyridine, 4,4'- disulfaneyldipyridine	
Brassitin		C11H12N2OS	220.067034	113866-42-5	8211978	S-methyl (1H-indol-3-ylmethyl)carbamothioate, N-(1H-indol-3-ylmethyl)methylsulfanylfo rmmamide	4-Hydroxylevamisole (69359-04-2/111848)
8-methylthiooctylhydroximate		C9H19NOS2	221.0908062		24785556	N-Hydroxy-8- (methylsulfanyl)octanethi oamide	
sulfo-aldehyde intermediate		C6H6O7S	221.9834234				

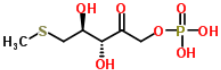
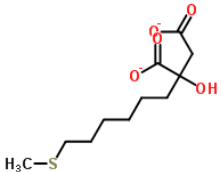
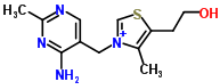
2-(3'-methylthio)propylmalate		C8H14O5S	222.0561944		24785708	2-Hydroxy-3-[3-(methylsulfanyl)propyl]succinic acid	3-(3'-methylthio)propylmalate (-/24785184)
L-Cystathionine		C7H14N2O4S	222.0674278	535-34-2	388392	(2S)-2-Amino-4-(((2R)-2-ammonio-2-carboxylatoethyl)sulfanyl)butanoate, S-[(2R)-2-Amino-2-carboxyethyl]-L-homocysteine	Cysteinyl-Threonine, Butoxycarboxim (34681-23-7/7845475), (Aldoxycarb 1646-88-4/7844561)
buthionine sulfoximine		C8H18N2O3S	222.1038133	5072-26-4	19896	2-Amino-4-(S-butylsulfonimidoyl)butanoic acid, 2-amino-4-(S-butylsulfonimidoyl)butyric acid	
4-methyl-5-(2-phosphonoxyethyl)thiazole		C6H10NO4PS	223.0068153		11105	2-(4-Methyl-1,3-thiazol-5-yl)ethyl dihydrogen phosphate	

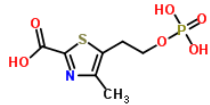
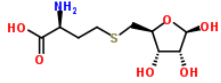
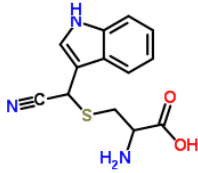
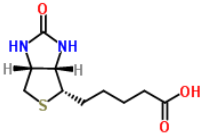
2-oxo-10-methylthiodecanoate		C11H20O3S	232.1133154		24808082	2-Oxo-10-methylthiodecanoic acid, 10-(Methylsulfanyl)-2-oxodecanoic acid
S-acetyldihydrolipoamide		C10H19NOS2	233.0908062		1046	S-(8-Amino-8-oxo-1-sulfanyl-3-octanyl)ethanethioate, 6-S-Acetyldihydrolipoamide
Hexahomomethionine		C11H23NO2S	233.1449499	/	21865788	2-Amino-10-(methylsulfanyl)decanoic acid, 2-ammonio-10-(methylsulfanyl)decanoate
9-methylthionylhydroximate		C10H21NOS2	235.1064562		24784704	N-Hydroxy-9-(methylsulfanyl)nonanethioamide

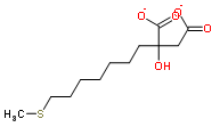

2-(4'-methylthio)butylmalate		C9H16O5S	236.0718445		24784696	2-Hydroxy-2-[4-(methylsulfanyl)butyl]succinate, 2-(4'-methylthio)butylmalic acid	3-(4'-methylthio)butylmalate (-/24785430)
2-hydroxy-5-(methylthio)-3-oxopent-1-enyl phosphate		C6H11O6PS	242.0013955		40	(1Z)-2-Hydroxy-5-(methylsulfanyl)-3-oxo-1-penten-1-yl dihydrogen phosphate, 1-phosphoryloxy-2-hydroxy-3-keto-5-methylthiopentene,	5-(methylthio)-2,3-dioxopentyl phosphate (-/545)
dihydrocamalexate		C12H10N2O2S	246.0462985		24785755	2-(indole-3-yl)-4,5-dihydro-1,3-thiazole-4-carboxylic acid	
benzylglucosinolate aglycone		C8H9NO4S2	246.9972997				

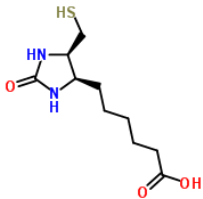
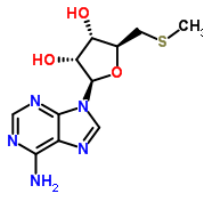
2-(1H-indol-3-yl)-, (4R)-4-Thiazolidinecarboxylic acid		C12H12N2O2S	248.0619486	849052-64-8			
(RS)-phospho-3-sulfolactate		C3H7O9PS	249.9548392		20059520	2-phosphosulfolactate, phospho-3-sulfolactic acid	
L-γ-glutamylcysteine		C8H14N2O5S	250.0623424	636-58-8	110467	L-gamma-Glutamyl-L-cysteine, (2S)-2-amino-4-[[[(1R)-1-carboxy-2-sulfanylethyl]carbonyl]butanoic acid	
indol-3-ylmethyl-cysteine		C12H14N2O2S	250.0775986		24785222	S-(1H-Indol-3-ylmethyl)cysteine	Methoxybrassitin (113900-63-3/28674925)

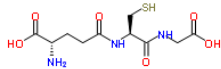
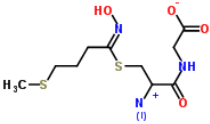
2-(5'-methylthio)pentylmalate		C10H18O5S	250.0874945		24784928	2-(5'-methylthio)pentylmalic acid, 2-Hydroxy-2-[5-(methylsulfanyl)pentyl]succinate	3-(5'-methylthio)pentylmalate (-/24784692)
S-(4-methylthiobutylhydroximoyl)-L-cysteine		C8H16N2O3S2	252.0602343	/	30791703	S-[(1Z)-N-Hydroxy-4-(methylsulfanyl)butanimidoyl]-L-cysteine	Cysteinyl-Methionine (-/16568286)
S-(phenylacetothiohydroximoyl)-L-cysteine		C11H14N2O3S	254.0725132	/			Acetaminophen-cysteine 64014-06-8
N-sulfo-D-glucosamine		C6H13NO8S	259.0361872		399503	2-Deoxy-2-(sulfoamino)-D-glucopyranose, Glucosamine-2-sulfate	

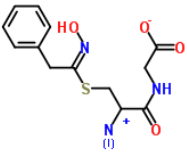
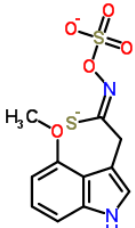
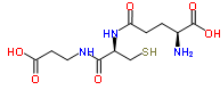
5-methylthioribulose-1-phosphate		C6H13O7PS	260.0119602	86316-83-8	152225	5-methylthio-5-deoxy-D-ribulose-1-phosphate, {{{(3R,4S)-3,4-dihydroxy-5-(methylsulfanyl)-2-oxopentyl}oxy}phosphonic acid	S-methyl-5-thio-α-D-ribose 1-phosphate
2-(6'-methylthio)hexylmalate		C11H20O5S	264.1031446		24785361	2-(6'-Methylthio)hexylmalic acid, 2-Hydroxy-2-[6-(methylsulfanyl)hexyl]succinate	3-(6'-methylthio)hexylmalate (-/24784950)
thiamin		C12H17N4OS	265.1123071		1098	Vitamin B1, 3-[(4-Amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl]-5-(2-hydroxyethyl)-4-methyl-1,3-thiazol-3-ium	
S-5-methylthiopentylhydroximoyl-L-cysteine		C9H18N2O3S2	266.0758843				

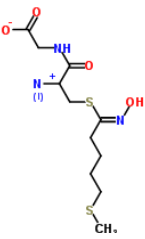
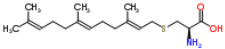
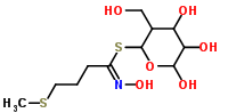
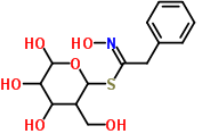
2-(2-carboxy-4-methylthiazol-5-yl)ethyl phosphate		C7H10NO6PS	266.9966445		25056989	4-Methyl-5-[2-(phosphonoxy)ethyl]-1,3-thiazole-2-carboxylic acid	
S-ribosyl-L-homocysteine		C9H17NO6S	267.0776581	15912-98-8	389052	(2S)-2-Amino-4-(((2S,3S,4R,5R)-3,4,5-trihydroxytetrahydro-2-furanyl)methyl)sulfanyl)butanoic acid	
indole-3-acetonitrile-cysteine		C13H13N3O2S	275.0728476		28532787	S-[Cyano(1H-indol-3-yl)methyl]cysteine, Cys(IAN)	
Biotin		C10H16N2O3S2	276.0602343	58-85-5	149962	5-[(3aS,4S,6aR)-2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl]pentanoic acid	

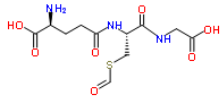
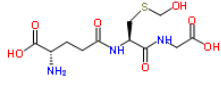
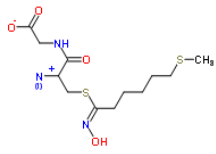
4-hydroxy-2-nonenal-[L-Cys] conjugate		C12H23NO4S	277.1347791				
5-hydroxyindole thiazolidine carboxylate		C13H14N2O3S	278.0725132				5-Amino-2-p-toluidinobenzenesulfonic acid (-/60038)
2-(7'-methylthio)heptylmalate		C12H22O5S	278.1187947		24785589	2-(7'-Methylthio)heptylmalic acid, 2-Hydroxy-2-[7-(methylsulfanyl)heptyl]succinate	3-(7'-methylthio)heptylmalate (-/24785513)
S-6-methylthiohexylhydroximoyl-L-cysteine		C10H20N2O3S2	280.0915344				
indolymethyl glucosinolate aglycone		C10H8N2O4S2	283.9925486		24785746	indol-3-ylacetothiohydroxamate-O-sulfonate	

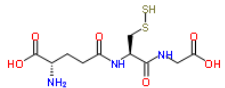
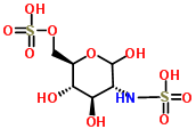
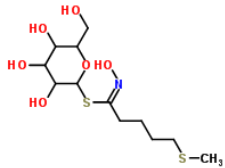
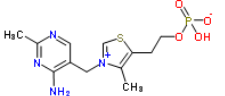
12-hydroxyjasmonate sulfate		C12H18O6S	290.0824091				
S-(indolylmethylthiohydroximoyl)-L-cysteine		C13H15N3O3S	293.0834123	/			
9-mercaptodethiobiotin		C10H18N2O6S	294.0885571		166932	6-[(4R,5R)-2-Oxo-5-(sulfanylmethyl)-4-imidazolidinyl]hexanoic acid	
S-7-methylthioheptylhydroximoyl-L-cysteine		C11H22N2O3S2	294.1071845				
S-methyl-5'-thioadenosine		C11H15N5O3S	297.0895603		388321	1-(6-amino-9H-purin-9-yl)-1-deoxy-5-S-methyl-5-thio-β-D-Ribofuranose, 5'-Deoxy-5'-(methylthio)adenosine	

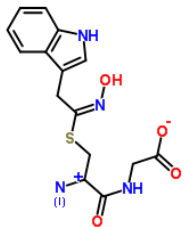
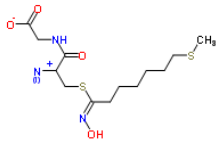
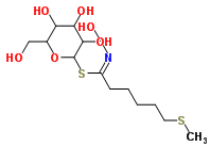
11-hydroxyjasmonate sulfate		C12H18O7S	306.0773237				
indole-3-acetyl-methionine		C15H18N2O3S	306.1038133				
L-Glutathione		C10H17N3O6S	307.0838061	70-18-8	111188	L-γ-glutamylcysteinylglycine	
S-8-methylthiooctylhydroximoyl-L-cysteine		C12H24N2O3S2	308.1228345				
4-methylthiobutylhydroximoyl-cysteinylglycine		C10H19N3O4S2	309.081698		24785001	[(2-Ammonio-3-((1E)-N-hydroxy-4-(methylsulfanyl)butanimidoyl)sulfanyl)propanoyl)amino]acetate	Met Gly Cys

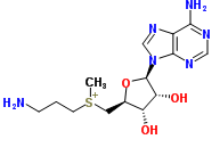
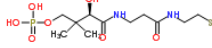
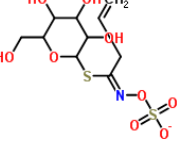
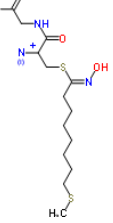
phenylacetohydroximoyl-cysteinylglycine		C13H17N3O4S	311.0939769		24785574	[(2-Ammonio-3-[[[(1E)-N-hydroxy-2-phenylethanimidoyl]sulfonyl]propanoyl]amino]acetate, N-[(S-(Z)-phenylacetohydroximoyl)-L-cysteinyl]glycine	
4-methoxy-3-indolylmethyl glucosinolate aglycone		C11H12N2O5S2	316.0187634		24784755		
homoglutathione		C11H19N3O6S	321.0994562		389334	L-γ-Glutamyl-L-cysteinyl-β-alanine	
S-9-methylthionylhydroximoyl-L-cysteine		C13H26N2O3S2	322.1384846				

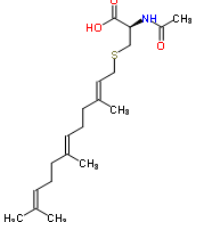
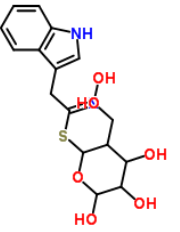
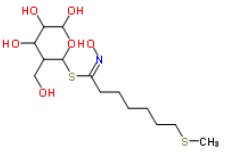
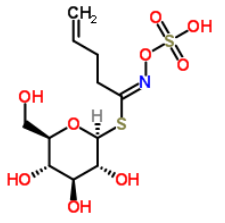
5-methylthiopentylhydroximoyl-cysteinyglycine		C11H21N3O4S2	323.097348		24784657	[(2-Ammonio-3-[(1Z)-N-hydroxy-5-(methylsulfanyl)pentanimidoyl]sulfanyl)propanoyl]amino]acetate	Met Ala Cys, Val Cys Cys
S-(2E,6E)-farnesyl-L-cysteine		C18H31NO2S	325.2075501	68000-92-0	4942854	(2R)-2-Ammonio-3-[[[(2E,6E)-3,7,11-trimethyl-2,6,10-dodecatrien-1-yl]sulfanyl]propanoate	
3-methylthiopropyl-desulfoglucosinolate		C11H21NO6S2	327.0810292	/	24785621	4,5,6-Trihydroxy-3-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl (1Z)-N-hydroxy-4-(methylsulfanyl)butanimidothioate	
benzyl-desulfoglucosinolate		C14H19NO6S	329.0933082		24785338	4,5,6-Trihydroxy-3-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl (1Z)-N-hydroxy-2-phenylethanimidothioate, Desulfoglucotropeolin	

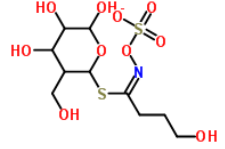
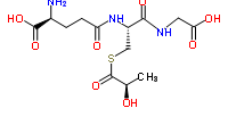
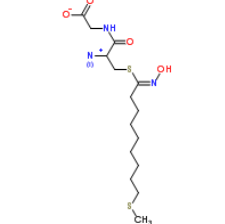
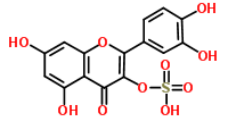
4-hydroxy-2-nonenal-[Cys-Gly] conjugate		C14H26N2O5S	334.1562428				
S-formylglutathione		C11H17N3O7S	335.0787207		164320	L-γ-Glutamyl-S-formyl-L-cysteinylglycine	
S-hydroxymethylglutathione		C11H19N3O7S	337.0943708		394301	L-γ-glutamyl-S-(hydroxymethyl)-L-cysteinylglycine, (2S)-2-amino-4-[[[(1R)-1-[(carboxymethyl)carbamoyl]-2-[(hydroxymethyl)sulfanyl]ethyl]carbamoyl]butanoic acid	
6-methylthiohexylhydroximoyl-cysteinylglycine		C12H23N3O4S2	337.1129981		24784785	[[[2-Ammonio-3-[[[(1E)-N-hydroxy-6-(methylsulfanyl)hexanimidoyl]sulfanyl]propanoyl]amino]acetate	Cys Cys Leu, Ile Cys Cys, Gly Met Met

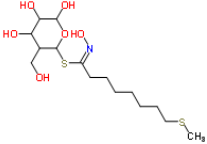
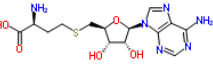
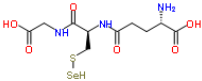
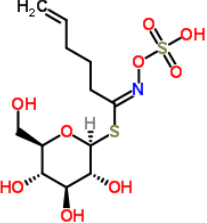
S-sulfanylgutathione		C10H16N3O6S2	338.0480521		23107089	L-γ-Glutamyl-3-disulfanyl-L-alanylglycine, L-γ-glutamyl-3-dithio-L-alanylglycine	
N,3-O-disulfo-D-glucosamine		C6H13NO11S2	338.993002		389118	2-Deoxy-6-O-sulfo-2-(sulfoamino)-D-glucofuranose	N,6-O-disulfo-D-glucosamine (-/89118)
4-methylthiobutyl desulfoglucosinolate		C12H23NO6S2	341.0966793	/	24784933	1-S-[(1Z)-N-Hydroxy-5-(methylsulfanyl)pentanimidoyl]-1-thiohexopyranose	
thiamin phosphate		C12H19N4O4PS	346.0864626		2627905	2-{3-[(4-Amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl]-4-methyl-1,3-thiazol-3-ium-5-yl}ethyl hydrogen phosphate	

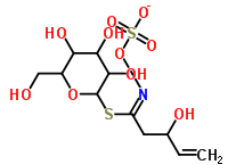
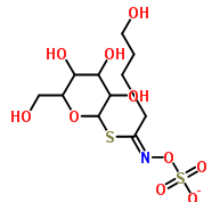
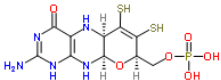
1,2-di-S-octyl-1,2-dimercapto-3-propanol		C19H40OS2	348.2520578				
indole-3-acetohydroximoyl-cysteinylglycine		C15H18N4O4S	350.1048759		24784877	[(2-Ammonio-3-[[[(1E)-N-hydroxy-2-(1H-indol-3-yl)ethanimidoyl]sulfanyl]propanoyl]amino]acetate	
7-methylthioheptylhydroximoyl-cysteinylglycine		C13H25N3O4S2	351.1286482		24784725	[(2-Ammonio-3-[[[(1E)-N-hydroxy-7-(methylsulfanyl)heptanimidoyl]sulfanyl]propanoyl]amino]acetate	Ala Met Met, Cys Met Val
5-Methylthiopentyl-desulfoglucosinolate		C13H25NO6S2	355.1123294		24785633	1-S-[[[(1Z)-N-Hydroxy-6-(methylsulfanyl)hexanimidoyl]-1-thiohexopyranose	

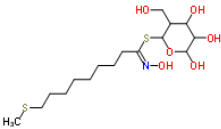
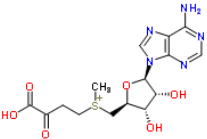
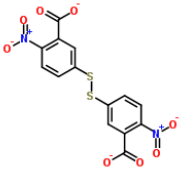
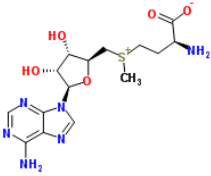
S-adenosyl-L-methioninamine		C14H24N6O3S	356.1630595		388529	S-Adenosylmethioninamine, (3-Aminopropyl)[[(2S,3S,4R,5R)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxytetrahydro-2-furanyl]methyl]methylsulfonium	
4'-Phosphopantetheine		C11H23N2O7PS	358.0963585	2226-71-3	103123	N3-[(2R)-2-Hydroxy-3,3-dimethyl-4-(phosphonoxy)butanoyl]-N-(2-sulfanylethyl)-β-alaninamide, D-Pantetheine 4'-phosphate	D-Pantetheine 4'-phosphate
2-propenyl-glucosinolate		C10H17NO9S2	359.0344729	3952-98-5	24785512	Sinigrin, 1-S-[(1E)-N-(Sulfonatoxy)-3-butenimidoyl]-1-thiohexopyranose	
8-methylthiooctylhydroximoyl-cysteinylglycine		C14H27N3O4S2	365.1442982		24785601	[(2-Ammonio-3-[(1Z)-N-hydroxy-8-(methylsulfanyloctanimidoyl)sulfanyl]propanoyl)amino]acetate	Met Leu Cys, Cys Met Ile

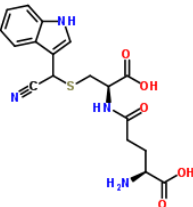
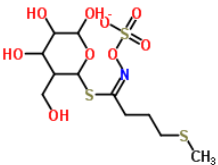
N-acetyl-farnesylcysteine		C20H33NO3S	367.2181148	135304-07-3	4942862	N-Acetyl-L-farnesylcysteine, N-Acetyl-S-[(2E,6E)-3,7,11-trimethyl-2,6,10-dodecatrien-1-yl]-L-cysteine	
3-Indolylmethylsulfoglucosinolate		C16H20N2O6S	368.1042072	/	24785121	4,5,6-Trihydroxy-3-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl (1E)-N-hydroxy-2-(1H-indol-3-yl)ethanimidothioate	(S)-N-[3-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-2-(mercaptomethyl)-1-oxopropyl]-(-S)-alanine (-/4575337)
6-methylthiohexylsulfoglucosinolate		C14H27NO6S2	369.1279794	/	24785709	4,5,6-Trihydroxy-3-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl (1Z)-N-hydroxy-7-(methylsulfanyl)heptanimidothioate	
3-butenylglucosinolate		C11H19NO9S2	373.050123	/	7827543	Gluconapin, 1-S-[(1E)-N-(Sulfooxy)-4-pentenimidoyl]-1-thio-β-D-glucopyranose, 1-Thio-β-D-glucopyranose 1-(N-(sulfooxy)-4-pentenimidate)	

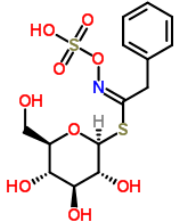
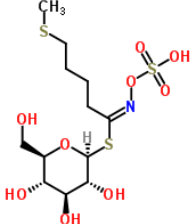
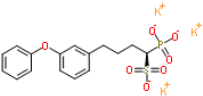
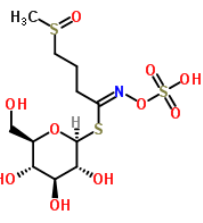
3-Hydroxypropyl glucosinolate		C10H19NO10S2	377.0450376		24785062	<p>{{(Z)-(4-Hydroxy-1- [4,5,6-trihydroxy-3- (hydroxymethyl)tetrahydr o-2H-pyran-2- yl]sulfanyl)butylidene)am ino[oxy]sulfonyl)oxidanid e</p>	2-Hydroxypropyl glucosinolate (76265-21-9/-)
S-lactoyl-glutathione		C13H21N3O8S	379.1049354		389032	<p>S-Lactoylglutathione, L- γ-Glutamyl-S-[(2R)-2- hydroxypropanoyl]-L- cysteinylglycine</p>	
9-methylthiononylhydroximoyl-cysteinylglycine		C15H29N3O4S2	379.1599483		24785420	<p>[(2-Ammonio-3-[(1Z)-N- hydroxy-9- (methylsulfanyl)nonanimi doyl]sulfanyl)propanoyl)a mino]acetate</p>	Met Met Val
quercetin 3-sulfate		C15H10O10S	381.9994673	60889-05-6	4444061	<p>2-(3,4-dihydroxyphenyl)- 5,7-dihydroxy-4-oxo-4H- chromen-3-yl hydrogen sulfate, Quercetin 3-O- sulfate</p>	

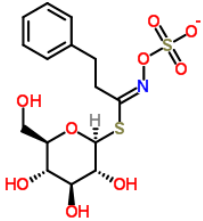
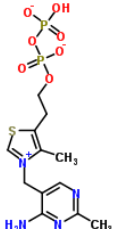
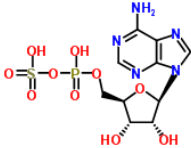
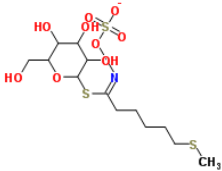
7-methylthioheptyldesulfoglucosinolate		C15H29NO6S2	383.1436295		24784745	4,5,6-Trihydroxy-3-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl (1Z)-N-hydroxy-8-(methylsulfanyl)octanimidothioate	
S-Adenosyl-L-homocysteine		C14H20N6O5S	384.1215886	979-92-0	388301	5'-S-[(3S)-3-Ammonio-3-carboxylatopropyl]-5'-thioadenosine, (2S)-2-Amino-4-(((2S,3S,4R,5R)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxytetrahydro-2-furanyl)methyl)sulfanyl)butanoic acid	
glutathioselenol		C10H17N3O6SSe	387.0003251		28532780	L-γ-Glutamyl-S-selanyl-L-cysteinylglycine	
4-pentenylglucosinolate		C12H21NO9S2	387.065773		7827551	1-S-[(1E)-N-(Sulfooxy)-5-hexenimidoyl]-1-thio-β-D-glucopyranose	

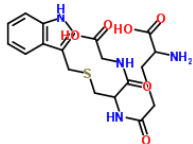
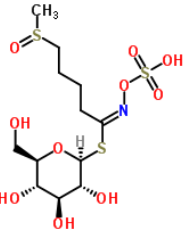
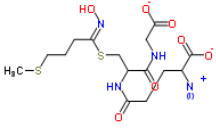
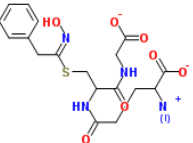
2-hydroxy-3-butenylglucosinolate		C11H19NO10S2	389.0450376	585-95-5	13302945	1-S-[(1Z)-3-Hydroxy-N-(sulfonatoxy)-4-pentenimidoyl]-1-thiohexopyranose, Progoitrin	
4-Hydroxybutylglucosinolate		C11H21NO10S2	391.0606876		24785553	1-S-[(1E)-5-Hydroxy-N-(sulfonatoxy)pentanimidoyl]-1-thiohexopyranose	Glucoconringiin (28463-28-7/570912)
molybdopterin		C10H14N5O6PS2	395.0123116		392290	[(5aR,8R,9aR)-2-Amino-4-oxo-6,7-disulfanyl-1,5,5a,8,9a,10-hexahydro-4H-pyrano[3,2-g]pteridin-8-yl]methyl dihydrogen phosphate	
isorhamnetin 3-sulphate		C16H12O10S	396.0151174				

8-methylthiooctylDesulfoglucosinolate		C16H31NO6S2	397.1592795		24785190	4,5,6-Trihydroxy-3-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl (1Z)-N-hydroxy-9-(methylsulfanyl)nonanimidothioate	
S-adenosyl-4-methylthio-2-oxobutanoate		C15H21N5O6S	399.1212542	22365-11-3	389303	{{[(2S,3S,4R,5R)-5-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxytetrahydro-2-furanyl]methyl}(3-carboxy-3-oxopropyl)methylsulfonium, (3-carboxy-3-oxopropyl)(5'-deoxyadenosin-5'-yl)(methyl)sulfonium	
5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoate		C14H12N2O8S2	400.0035072		5367523	3,3'-Disulfanediybis(6-nitrobenzoate), DTNB	
S-Adenosyl-L-methionine		C15H24N6O5S	400.1528887	29908-03-0	31982	(2S)-2-Amino-4-[[[(2S,3S,4R,5R)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxytetrahydro-2-furanyl]methyl](methyl)sulfonio]butanoate	

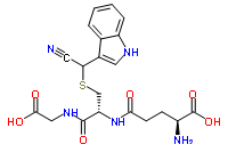
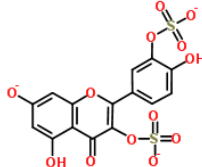
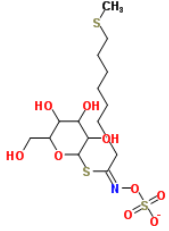
R-4'-phosphopantothenyl-L-cysteine		C12H23N2O9PS	402.0861877			
indole-3-acetonitrile-γ-glutamylcysteine		C18H20N4O5S	404.1154406		28532790	L-γ-Glutamyl-S-[cyano(1H-indol-3-yl)methyl]-L-cysteine, 2-amino-4-[(1-carboxy-2-[[cyano(1H-indol-3-yl)methyl]sulfanyl)ethyl]carbonyl]butanoic acid
3-methylthiopropyl-glucosinolate		C11H21NO9S3	407.037844		24785313	glucoiberberin, [({(Z)-[4-(Methylsulfanyl)-1-[[4,5,6-trihydroxy-3-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl]sulfanyl]butylidene]amino)oxy)sulfonyl]oxidanide
2-Methylsulfinylethyl glucosinolate		C10H19NO10S3	409.0171086			

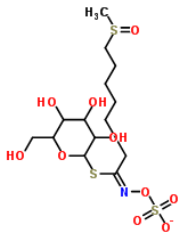
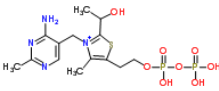
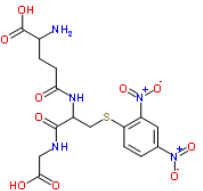
Benzylglucosinolate		C14H19NO9S2	409.050123	499-26-3	7827528	1-S-[(1E)-2-Phenyl-N-(sulfoxy)ethanimidoyl]-1-thio-β-D-glucopyranose, Glucotropeolin	
4-methylthiobutyl glucosinolate		C12H23NO9S3	421.0534941	21973-56-8	7827818	1-S-[(1E)-5-(Methylsulfanyl)-N-(sulfoxy)pentanimidoyl]-1-thio-β-D-glucopyranosato, Glucoerucin	
BPH-652		C16H16O7PSK	421.9991453		23334844	Tripotassium (1S)-4-(3-phenoxyphenyl)-1-phosphonato-1-butanesulfonate	
3-methylsulfinylpropyl-glucosinolate		C11H21NO10S3	423.0327586		5034737	1-S-[(1E)-4-(Methylsulfinyl)-N-(sulfonatoxy)butanimidoyl]-1-thiohexopyranose, Glucoiberin	

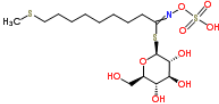
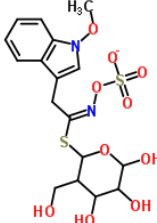
2-Phenylethylglucosinolate		C15H21NO9S2	423.065773	499-30-9	7827540	Gluconasturtiin, 1-S- [(1E)-3-Phenyl-N-(sulfonatoxy)propanimidoyl]-1-thio-β-D-glucopyranose	
thiamin diphosphate		C12H19N4O7P2S	425.044968		5010919		
Adenosine 5'-phosphosulfate		C10H14N5O10PS	427.019899	485-84-7	9821	Adenylyl sulfate, 5'-O- [(S)-Hydroxy(sulfoxy)phosphoryl]adenosine, 5'-Adenylyl sulfate (APS)	
5-Methylthiopentylglucosinolate		C13H25NO9S3	435.0691442	29611-01-6	24785396	1-S-[(1Z)-6-(Methylsulfanyl)-N-(sulfonatoxy)hexanimidoyl]-1-thiohexopyranose, glucoberberoi	

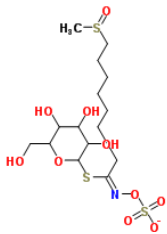
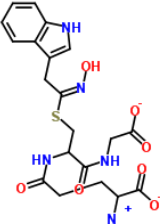
indol-3-ylmethyl-glutathione		C19H24N4O6S	436.1416553		24784874	γ -Glutamyl-S-(1H-indol-3-ylmethyl)cysteinylglycine	
4-methylsulfinylbutyl glucosinolate		C12H23NO10S3	437.0484087		7827557	glucoraphanin, 1-S-[(1E)-5-(Methylsulfinyl)-N-(sulfooxy)pentanimidoyl]-1-thio- β -D-glucopyranose	
4-methylthiobutylhydroximoyl-glutathione		C15H26N4O7S2	438.124291		24784786	2-Ammonio-5-[[1-[(carboxylatomethyl)amino]-3-[[[(1E)-N-hydroxy-4-(methylsulfanyl)butanimidoyl]sulfanyl]-1-oxo-2-propanyl)amino]-5-oxopentanoate	
phenylacetohydroximoyl-glutathione		C18H24N4O7S	440.1365699		24784769	2-Ammonio-5-[[1-[(carboxylatomethyl)amino]-3-[[[(1E)-N-hydroxy-2-phenylethanimidoyl]sulfanyl]-1-oxo-2-propanyl)amino]-5-oxopentanoate, S-[(Z)-Phenylacetohydroximoyl]-L-glutathione	

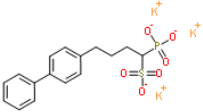
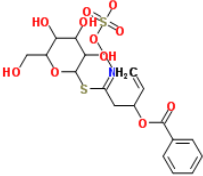
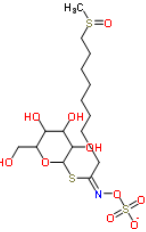
indolylmethyl-glucosinolate		C16H20N2O9S2	448.061022	4356-52-9	24785359	Glucobrassicin, [(((E)-[2-(1H-Indol-3-yl)-1-[[4,5,6-trihydroxy-3-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl]sulfanyl]ethylidene]amino)oxy)sulfonyl]oxidanide	
6-methylthiohexylglucosinolate		C14H27NO9S3	449.0847942		24784712	[(((Z)-[7-(Methylsulfanyl)-1-[[4,5,6-trihydroxy-3-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl]sulfanyl]heptylidene]amino)oxy)sulfonyl]oxidanide	
5-Methylsulfinylpentyl glucosinolate		C13H25NO10S3	451.0640588	499-37-6	24784738	1-S-[(1Z)-6-(Methylsulfinyl)-N-(sulfonatoxy)hexanimidoyl]-1-thiohexopyranose, Glucosyllysin	
5-methylthiopentylhydroximoyl-glutathione		C16H28N4O7S2	452.139941		24784900	2-Ammonio-5-[(1-[[carboxylatomethyl]amino]-3-[[[(1Z)-N-hydroxy-5-(methylsulfanyl)pentanimidoyl]sulfanyl]-1-oxo-2-propanyl]amino]-5-oxopentanoate	

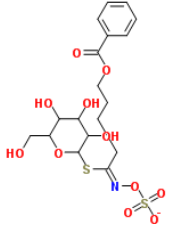
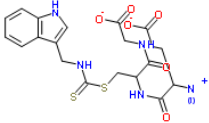
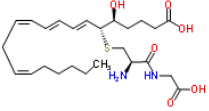
indole-3-acetonitrile-glutathione conjugate		C20H23N5O6S	461.1369043		28532785	IAN-glutathione, L-γ-Glutamyl-S-[cyano(1H-indol-3-yl)methyl]-L-cysteinylglycine	
quercetin-3,3'-bissulfate		C15H10O13S2	461.9562821		24808215	2-hydroxy-5-[5-hydroxy-7-oxido-4-oxo-3-(sulfonatoxy)-4H-chromen-2-yl]phenyl sulfate	quercetin-3,4'-bissulfate (-/24808230)
4-hydroxy-3-indolylmethyl-glucosinolate		C16H19N2O10S2	463.0481116				
7-methylthioheptyl glucosinolate		C15H29NO9S3	463.1004443		24785318	1-S-[(1E)-8-(Methylsulfanyl)-N-(sulfonatoxy)octanimido y]-1-thiohexopyranose	

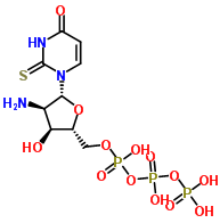
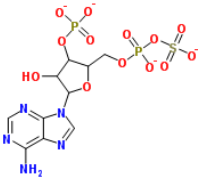
6-Methylsulfinylhexyl glucosinolate		C14H27NO10S3	465.0797088	33049-17-1	24784958	1-S-[(1E)-7-(Methylsulfinyl)-N-(sulfonatooxy)heptanimidoyl]-1-thiohexopyranose, glucohesperin
6-methylthiohexylhydroximoyl-glutathione		C17H30N4O7S2	466.1555911			
2-(α -hydroxyethyl)thiamine diphosphate		C14H23N4O8P2S	469.0711827		389468	2-Hydroxyethyl-ThPP, 3-[[4-Amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl]-2-(1-hydroxyethyl)-5-(2-[[hydroxy(phosphonoxy)phosphoryl]oxy)ethyl)-4-methyl-1,3-thiazol-3-ium
2,4-dinitrophenyl-S-glutathione		C16H19N5O10S	473.0652626		246412	γ -glutamyl-S-(2,4-dinitrophenyl)cysteinylglycine, 2-Amino-4-[1-(carboxymethyl-carbamoyl)-2-(2,4-dinitro-phenylsulfanyl)-ethylcarbamoyl]-butyric acid

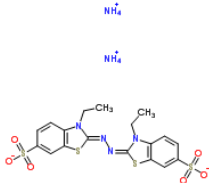
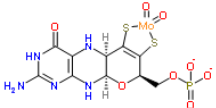
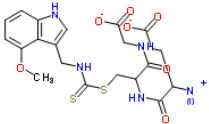
4-hydroxy-2-nonenal-glutathione conjugate		C20H33N3O8S	475.1988358				
isorhamnetin 3, 4'-bisulphate		C16H12O13S2	475.9719322				
8-Methylthio-octyl glucosinolate		C16H31NO9S3	477.1160943	/	30791698	C17254	1-S-[(1E)-9-(Methylsulfanyl)-N-(sulfoxy)nonanimidoyl]-1-thiohexopyranose
1-methoxy-3-indolylmethyl-glucosinolate		C17H22N2O10S2	478.0715867		24784671		[[[(E)-[2-(1-Methoxy-1H-indol-3-yl)-1-[[4,5,6-trihydroxy-3-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl]sulfanyl]ethylidene]amino]oxy)sulfonyl]oxidanide, Neoglucobrassicin 4-methoxy-3-indolylmethyl-glucosinolate

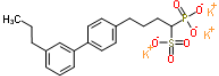
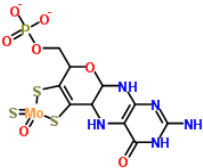
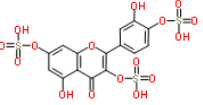
7-(Methylsulfinyl)heptyl glucosinolate		C15H29NO10S3	479.0953589		24784931	1-S-[(1E)-8-(Methylsulfinyl)-N-(sulfonatooxy)octanimidoyl]-1-thiohexopyranose
indole-3-acetohydroximoyl-glutathione		C20H25N5O7S	479.147469		24785191	2-Ammonio-5-[(1-[(carboxylatomethyl)amino]-3-[[[(1E)-N-hydroxy-2-(1H-indol-3-yl)ethanimidoyl]sulfanyl]-1-oxo-2-propanyl)amino]-5-oxopentanoate
7-methylthioheptylhydroximoyl-glutathione		C18H32N4O7S2	480.1712412			
3-benzoyloxypropyl-glucosinolate		C17H23NO11S2	481.0712523			glucomalcommin

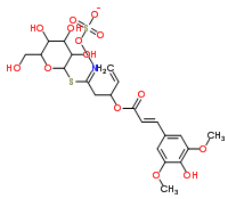
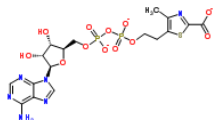
BPH-700		C16H16O6PSK3	483.9316507		23334958		Tripotassium 4-(4-biphenyl)-1-phosphonato-1-butanesulfonate
2-benzoyloxy-3-butenylglucosinolate		C18H23NO11S2	493.0712523		24785263		1-S-[(1Z)-3-(Benzoyloxy)-N-(sulfonatoxy)-4-pentenimidoyl]-1-thiohexopyranose
8-Methylsulfinyloctyl glucosinolate		C16H31NO10S3	493.1110089		24785753		1-S-[(1E)-9-(Methylsulfinyl)-N-(sulfonatoxy)nonanimidoyl]-1-thiohexopyranose, Glucohirsutin
8-methylthiooctylhydroximoyl-glutathione		C19H34N4O7S2	494.1868912				

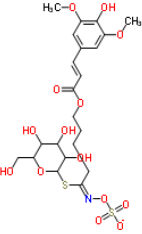
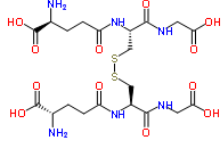
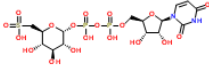
4-benzoyloxybutylglucosinolate		C18H25NO11S2	495.0869024		24784943	1-S-[(1E)-5-(Benzoyloxy)-N-(sulfonatoxy)pentanimidoyl]-1-thiohexopyranose	
indol-3-ylmethylisothiocyanate-glutathione		C20H25N5O6S2	495.1246254		24785446	4-Ammonio-5-[[1-[(carboxylatomethyl)amino]-3-[[[(1H-indol-3-ylmethyl)carbamothioyl]sulfanyl]-1-oxo-2-propanyl)amino]-5-oxopentanoate	
leukotriene-D4		C25H40N2O6S	496.2607078	73836-78-9	4444401	S-[(4S,5R,6E,8E,10Z,13Z)-1-Carboxy-4-hydroxy-6,8,10,13-nonadecatetraen-5-yl]-L-cysteinylglycine, 5S-hydroxy-6R-(S-cysteinylglycyl)-7E,9E,11Z,14Z-eicosatetraenoic acid	

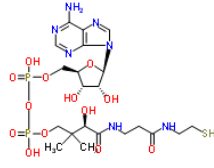
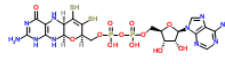
2-thiouridine 5'-triphosphate		C9H14N2O14P3S	498.9376586		17273791	1-[2-Amino-2-deoxy-5-O-(hydroxy[[hydroxy(phosphonoxy)phosphoryl]oxy)phosphoryl]-β-D-ribofuranosyl]-2-thioxo-2,3-dihydro-4(1H)-pyrimidinone, 2'-amino-2'-deoxy-2-thiouridine 5'-triphosphate	
3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate		C10H15N5O13P2S	506.9862295	482-67-7	3628121	PAPS, 9-(3-O-Phosphonato-5-O-[(sulfonatoxy)phosphinato]pentofuranosyl)-9H-purin-6-amine	2'-Phosphoadenylylsulfate, 3'-Phosphoadenylyl sulfate
9-methylthionylhydroximoyl-glutathione		C20H36N4O7S2	508.2025413				
24-epicathasterone-22-O-sulfate		C28H48O6S	512.31716				

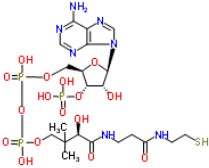
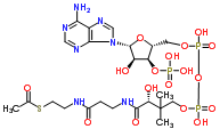
2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)		C18H18N4O6S4	514.0109181		8091143	(2Z)-3-Ethyl-2-[(2E)-(3-ethyl-6-sulfo-1,3-benzothiazol-2(3H)-ylidene)hydrazono]-2,3-dihydro-1,3-benzothiazole-6-sulfonic acid	
molybdenum cofactor		C10H12N5O8PS2Mo	522.8919018		28533519	[(5aR,8R,9aR)-2-amino-3,5,5a,8,9a,10-hexahydro-6,7-di(mercapto-κS)-[(phosphonooxy)methyl]-4H-pyrano[3,2-g]pteridin-4-onato(4-)]dioxo-Molybdate	
4-methoxy-3-indolylmethylisothiocyanate-glutathione		C21H27N5O7S2	525.13519		24785745	4-Ammonio-5-({1-[(carboxylatomethyl)amino]-3-({[(4-methoxy-1H-indol-3-yl)methyl]carbamoithiyl)sulfanyl)-1-oxo-2-propanyl}amino)-5-oxopentanoate	

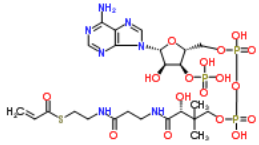
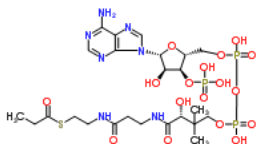
BPH--698		C19H22O6PSK3	525.9786009				Tripotassium 1-phosphonato-4-(3'-propyl-4-biphenyl)-1-butanesulfonate	
thio-molybdenum cofactor		C10H12N5O7PS3Mo	538.8690582		24785340		{[2-Amino-4-oxo-6,7-di(sulfanyl-κS)-1,5,5a,8,9a,10-hexahydro-4H-pyrano[3,2-g]pteridin-8-yl]methyl dihydrogenato(4-) phosphate}(oxo)thioxomolybdate	
quercetin 3, 7, 4'-trisulphate		C15H10O16S3	541.9130969		4444236		5-Hydroxy-2-[3-hydroxy-4-(sulfooxy)phenyl]-4-oxo-4H-chromene-3,7-diyl bis(hydrogen sulfate)	quercetin 3,3',7'-trissulfate (-/4444235)
sulfate disaccharide		C14H23NO18S2	557.0356545					

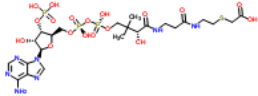
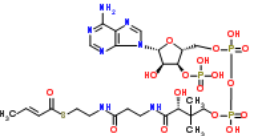
(22R,23R)-28-homocasterone-22-O-sulfate		C29H50O8S	558.3226393				
(22R,23R)-28-homobrassinolide-22-sulfate		C29H50O9S	574.3175539				
3-sinapoyloxypropylglucosinolate		C21H29NO14S2	583.1029463				
2-sinapoyloxy-3-butenylglucosinolate		C22H29NO14S2	595.1029463		24785694	1-S-[[[(1Z)-3-[[[(2E)-3-(4-Hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-2-propenoyl]oxy)-N-(sulfonatoxy)-4-pentenimidoyl]-1-thiohexopyranose	
2-carboxylate-4-methyl-5-beta-(ethyl adenosine 5-diphosphate) thiazole		C17H22N6O12P2S	596.0491641		4449975	5'-O-[[[2-(2-Carboxylato-4-methyl-1,3-thiazol-5-yl)ethoxy]phosphinato)oxy]phosphinato]adenosine, adenosine diphosphate, 5-(beta-ethyl)-4-methyl-thiazole-2-carboxylic acid	

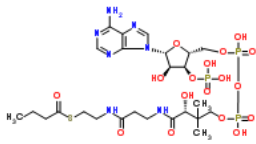
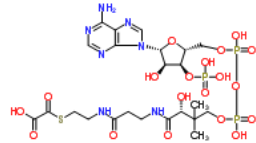
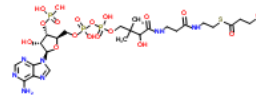
4-sinapoyloxybutylglucosinolate		C22H31NO14S2	597.1185963		24785529	1-S-[(1E)-5-[[[(2E)-3-(4-Hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-2-propenoyl]oxy]-N-(sulfonatooxy)pentanimidoyl]-1-thiohexopyranose
glutathione disulfide		C20H32N6O12S2	612.1519622	27025-41-8	58835	(2S,2'S)-5,5'-[Disulfaneyldisbis((2R)-3-[(carboxymethyl)amino]-3-oxo-1,2-propanediyl)imino)]bis(2-amino-5-oxopentanoic acid)
quercetin 3, 7, 3', 4'-tetrasulphate		C15H10O19S4	621.8699117			
UDP- α -D-sulfoquinovopyranose		C15H24N2O19P2S	630.0169203		391507	[(2S,3S,4S,5R,6R)-6-[[[[(2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-Dioxo-3,4-dihydro-1(2H)-pyrimidinyl)-3,4-dihydroxytetrahydro-2-furanyl]methoxy](hydroxy)phosphoryl]oxy](hydroxy)phosphoryl]oxy}-3,4,5-trihydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl]methanesulfonic acid

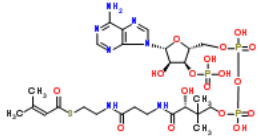
bisorganyltrisulfane		C20H32N6O12S3	644.1240332				
dephospho-CoA		C21H35N7O13P2S	687.1488781	3633-59-8	392407	3'-Depospho-CoA, [(2R,3S,4R,5R)-5-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxytetrahydro-2-furanyl]methyl (3R)-3-hydroxy-2,2-dimethyl-4-oxo-4-((3-oxo-3-[(2-sulfanylethyl)amino]propyl)amino)butyl dihydrogen diphosphate	
selenodiglutathione		C20H30N6O12S2Se	690.0528311				
adenylyl-molybdopterin		C20H26N10O12P2S2	724.0648312		26332851	5'-O-[[[[[(5aR,8R,9aR)-2-Amino-4-oxo-6,7-disulfanyl-1,5,5a,8,9a,10-hexahydro-4H-pyrano[3,2-g]pteridin-8-yl]methoxy)(hydroxy)phosphoryl]oxy)(hydroxy)phosphoryl]adenosine	
					C19848		

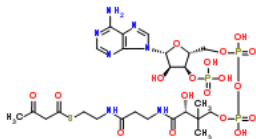
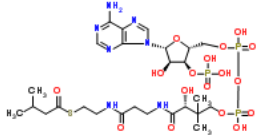
coenzyme A		C21H36N7O16P3S	767.1152085	85-61-0	79067	C00010	[(2R,3S,4R,5R)-5-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-4-hydroxy-3-(phosphonoxy)tetrahydro-2-furanyl]methyl (3R)-3-hydroxy-2,2-dimethyl-4-oxo-4-({3-oxo-3-[(2-sulfanylethyl)amino]propyl}amino)butyl dihydrogen diphosphate
formyl-CoA		C22H36N7O17P3S	795.1101231				
Acetyl-CoA		C23H38N7O17P3S	809.1257731	72-89-9	392413	C00024	adenosine, 5'-O-[[[(3R)-4-[[[3-[[2-(acetylthio)ethyl]amino]-3-oxopropyl]amino]-3-hydroxy-2,2-dimethyl-4-oxobutyl]oxy]hydroxyphosphinyl]oxy]hydroxyphosphinyl]-, 3'-(dihydrogen phosphate)

acrylyl-CoA		C24H38N7O17P3S	821.1257731		7821999	C00894	S-2-propenoate-CoA, Propenoyl-CoA, S-((9R)-1-[(2R,3S,4R,5R)-5-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-4-hydroxy-3-(phosphonoxy)tetrahydro-2-furanyl]-3,5,9-trihydroxy-8,8-dimethyl-3,5-dioxido-10,14-dioxo-2,4,6-trioxa-11,15-diazas-3,5,5,5-tetrahydro-1,2,4-triazolo[4,5-b]pyridin-6-yl)propanoate	
propanoyl-CoA		C24H40N7O17P3S	823.1414232		83731	C02843, C00100	Propionoyl-CoA, S-((9R)-1-[(2R,3S,4R,5R)-5-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-4-hydroxy-3-(phosphonoxy)tetrahydro-2-furanyl]-3,5,9-trihydroxy-8,8-dimethyl-3,5-dioxido-10,14-dioxo-2,4,6-trioxa-11,15-diazas-3,5,5,5-tetrahydro-1,2,4-triazolo[4,5-b]pyridin-6-yl)propanoate	

carboxymethyl-CoA		C23H38N7O18P3S	825.1206877		392675	<p>(3R,5S,9R)-1- [(2R,3S,4R,5R)-5-(6- Amino-9H-purin-9-yl)-4- hydroxy-3- (phosphonoxy)tetrahydr o-2-furanyl]-3,5,9- trihydroxy-8,8-dimethyl- 10,14-dioxo-2,4,6-trioxa- 18-thia-11,15-diaza-3,5- diphosphaicosan-20- oic acid 3,5-dioxide</p>	
crotonyl-CoA		C25H40N7O17P3S	835.1414232		4593713 C00877	<p>2-Butenoyl-CoA, trans- But-2-enoyl-CoA, Adenosine, 5'-O- [hydroxy[[hydroxy[[[3R)- 3-hydroxy-2,2-dimethyl- 4-oxo-4-[[3-oxo-3-[[2- [[(2E)-1-oxo-2-buten-1- yl]thio]ethyl]amino]propyl]amino]butyl]oxy]phosphi nyl]oxy]phosphinyl]-, 3'- (dihydrogen phosph ate)</p>	methylacrylyl-CoA (-/144985)

butanoyl-CoA		C25H42N7O17P3S	837.1570733		109043	C00136	S-butyryl-CoA, Adenosine, 5'-O-[hydroxy[[hydroxy[[[(3R)-3-hydroxy-2,2-dimethyl-4-oxo-4-[[3-oxo-3-[[2-[(1-oxobutyl)thio]ethyl]amino]propyl]amino]butyl]oxy]phosphinyl]oxy]phosphinyl]-, 3'-(dihydrogen phosphate)	isobutanoyl-CoA (-/2300823)
oxalyl-CoA		C23H36N7O19P3S	839.0999523		10140117	C00313	(9R)-1-[(2R,3S,4R,5R)-5-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-4-hydroxy-3-(phosphonoxy)tetrahydro-2-furanyl]-3,5,9-trihydroxy-8,8-dimethyl-10,14,19-trioxo-2,4,6-trioxa-18-thia-11,15-diaza-3,5-diphosphaicosan-20-oi c acid 3,5-dioxide	
3-hydroxypropanoyl-CoA		C24H40N7O18P3S	839.1363378		389623	C05668	3-hydroxypropionyl-CoA	lactoyl-CoA (-/2339466)

3-hydroxybutanoyl-CoA		C25H38N7O18P3S	849.1206877				3-hydroxy-isobutyryl-CoA
3-methylcrotonyl-CoA	 <p>The image shows the chemical structure of 3-methylcrotonyl-CoA. It consists of a 3-methylcrotonyl group (CH₃-CH=C(CH₃)-CO-) linked to a pantoic acid derivative, which is further linked to a ribose sugar, and finally to a phosphate group that is part of a coenzyme A (CoA) molecule. The CoA part includes a thiazolamide ring system, a ribose sugar, and a diphosphate group.</p>	C26H42N7O17P3S	849.1570733	7828242	C03069	3,3-dimethacrylyl-CoA, S-((9R)-1-[(2R,3S,4R,5R)-5-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-4-hydroxy-3-(phosphonoxy)tetrahydro-2-furanyl]-3,5,9-trihydroxy-8,8-dimethyl-3,5-dioxido-10,14-dioxo-2,4,6-trioxa-11,15-diazaspiro[5.5]undecane-17-yl) 3-methyl-2-butenethioate	(E)-2-methylcrotonoyl-CoA

Acetoacetyl-CoA		C25H40N7O18P3S	851.1363378	1420-36-6	83198	C00332	3-ketobutanoyl-CoA, 3-oxobutanoyl-CoA, adenosine, 5'-O-[[[(3R)-4-[[3-[2-[(1,3-dioxobutyl)thio]ethyl]amino]-3-oxopropyl]amino]-3-hydroxy-2,2-dimethyl-4-oxobutyl]oxy]hydroxyphosphinyl]oxy]hydroxyphosphinyl]-, 3'-(dihydrogen phosphate)	
isovaleryl-CoA		C26H44N7O17P3S	851.1727233		145017	C02939	Adenosine, 5'-O-[hydroxy[[hydroxy[[[(3R)-3-hydroxy-2,2-dimethyl-4-[[3-[2-[(3-methyl-1-oxobutyl)thio]ethyl]amino]-3-oxopropyl]amino]-4-oxobutyl]oxy]phosphinyl]oxy]phosphinyl]-, 3'-(dihydrogen phosphate)	2-methylbutanoyl-CoA (-/10140135)
Malonyl CoA		C24H38N7O19P3S	853.1156023	524-14-1				

2-methylacetoacetyl-CoA		C26H42N7O18P3S	865.1519879					β -ketovaleryl-CoA 2-Furoyl-CoA
hexanoyl-CoA		C27H46N7O17P3S	865.1883734					(Methylenecyclopropyl)acetyl-CoA
methylmalonyl-CoA		C25H40N7O19P3S	867.1312524					succinyl-CoA, malonyl-CoA methyl ester
2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA		C26H44N7O18P3S	867.1676379					
benzoyl-CoA		C28H40N7O17P3S	871.1414232					

itaconyl-CoA		C26H40N7O19P3S	879.1312524					(E)-glutaconyl-CoA
3-oxohexanoyl-CoA		C27H44N7O18P3S	879.1676379					
glutaryl-CoA		C26H42N7O19P3S	881.1469025					S-(5-Hydroxy-2-furoyl)-CoA C26H38N7O19P3S
(S)-3-hydroxyhexanoyl-CoA		C27H46N7O18P3S	881.183288					3,4-Didehydroadipyl-CoA semialdehyde
malyl-CoA		C25H40N7O20P3S	883.126167					

4-hydroxybenzoyl-CoA		C28H40N7O18P3S	887.1363378					salicyloyl-CoA
trans-oct-2-enoyl-CoA		C29H48N7O17P3S	891.2040234					
2,3-dehydroadipyl-CoA		C27H42N7O19P3S	893.1469025					3-methylglutaconyl-CoA
octanoyl-CoA		C29H50N7O17P3S	893.2196735					3-trans,5-cis-Octadienoyl-CoA, 2-trans,4-trans-Octadienoyl-CoA
citramalyl-CoA		C26H42N7O20P3S	897.1418171					

3-oxo-3-phenylpropionyl-CoA		C30H42N7O17P3S	897.1570733					(E)-cinnamoyl-CoA
N-methylanthraniloyl-CoA		C29H43N8O17P3S	900.1679723					
3-oxoadipyl-CoA		C27H42N7O20P3S	909.1418171					
pimeloyl-CoA		C28H46N7O19P3S	909.1782026					2,3-Dihydro-2,3-dihydroxybenzoyl-CoA C28H42N7O19P3S
3-hydroxyadipyl-CoA		C27H44N7O20P3S	911.1574671					3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA

4-coumaroyl-CoA		C30H42N7O18P3S	913.1519879					
3-hydroxy-3-phenylpropionyl-CoA		C30H44N7O18P3S	915.1676379					p-dihydrocoumaroyl-CoA
trans- Δ 2, cis- Δ 4-decadienoyl-CoA		C31H50N7O17P3S	917.2196735					
trans- Δ 2-decenoyl-CoA		C31H52N7O17P3S	919.2353236					Perillyl-CoA
decanoyl-CoA		C31H54N7O17P3S	921.2509736					trans-2-Methyl-5-isopropylhexa-2,5-dienoyl-CoA, cis-2-Methyl-5-isopropylhexa-2,5-dienoyl-CoA, Geranoyl-CoA, trans-Geranyl-CoA, 2,4-Decadienoyl-CoA

Caffeoyl-CoA		C30H42N7O19P3S	929.1469025	53034-79-0					3-(4-hydroxyphenyl)-3-oxo-propionyl-CoA
3-(4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-propionyl-CoA		C30H43N7O19P3S	930.1547275						
indole-3-acetyl-CoA		C31H51N8O17P3S	932.2305725						
3-oxo-5,6-dehydrosuberil-CoA		C29H44N7O20P3S	935.1574671						
3-oxodecanoyl-CoA		C31H52N7O18P3S	935.2302382						4-Isopropenyl-2-oxy-cyclohexanecarboxyl-CoA, 2-Oxo-delta3-4,5,5-trimethylcyclopentenylacetyl-CoA

3-hydroxy-decanoyl-CoA		C31H54N7O18P3S	937.2458882					2,6-Dimethyl-5-methylene-3-oxoheptanoyl-CoA, (3S)-3-Isopropenyl-6-oxoheptanoyl-CoA, 2-Hydroxy-4-isopropenylcyclohexane-1-carboxyl-CoA, (3R)-3-Isopropenyl-6-oxoheptanoyl-CoA
feruloyl-CoA		C31H44N7O19P3S	943.1625525					
2-trans-dodecenoyl-CoA		C33H56N7O17P3S	947.2666237					3-cis-dodecenoyl-CoA
lauroyl-CoA		C33H58N7O17P3S	949.2822737					cis,cis-3,6-Dodecadienoyl-CoA, trans,cis-Lauro-2,6-dienoyl-CoA
indole-3-butenoyl-CoA		C33H45N8O17P3S	950.1836224					

indole-3-butyryl-CoA		C33H47N8O17P3S	952.1992724					
1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-CoA		C32H42N7O19P3S	953.1469025					
5-hydroxy-feruloyl-CoA		C31H44N7O20P3S	959.1574671				6'-hydroxyferuloyl-CoA	
jasmonoyl-CoA		C33H52N7O18P3S	959.2302382					
3-keto-indole-3-butyryl-CoA		C33H45N8O18P3S	966.178537					

3-hydroxy-indole-3-butyryl-CoA		C33H47N8O18P3S	968.194187					
4-(2'-carboxyphenyl)-4-oxobutyryl-CoA		C32H44N7O20P3S	971.1574671					
Sinapoyl-CoA		C32H46N7O20P3S	973.1731172	54429-80-0				2-Carboxymethyl-3-hydroxyphenylpropionyl-CoA
a tetradecenoyl-CoA (n-C14:1CoA)		C35H60N7O17P3S	975.2979238					
myristoyl-CoA		C35H62N7O17P3S	977.3135739					5-cis-8-cis-Tetradecadienoyl-CoA

3-hydroxytetradecanoyl-CoA		C35H62N7O18P3S	993.3084885					
5-hydroxy-3-methyl-1,5-dioxo-octahydro-1H-inden-4-ylpropanoyl-CoA		C34H54N7O19P3S	989.2408028					
OPC4-CoA		C35H56N7O18P3S	987.2615383					
3-methyl-1,5-dioxo-octahydro-1H-inden-4-yl]propanoyl-CoA		C34H52N7O19P3S	987.2251528					
OPC4-trans-2-enoyl-CoA		C35H54N7O18P3S	985.2458882					

palmitoleyl-CoA		C37H60N7O17P3S	999.2979238					hexadecenoyl-CoA (n-C16:1CoA)
OPC4-3-ketoacyl-CoA		C35H54N7O19P3S	1001.240803					
OPC4-3-hydroxyacyl-CoA		C35H55N7O19P3S	1002.248628					
3,5-hydroxy-methyl-1-oxo-octahydro-1H-inden-4-yl-3-oxopropanoyl-CoA		C34H52N7O20P3S	1003.220067					
3,5-hydroxy-methyl-1-oxo-octahydro-1H-inden-4-yl]-3-hydroxypropanoyl-CoA		C34H54N7O20P3S	1005.235717					

palmitoyl-CoA		C37H66N7O17P3S	1005.344874	1763-10-6				4,8,12-Trimethyltridecanoyl-CoA
OPC6-trans-2-enoyl-CoA		C37H58N7O18P3S	1013.277188					
OPC6-CoA		C37H60N7O18P3S	1015.292838					
α -linolenoyl-CoA		C39H64N7O17P3S	1027.329224					γ -Linolenoyl-CoA, Alpha-Linolenoyl-CoA, Stearidonoyl CoA, CoA(18:4(6Z,9Z,12Z,15Z))
OPC6-3-ketoacyl-CoA		C37H58N7O19P3S	1029.272103					

OPC6-3-hydroxyacyl-CoA		C37H60N7O19P3S	1031.287753					
oleoyl-CoA		C39H68N7O17P3S	1031.360524					trans-octadec-2-enoyl-CoA
stearoyl-CoA		C39H70N7O17P3S	1033.376174	!!!				Linoleoyl-CoA 6709-57-5, 6Z,9Z-octadecadienoyl-CoA
OPC8-trans-2-enoyl-CoA		C39H62N7O18P3S	1041.308488					
OPC8-CoA		C39H64N7O18P3S	1043.324139					

eicosapentaenoyl-CoA		C41H64N7O17P3S	1051.329224					
dihomo γ -linolenoyl-CoA		C41H68N7O17P3S	1055.360524					eicosatrienoyl-CoA, Timnodonyl CoA, (5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)- Icosapentaenoyl- CoA, CoA(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z))
OPC8-3-ketoacyl-CoA		C39H62N7O19P3S	1057.303403					
(11Z,14Z)-icosa-11,14-dienoyl-CoA		C41H70N7O17P3S	1057.376174					Arachidonoyl-CoA 17046-56- 9, (8Z,11Z,14Z,17Z)-Icosatetraenoyl- CoA, CoA(20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)), CoA(2 0:4(8Z,11Z,14Z,17Z))
OPC8-3-hydroxyacyl-CoA		C39H64N7O19P3S	1059.319053					

trans-arachido-2-enoyl-CoA		C41H72N7O17P3S	1059.391824					(11Z,14Z,17Z)-Icosatrienoyl-CoA, CoA(20:3(11Z,14Z,17Z)), CoA(20:3(5Z,8Z,11Z))
arachidoyl-CoA		C41H74N7O17P3S	1061.407474					(11Z,14Z)-Icosadienoyl-CoA, CoA(20:2(11Z,14Z)), CoA(20:2(8Z,11Z))
3-oxo-eicosatrienoyl-CoA		C41H66N7O18P3S	1069.339789					
3-hydroxy-eicosatrienoyl-CoA		C41H68N7O18P3S	1071.355439					
3-oxo-(11Z)-eicos-11-enoyl-CoA		C41H70N7O18P3S	1073.371089					

3-oxo-arachidoyl-CoA		C41H72N7O18P3S	1075.386739					
(3R)-3-hydroxy-arachidoyl-CoA		C41H74N7O18P3S	1077.402389					
trans-docos-2-enoyl-CoA		C43H76N7O17P3S	1087.423124					
behenoyl CoA		C43H78N7O17P3S	1089.438774					(13Z,16Z)-Docosadi-13,16-enoyl-CoA, CoA(22:2(13Z,16Z))
3-oxo-docosapentaenoyl-CoA		C43H66N7O18P3S	1093.339789					3-oxo-23,24-bisnorchol-4-en-22-oyl-CoA

3-hydroxy-docosapentaenoyl-CoA		C43H68N7O18P3S	1095.355439					
3-oxo-behenoyl-CoA		C43H76N7O18P3S	1103.418039					
(3R)-3-hydroxy-behenoyl-CoA		C43H78N7O18P3S	1105.433689					
(Z)-15-tetracosenoyl-CoA		C45H80N7O17P3S	1115.454424				trans-lignocer-2-enoyl-CoA	
lignoceroyl-CoA		C45H82N7O17P3S	1117.470074					

3-oxo-lignoceroyl-CoA		C45H80N7O18P3S	1131.449339					
(3R)-3-hydroxy-lignoceroyl-CoA		C45H82N7O18P3S	1133.464989					3-hydroxytetracosanoyl-CoA
3,22-dioxochol-4-en-24-oyl-CoA		C45H68N7O19P3S	1135.350353				22-hydroxy-3-oxochol-4-en-24-oyl-CoA	
trans-cerot-2-enoyl-CoA		C47H84N7O17P3S	1143.485725					
cerotoyl-CoA		C47H86N7O17P3S	1145.501375					

3-oxo-cerotoyl-CoA		C47H84N7O18P3S	1159.480639					
(3R)-3-hydroxy-cerotoyl-CoA		C47H86N7O18P3S	1161.496289					
3-oxocholest-4-en-26-oyl-CoA		C48H76N7O18P3S	1163.418039					
3,24-dioxocholest-4-en-26-oyl-CoA		C48H74N7O19P3S	1177.397303					
24-hydroxy-3-oxocholest-4-en-26-oyl-CoA		C48H76N7O19P3S	1179.412953					

(24E)-3 α ,7 α -dihydroxy-5 β -cholest-24-enoyl-CoA		C48H78N7O19P3S	1181.428604					
(24E)-3 α ,7 α ,12 α -trihydroxy-5 β -cholest-24-enoyl-CoA		C48H78N7O20P3S	1197.423518					
(24R,25R)-3 α ,7 α ,24-trihydroxy-5 β -cholestanoyl CoA		C48H80N7O20P3S	1199.439168					
(24R,25R)-3 α ,7 α ,12 α ,24-tetrahydroxy-5 β -cholestanoyl CoA		C48H80N7O21P3S	1215.434083					

ANHANG

Anhang 8.2 Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz	Locus	Kommentar
apk1-1_fw	TTG GTG GGC CTA ATA AAT TCC	At2g14750	
apk1-1_rv	GAT TCA AAG CAC AAG CCA AAG	At2g14750	
apk2-1_fw	TAT CAG AGC ATC TCG ACC GTC	At4g39940	
apk2-1_rv	ACA TGA AGA GGA ACG TCC ATG	At4g39940	
apk3-1_fw	TGA ACG TGT CTT TGC AGA TTG	At3g03900	
apk3-1_rv	TTG CTT CAC ACA ATT GCA GAG	At3g03900	
apk4-1_fw	TTT TGA TTT CAG AGT CCA CCG	At5g67520	
apk4-1_rv	AGC TTC ACA AAC ATG GAG TGG	At5g67520	
APR1_fw	GTT AGA CTT CGA GAT TCC CCG	At4g04610	
APR1_rv	ATT GAT AGC GAA AGG CGA AAC	At4g04610	
APR2_fw	TTG GGT TAC TCG TGC TTC AAC	At1g62180	
APR2_rv	CCA CTT TAA CTC CTT TTC CCG	At1g62180	
ATPS1_fw	TCC TGG TGC CAT GCT TAG TAC	At3g22890	
ATPS1_rv	GCA TGT ATT AAG CGA AGG CTG	At3g22890	
ATPS2_fw	TAG CAC CAG CGT TAA TCC TTG	At1g19920	
ATPS2_rv	TGT ACC GGA AAC TGA GAT TGG	At1g19920	
B2_for	TGG ACA AGT ATC ATG ACC CAA TCA TCC ACG	At4g39950	
B2_rev	AAC GGT TTA GCC AGA AAC ATA TCG T	At4g39950	
B3_for	TGT TCT ATG CAT GGA CTG GTG GTC AAC ATG	At2g22330	
B3_rev	AGG AAA CCG ATC ACT TGA CCG CTT G	At2g22330	
ggt1_for	ATG TCG CTG GTT CGA ACA GTG A	At4g39640	
ggt1_rev	CGC TTC TAG TCG CGT TCA TCT	At4g39640	
ggt2_for	CAA TGG CAC AGT TGG GGT TA	At4g39650	
ggt2_rev	GGT GCT GGT GGT GGA ACA TC	At4g39650	
ggt4-1-for	CGG ACA GGT TTT GAA AAC CG	At4g29210	
ggt4-1-rev	AGT ACT CAG GTG GGA ATG TCG TGT	At4g29210	
ggt4-2_fw	GCA GAA ATG ACT CGT TCC TTG	At4g29210	
ggt4-2_rv	ATC TGA GAA TGG TGT TGT GGC	At4g29210	
PCS1_for	TTT ATA TCG GCG ATC TCT TCC TTC TCC TCC	At5g44070	
PCS1_rev	GAT TCA TCA AAC CAC CTC CAA GGC C	At5g44070	
PCS2_for	AAT CTT CAA TGA AGC GCT TCA GAA AG	At1g03980	
PCS2_rev	TGA TTT ACA TCC TCT GTT CTT CGA ATC TC	At1g03980	

ANHANG

Ds5-1	ACG GTC GGG AAA CTA GCT CTA C	Ds-Element	GGT-Linien
Fish1	CTG GGA ATG GCG AAA TCA AGG CAT C	pPCV6NFHyg	PCS2
Fish2	CAG TCA TAG CCG AAT AGC CTC TCC A	pPCV6NFHyg	PCS1
LB3	TAG CAT CTG AAT TTC ATA ACC AAT CTC GAT ACA C	pCSA110	Sail-Linien
LBa1	TGG TTC ACG TAG TGG GCC ATC G	pROK	Salk-Linien
o8760	CTA CAC TGA ATT GGT AGC TC	pAC106	GK-Linien
		AT5G59370	
Aktin_for	TGG GAT GAC ATG GAG AAG AT	AT2G37620	
		AT3G18780	
		AT1G49240	
		AT5G59370	
Aktin_rev	ATA CCA ATC ATA GAT GGC TGG	AT2G37620	
		AT3G18780	
		AT1G49240	
APR1_118_for	GTT CAT GTT GCT CCT GTG TCT C	At4g04610	
APR1_768_rev	CAA ACT ACC AAC TCC ACC ATC C	At4g04610	
SDI1_280_for	CTC AAG GAC ATG GCT GTTGTA A	AT5G48850	
SDI1_857_rev	AAG ACA TCC TCC ATC TCA GCA T	AT5G48850	

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Erwin Grill für die Möglichkeit diese Arbeit an seinem Lehrstuhl anzufertigen und das damit verbundene Projekt bedanken.

Entscheidend für das Gelingen dieser Arbeit war außerdem die Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe der analytischen Biogeochemie des Helmholtz Zentrums München. Für die stete fachliche und technische Unterstützung möchte ich mich vor allem bei Prof. Dr. Philippe Schmitt-Kopplin und Dr. Basem Kanawati bedanken sowie bei Jenny Uhl, die immer ausgeholfen hat wenn Not am Mann war.

Außerdem danke ich PD Dr. Erich Glawischnig für die Versorgung mit *cyp79B2xB3* und dem Benzylglucosinolat-Standard sowie Prof. Dr. Stanislav Kopriva für die freundliche Bereitstellung der APK-Linien.

Dr. Farhah Assaad und Dr. Alexander Christmann danke ich für ihren konstruktiven Beitrag zu der Arbeit an meiner Publikation.

Für die unabdingbare Hilfe bei allen administrativen, bürokratischen und technischen Problemen bedanke ich mich bei Beate Seeliger und Josef Reischenbeck für ihren Beistand.

Weiterhin danke ich Timo Höwing für das Teilen seines Büros mit mir und dieser Arbeit.

Außerdem möchte ich all denen danken, die mir während meiner Zeit in der Botanik mit Rat, Tat, einem grünen Daumen, Süßigkeiten und auch Freundschaft zur Seite gestanden haben. Ein besonderern Dank gilt hier Ralph Blum, Caroline Klaus und Christian Kornbauer für ein gelungenes erstes Jahr und Natalie Kowalski für alle weiteren Jahre, für unzählige Gespräche und Diskussionen, Kritik und Korrekturen und für jedes „alles wird gut“.

Vielen Dank!