

Charakterisierung neuer herbizider Wirkstoffziele - Phylloquinon-Synthese und Spleißen -

Von der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften
der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg
zur Erlangung des Grades und Titels eines

Doktor der Naturwissenschaften
(Doctor rerum naturalium)
Dr. rer. nat.

angenommene
Dissertation

von Herrn Julius Heuchert

geboren am 25.07.1989 in Gießen

Gutachter

1. Prof. Dr. Sascha Laubinger

2. Prof. Dr. Rüdiger Hain

Weitere Gutachterin/Gutachter

.....

.....

.....

Tag der Disputation: 13.04.2021

Zusammenfassung

In der konventionellen Landwirtschaft spielen Herbizide eine wichtige Rolle. Jedoch nimmt ihre Wirksamkeit durch vermehrtes Auftreten von Toleranzen der Unkräuter ab. Innerhalb der letzten 30 Jahre wurde kein neuer herbizider Wirkmechanismus identifiziert, bisher bewährte Produkte verlieren ihre Zulassung.

Die vorliegende Arbeit leistet einen Beitrag zur Suche nach bisher noch nicht verwendeten Wirkstoffzielen für Herbizide.

Der **eine Schwerpunkt** lag auf der Hemmung eines Enzyms (DHNS) des Synthesewegs von Phylloquinon. Letzteres ist für alle Photosynthese-treibenden Pflanzen essenziell. Im eukaryotisch-tierischen Organismus wird es hingegen nicht produziert, wenn auch als Vitamin K₁ benötigt.

Als potenzieller Wirkstoff zur Hemmung der durch DHNS katalysierten Reaktion kam MOCB zum Einsatz, ein aus der Antibiotikaforschung stammendes Molekül.

Seine *in-vivo* Aktivität konnte durch Hemmung des Pflanzenwachstums bestätigt werden.

Dieser Störeffekt ließ sich bedingt kompensieren, zum einen durch die Supplementation eines Folgeprodukts der DHNS-Reaktion, zum anderen durch die Überexpression der DHNS. Somit sollte das Enzym das Ziel von MOCB sein.

Die chemische Validierung bewies die Beeinflussbarkeit der DHNS-Reaktion durch den aktivierten Inhibitor MOCB-CoA, innerhalb eines biochemischen Tests (*in-vitro*). Die ermittelten Kennzahlen charakterisieren MOCB-CoA als einen kompetitiven Inhibitor.

Mittels transgener Linien wurde im Zuge der genetischen Validierung gezeigt, dass das Herunterregulieren der DHNS durch den RNSi-Effekt zu Störungen bei der Samenbildung führt. Dies unterstreicht den Charakter der DHNS als essenzielles Enzym.

Insgesamt war es möglich, die Wirkstoff-Wirkort-Beziehung von MOCB und DHNS zu zeigen sowie die DHNS als potenzielles Wirkstoffziel für die Entwicklung zukünftiger Herbizide zu empfehlen. Da ein *in-vitro*-Test etabliert ist, kann dieser innerhalb von Hochdurchsatzscreening-Kampagnen verwendet werden.

Der **zweite Schwerpunkt** nahm den Vorgang des Spleißens zum Wirkziel. Der Versuch des Induzierens fehlgespleißter Transkripte wurde im Bereich der Herbizidforschung (wissentlich) bisher noch nicht unternommen, die ersten gezielten Ansätze finden sich im Rahmen der

humanen Krebsforschung. Nach Literatur-Durchsicht bot sich Psoromsäure als aussichtsreicher Wirkstoff-Kandidat an.

Als erster Schritt galt somit das Aufzeigen einer pflanzlichen *in-vivo* Aktivität des Wirkstoffs. Diese bestand in einer allgemeinen Wachstumsdepression in Gegenwart von aufsteigender Wirkstoffkonzentrationen. Diese gipfelte ab einer Konzentration von 75 μM in einem letalen Effekt. Ob diese Effekte durch Fehlspleißungen verursacht wurden, war Gegenstand einer Transkriptom-Analyse. Innerhalb dieser konnten fehlgespleißte-Transkripte aufgefunden und zu ihren jeweiligen Genorten zugeordnet werden. Abschließend war es möglich, die Ergebnisse dieser computergestützten Analyse stichprobenartig mittels RT-PCR biochemisch zu validieren.

Durch Gabe des Inhibitors konnten Fehlspleißungen induziert werden, die potenziell zum herbiziden Effekt des Wirkstoffs geführt haben können. Die Hemmung von Pflanzenwachstum durch Eingriffe in den Spleißprozess ist machbar und aussichtsreich.

Für die beiden untersuchten Wirkstoffziele konnten herbizide Effekte bei ihrer jeweiligen Hemmung gezeigt werden. Für den Themenkomplex „Inhibition des Spleißens“ sollte künftige Forschung den exakten Ansatzpunkt im Spleißvorgang so weit einengen, dass von seiner Hemmung nur pflanzliche Organismen betroffen sind.

Die Ergebnisse des Themenschwerpunkts „Validierung von DHNS als Wirkstoffziel“ zeigen die Eignung dieses Wirkziels für die unmittelbare Suche nach neuen herbiziden Molekülen.

Abstract

Herbicides are an important factor in conventional agriculture. However, due to a rise in herbicide resistant weeds, their efficacy is fading. As no new mode of action was identified in the last 30 years, and well-established products are losing their registration, herbicide research is now again scouting for novel targets.

The work in hand is contributing to the characterization of two targets for future herbicides.

One focus is the disruption of phylloquinone synthesis by inhibition of the enzyme DHNS. Phylloquinone is an essential electron transporter in photoautotrophic plants. The synthesis pathway is not present in animal cells, even though it is required by the organism and therefore considered a vitamin (vitamin K1).

MOCB, a compound discovered in antibiotic research, was used as a tool compound. As it led to restrained growth in plants, its *in-vivo* activity could be confirmed. Since this phenotype could be complemented, by supplementing an intermediate down-stream of the DHNS reaction, as well as, by overexpressing DHNS itself, it is probable that DHNS is the target of MOCB.

It was proven *in-vitro*, by a biochemical assay, that the reaction catalyzed by DHNS can be influenced by the activated inhibitor MOCB-CoA, portraying the chemical validation.

While working on transgenic lines, dedicated to downregulation of DHNS via RNAi, impaired seed development was revealed, further strengthening DHNS character as an essential enzyme.

Overall, it was possible to show the tie of MOCB and DHNS as compound and target. Therefore, DHNS could be positioned as a promising novel herbicidal target. With a dedicated *in-vitro* assay in place, it can now be utilized in high throughput campaigns.

The **second area of focus** took splicing process as target for future herbicides. In herbicide research, the approach of inducing faulty splicing was (intentionally) never done before. The incipient stages for this mode of action can be found in cancer research. After thorough review of medical literature, psoromic acid, the compound used for exploration, was found to be most suitable.

As a first step the compounds *in-vivo* activity in plants was evaluated. It mainly consisted of stunted growth in presence of rising concentrations of psoromic acid. At a concentration of 75 μ M the consequences induced peaked in lethal effects. To assess if these effects are caused by deficient

splicing the transcriptome was analyzed. During this analysis abnormally spliced transcripts were found and mapped to their gene loci. Finally, these computer-generated results were biochemically spot-check validated by RT-PCR.

By compound application faulty splicing was induced, which potentially could have led to herbicidal effects. Therefore, inhibiting plant development by interference of splicing is feasible and promising.

For the two targets evaluated, herbicidal effects were detected after inhibition. Follow-up research on the topic “Inhibition of splicing” should narrow the point of application for future compounds to only address plants.

The results of the focal point “Validation of DHNS as target” illustrate the targets qualification for immediate screens on novel herbicidal compounds.

Inhalt	
Zusammenfassung	3
Abstract.....	5
I. Einleitung und Motivation	11
II. Wissensstand.....	16
II.1. Validierung von DHNS (<i>At1g60550</i>) als Wirkstoffziel.....	16
II.1.1 Die Rolle von Phylloquinon im pflanzlichen Organismus.....	16
II.1.2 Syntheseweg von Menaquinon und Phylloquinon	22
II.1.3 MOCB: Der Inhibitor der MenB-Reaktion von <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> und <i>M. tuberculosis</i>	30
II.2. Identifikation des Wirkorts von Psoromsäure.....	33
II.2.1 Spleißen.....	33
II.2.2 Das Spleißosom	34
II.2.3 Die Chemie des Spleißens	36
II.2.4 Biologische Rolle des „herkömmlichen“ Spleißens und seiner Alternativen	37
II.2.5 Ablauf des Spleißens	37
II.2.6 Alternatives Spleißen.....	39
II.2.7 Fehl-Spleißen.....	41
II.2.8 Inhibitoren des Spleißens	42
III. Zusammenfassende Einordnung der Projektteile vor dem Hintergrund des wirkstoffzielbasierten Ansatzes	46
III.1.1 Teil I: Phylloquinon-Synthese	46
III.1.2 Teil II: Spleißen.....	47
IV. Zielsetzung.....	48
V. Ergebnisse.....	50
VI. Teil I: Validierung von DHNS (<i>At1g60550</i>) als Wirkstoffziel.....	50
VI.1.1 Nachweis der pflanzlichen <i>in vivo</i> Aktivität des Inhibitors der bakteriellen DHNS-Analoga: Methyl 4-Oxo-4-(4-Chlorophenyl)-2-butenolat.....	50

VI.1.2	Chemische Validierung der DHNS als Wirkstoffziel von MOCB – <i>In-vitro</i> Enzym-Assay	55
VI.1.3	Genetische Validierung – Überexpression und <i>Knockdown</i>	93
VI.1.4	In-silico Studie – Computergestütztes Einfügen des Wirkstoffs (MOCB-CoA) in das Homologie-Modell der DHNS.....	99
VII.	Teil II: Identifikation des Wirkorts von Psoromsäure	104
VII.1.1	Nachweis der pflanzlichen <i>in-vivo</i> Aktivität von Psoromsäure.....	104
VII.1.2	Transkriptom-Analyse – Identifikation von fehlgespleißten Transkripten	106
VII.1.3	Biochemische Validierung des tatsächlichen Vorliegens von fehlgespleißten Transkripten.....	116
VIII.	Diskussion	122
IX.	Teil I: Validierung von DHNS (<i>At1g60550</i>) als Wirkstoffziel	122
IX.1.1	Phänotypische Validierung – <i>in-vivo</i> Aktivität des Inhibitors und Komplementation.....	122
IX.1.2	Chemische Validierung – <i>In-vitro</i> Enzym-Assay und Inhibitionskinetik	124
IX.1.3	Genetische Validierung – Überexpression und <i>Knockdown</i> von <i>DHNS</i> (<i>At1g60550</i>)	128
IX.1.4	<i>In-silico</i> -Studie – Bestärkung der <i>in-vitro</i> -Ergebnisse	131
IX.1.5	Strukturbasierte Betrachtung des Inhibitors MOCB.....	132
IX.1.6	Ausblick: DHNS als Ziel zukünftiger Herbizide.....	134
X.	Teil II: Identifikation des Wirkorts von Psoromsäure	135
X.1.1	Phänotypische Überprüfung von Effekten von Psoromsäure auf Arabidopsis-Keimlinge.....	135
X.1.2	Bioinformatisch gestützte Suche nach fehlgespleißten Transkripten	137
X.1.3	Biochemische Validierung des tatsächlichen Vorliegens fehlgespleißter Transkripte	139
X.1.4	Ausblick: Spleißen als Ziel für zukünftige Herbizide	142
XI.	Allgemeine Einordnung und abschließender Vergleich.....	143
XII.	Material und Methoden.....	145

XII.1.1	Organismen.....	145
XII.1.2	Sequenzen	145
XII.1.3	Konstrukte	146
XII.1.4	Puffer:	148
XII.1.5	Primer:	150
XIII.	Mikrobiologische Methoden	152
XIII.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	152
XIII.1.2	Klonierungen.....	153
XIII.1.3	Proteinexpression.....	155
XIII.1.4	Proteinreinigung.....	156
XIV.	Biochemische / Biophysikalische Methoden.....	158
XIV.1.1	Enzymassay.....	158
XIV.1.2	Gekoppelter Enzym-Assay.....	160
XV.	RNS-Sequenzierung.....	161
XVI.	Phyto genetische Methoden	161
XVI.1.1	Sterilisieren von Saatgut.....	161
XVI.1.2	Kultivierung von <i>Arabidopsis thaliana</i> (Wildtyp/transgene Pflanzen) auf Nährmedium.....	162
XVI.1.3	Transformation von Pflanzen	162
XVI.1.4	Entfärben von Samenschoten.....	163
XVII.	Analytik	163
XVII.1.1	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	163
XVIII.	Bioinformatische Methoden / Tools.....	164
XIX.	Erstellen von Homologie-Modell und Docking.....	168
XX.	Websites.....	169
XXI.	Abkürzungen.....	170
XXII.	Danksagungen	172
XXIII.	Ehrenwörtliche Versicherung	173

Literatur	174
Anhang.....	189

I. Einleitung und Motivation

Die Weltbevölkerung weist aktuell eine Größe von 7.8 Milliarden Menschen auf und soll im Verlauf der kommenden Dekaden um weitere drei bis vier Milliarden Menschen ansteigen (United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division). Hieraus ergibt sich ein klar erwartbarer Anstieg der Nachfrage nach Nutzpflanzen, die weltweit die hauptsächliche Nahrungsquelle darstellen (Shiferaw, Prasanna, Hellin & Bänziger 2011; Food and Agriculture Organization of the United Nations 2015).

Gleichzeitig lässt sich eine Entwicklung des Weltklimas beobachten, die laut Prognosen zu einem Anstieg von 3 bis 5 °C Oberflächentemperatur in den nächsten 50 bis 100 Jahren führen wird. (Solomon, S., D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M. Tignor and H.L. Miller 2007)

Hieraus kann sich eine Häufung an nicht-optimalen Vegetationsperioden ergeben, da mit einem Anstieg der Temperatur die Auftretswahrscheinlichkeit für extreme Wetterbedingungen wie Flut, Dürre und Hitzewellen ansteigt (Bates, Kundzewicz, Wu & Palutikof 2013). In der Summe führt dies zu einer Verkürzung der Anbausaison sowie einem Rückgang landwirtschaftlich verwendbarer Flächen (Verlust von Anbauflächen durch Ansteigen des Meeresspiegels, Versalzung der Böden in Küstenzonen sowie allgemein durch verschlechterte Witterungsbedingungen).

Zusammenfassend müssen zur Erfüllung der ansteigenden Nachfrage die verbleibenden Flächen weitergehend optimiert werden.

Hierfür bieten sich verschiedene Strategien an: Einsatz von GMOs (**G**entechnisch **m**odifizierte **O**rganismen), datenbasierte Herangehensweisen (*smart farming* // *digital farming*) sowie der Einsatz von Agrochemie.

GMOs und datenbasierte Ansätze zielen auf eine Erweiterung beziehungsweise effektivere Nutzung der Anbauflächen ab, sei es durch das gezielte Einbringen von Toleranzen in die Pflanzen gegenüber solcher „nicht-optimalen“ Umweltbedingungen oder aber der Bereitstellung sogenannter „*Decision-Making-Tools*“, die dem Bauern durch Modellierung eine umfassendere Informationsebene zum Acker und seinem Potential vermitteln.

Im Gegensatz hierzu hilft Agrochemie, dass konventionelle Nutzpflanzen auf bestehenden Anbauflächen zur Entfaltung ihres maximalen Potentials einen Wachstumsvorsprung erfahren.

Dies erfolgt teils durch Düngung, aber ebenso durch selektive Schutzmaßnahmen gegenüber schädlichen biologischen Einflussfaktoren (beispielsweise durch Einsatz von Herbiziden, Fungiziden und Insektiziden). Während Fungizide und Insektizide die Nutzpflanze gegen Pilzkrankungen und Schadinsekten feien, tragen Herbizide dazu bei, die unerwünschten Konkurrenz-Pflanzen zu dezimieren und zu kontrollieren.

Sieht man die Anbaufläche als ein Objekt mit limitierten Ressourcen (Wasser, Nährstoffe, Platz und Sonnenlicht) an, so ist es im Sinne des Landwirts, dass zur Ertragsmaximierung das Gros dieser Wertstoffe nur der Nutzpflanze zur Verfügung stehen; das gleichzeitige Vorhandensein anderer Pflanzen schmälert den vorhandenen Ressourcenpool. Weiterhin begünstigen sogenannte Unkräuter und Ungräser als Primärwirte das Eindringen von Schadorganismen, wie beispielsweise Pilzkrankungen, und sie erschweren allgemein das Bewirtschaften des Felds (z.B. Blockieren des Mähreschers durch Kletten-Labkraut, Verhinderung von notwendigen Pflanzenschutzmaßnahmen mit potentiell bienengefährlichen Wirkstoffen durch Frühblüher im Feld) (Klein, Grabler & Tischner 2015).

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zur Entwicklung neuer Herbizide leisten: Durch Identifikation, Charakterisierung und Validierung neuer Wirkstoffziele.

Als vielversprechende Kandidaten für Angriffspunkte zukünftiger Pflanzenschutzmittel präsentieren sich hierbei zwei Prozesse: Die Phylloquinon-Synthese sowie das Spleißen von RNS.

Diese potenziellen neuen Ziele entstammen einer Sonderform des Wirkstoffziel-basierten Forschungsansatzes, einer Vorgehensweise, die sich schon während der letzten Dekaden innerhalb der medizinischen Forschung großer Beliebtheit erfreute. Das Grundprinzip besteht hierbei in einer fokussierten Wirkstofffindung für ein bestimmtes und charakterisiertes Zielprotein, dessen bekannte Eigenschaften die gezielte Suche mittels eines miniaturisierten biochemischen Testsystem begünstigen. Dies ermöglicht einerseits das Überprüfen eines großen Umfangs an Testsubstanzen innerhalb kurzer Zeit und andererseits die Minimierung der benötigten Wirkstoffmenge. Den Gegensatz hierzu bildet der Phänotyp-basierte Forschungsansatz: Hierbei werden zuerst eine Vielzahl unterschiedlichster chemischer Verbindungen auf ihre Wirksamkeit auf den Phänotyp des Organismus getestet, erst danach wird der unbekannte Wirkort der so selektierten Wirkstoffe aufgeklärt (Swinney 2013).

Die hier behandelte Sonderform des Wirkstoffziel-basierten Ansatzes fußt auf der strukturierten Sichtung von Literatur (primär zu Bakterien und Pilzen, selten zum tierischen Organismus) bezüglich neuer Ziel-Proteine mit bekannten Inhibitoren. Von Interesse sind hierbei solche

Ziele, die eine möglichst exakte Entsprechung in der Pflanze finden und dort an maßgeblichen Stoffwechselwegen oder Mechanismen beteiligt sind. Eine Inhibition derselben sollte folglich letale Konsequenzen nach sich ziehen.

Die so identifizierten, aus der Literatur bekannten inhibitorischen Wirksubstanzen dienen als erste Anhaltspunkte zur Entwicklung weiterer spezifischer Wirkstoffe. Sie werden daher als *tool-compounds* bezeichnet.

Potenzielle Ansatzpunkte für Herbizide sollten in diesem Kontext idealerweise einige Voraussetzungen erfüllen, um gute Starbedingungen zu garantieren:

- Essenzieller Prozess:
Bei dem zu inhibierenden Prozess sollte es sich um einen essenziellen Bestandteil für das Überleben der Pflanze handeln.
- Literaturbekannte *tool-compounds*:
Der zu inhibierende Prozess sollte in einem anderen Organismus so weit beschrieben und charakterisiert worden sein, dass mindestens ein Inhibitor zur Verfügung steht.
- Ähnlichkeit in Aminosäuresequenz:
Das potenzielle Wirkstoffziel im pflanzlichen System und das des bekannten Inhibitors sollten auf struktureller sowie Sequenzebene große Ähnlichkeit aufweisen, um die Wahrscheinlichkeit für die Wirksamkeit des Inhibitors zu erhöhen.
- Keine Redundanzen:
Das Wirkstoffziel sollte möglichst keine Isoformen auf Ebene des Genoms aufweisen, um einerseits die genetische Validierung und andererseits die Wirkstofffindung zu vereinfachen. Weiterhin sollte keine funktionelle Redundanz für den Prozess durch ein anders Enzym bestehen.
- Abwesenheit in tierischen Organismen:
Der zu hemmende Stoffwechselweg sollte zur Minimierung toxikologischer Risiken möglichst nicht im Menschen beziehungsweise vielzelligen Tieren vorkommen.

Sind diese Kriterien erfüllt, so gilt es, das Wirkstoffziel unter Einsatz des *tool-compounds* zu validieren. Hierbei kann das Erfüllen weiterer Kriterien als Leitlinie gelten:

- *In-vivo* Aktivität des Inhibitors:
 - Der Inhibitor beeinflusst den Phänotyp der Pflanze und führt zu letalen Konsequenzen.

- Dieser inhibitorische Effekt ist spezifisch für den zu hemmenden Stoffwechselweg und kann durch Zugabe einer weiteren, für den Prozess spezifischen Substanz, kompensiert werden (beispielsweise Zusetzen des Produkts der gehemmten Enzymreaktion).
- *In-vitro* Aktivität des Inhibitors:
 - Der zu untersuchende Prozess (beziehungsweise seine Teilschritte) lässt sich losgelöst vom Organismus im Reagenzglas abbilden, um die Spezifität der Inhibition studieren zu können.
 - Der Inhibitor vermag es, den Prozess ganz oder teilweise in diesem *in-vitro* System zu unterbinden
- Genetische Validierung:
 - Durch Mutation des Gens oder durch eine Überexpression (Expression des Gens wird über die Norm heraufreguliert) lässt sich eine erhöhte Toleranz gegenüber dem Inhibitor erzeugen.
 - Durch Herunterregulieren der Expression oder vollständiges Abschalten des Gens lässt sich eine erhöhte Anfälligkeit für den Inhibitor beziehungsweise ein letaler Phänotyp induzieren.

Die Validierung des Wirkstoffziels kann darüber hinaus durch Erkenntnisse aus biophysikalischen Versuchen, *in-silico* Studien (computergestütztes Abbilden der räumlichen Struktur des Wirkstoffziels, gefolgt vom Einfügen des Wirkstoffs in die simulierte Struktur) sowie der Ermittlung des Genexpressions-Profiles bereichert werden. Für eine umfassende Validierung oder Devalidierung nehmen jedoch die zuvor genannten Kriterien (*in-vivo*-, *in-vitro*- und genetische Validierung) eine Schlüsselrolle ein.

Als pflanzliches Studienobjekt dient der Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* (auch Acker-Schmalwand; Organismuskürzel At), der seit Jahrzehnten breite Anwendung in der pflanzlichen Grundlagenforschung findet.

Durch einen relativ kurzen Generationszyklus (acht Wochen von Keimung bis Samenreife; unter Laborbedingungen) sowie ein kleines diploides Genom (135 mega Basenpaare [Mbp], 2 x 5 Chromosomen) eignet sich die Pflanze gut für Manipulationsstudien wie Überexpression, Knockout (KO) (Knockout: vollständiges Abschalten des betreffenden Gen) sowie allgemein zur genetischen Forschung. Weiterhin dient *Arabidopsis thaliana* dem Studium der Physiologie

höherer Pflanzen und kann in der Herbizid-Forschung als Vertreter der Dikotylen (Zweikeimblättrige) verwendet werden.

Der eine Teil der Arbeit befasst sich mit der Validierung des Enzyms DHNS/AtMENB (At1g60550) als möglichem Wirkstoffziel, basierend auf Erkenntnissen aus der Antibiotikaforschung am bakteriellen Syntheseweg von Menaquinon (Vitamin K₂), dessen pflanzliches Analogon die Phylloquinon-Synthese (Vitamin K₁) ist. Hierfür wird der mehrstufige Syntheseweg vom Ausgangsstoff Chorismat zum Endprodukt Phylloquinon samt der Rolle der beteiligten Enzyme beschrieben. Durch die bekannte Analogie von Phylloquinon- und Menaquinon-Syntheseweg ist es naheliegend, dass Inhibitoren der Menaquinon-Synthese (Antibiotikaforschung) ebenfalls die Phylloquinon-Synthese beeinflussen könnten.

Der andere Teil widmet sich der Identifikation des Wirkstoffziels der Psoromsäure in Pflanzen. Psoromsäure wurde in Studien zu neuen Krebstherapeutika als Inhibitor des humanen Spleißosoms identifiziert. Da multiple Untereinheiten des Spleißosoms hochgradig konserviert sind, ergibt sich hieraus die Hypothese, dass die Psoromsäure das Spleißen nicht nur in humanen Zellen, sondern auch in Pflanzen beeinflussen könnte. Das Spleißen ist in Eukaryoten der Prozessierungsschritt zwischen Transkription und Translation, in dem die „Abschrift“ der DNS (prä-mRNS) von den nicht-codierenden Sequenzen bereinigt wird.

Im Folgenden soll der aktuelle Wissensstand der beiden studierten Prozesse – Phylloquinon-Synthese einerseits und Spleißen andererseits – beleuchtet werden.

II. Wissensstand

II.1. Validierung von DHNS (*At1g60550*) als Wirkstoffziel

II.1.1 Die Rolle von Phyloquinon im pflanzlichen Organismus

Alle Prozesse, die den Organismus mit Energie und Substanz versorgen sowie dem Um- oder Abbau von Substanz dienen, lassen sich unter dem Merkmal des Stoffwechsels zusammenfassen. Dieser gehört zu den Grundvoraussetzungen des Lebens.

In Pflanzen dient Licht als hauptsächliche Energiequelle, sie werden daher als photoautotrophe Lebewesen bezeichnet. Sie sind in der Lage, energiereiche chemische Verbindungen unter Zuhilfenahme von Sonnenlicht aus einfacheren anorganischen Molekülen aufzubauen. Der Prozess des Konvertierens von Lichtenergie zu chemischer Energie wird als Photosynthese bezeichnet. Lichtenergie wird verwendet, um Wasser (H_2O) zu oxidieren, Kohlenstoffdioxid (CO_2) zu reduzieren und somit größere Kohlenstoffverbindungen, hauptsächlich Zucker ($C_6H_{12}O_6$), zu formen, wobei Sauerstoff (O_2) freigesetzt wird.

Diese Abfolge kann in zwei Teile untergliedert werden, die Lichtreaktion und die Dunkelreaktion, auch Calvin-Benson-Zyklus genannt.

Die Photosynthese ist Gegenstand ausgiebiger Forschung und zahlloser Publikationen, daher soll im Folgenden nur auf diejenigen Bereiche eingegangen werden, die für das Verständnis dieses Forschungsvorhabens vonnöten sind.

Die folgenden Informationen wurden unter Zuhilfenahme der genannten Lehrbücher zusammengefasst (Johnson 2016; Buchanan, Griseem & Jones 2015; Taiz 2015; Strasburger et al. 2014).

Innerhalb der Lichtreaktion werden Elektronen in den Reaktionszentren der Photosysteme I und II (PSI; PSII) auf ein höheres Energieniveau gehoben und über eine Elektronentransportkette von einem auf den nächsten Sub-Komplex der Thylakoid-Membran übertragen.

Dies dient final dazu, die energiereichen Moleküle ATP und NADPH zu erzeugen, die für die Zuckersynthese innerhalb der Dunkelreaktion, sowie für weitere zelluläre Prozesse gebraucht werden.

Im Zuge dieses Übertragens von Elektronen von einem auf den nächsten Komplex spielt **Phylloquinon** (A_1) eine zentrale Rolle, da es auf Grund seiner chemischen Eigenschaften sowohl als Elektronen-Akzeptor als auch als -Donor dient. Es ist im Photosystem I lokalisiert und überträgt Elektronen von Chlorophyll a (A_0) auf das Eisen-Schwefel-Cluster (FeS_x).

Im Zuge der Lichtreaktion werden Elektronen des Reaktionszentrums P680 [Absorptionsmaximum bei 680 nm] (Photosystem II; PSII) auf ein höheres Energieniveau gehoben und vom primären Akzeptor eingefangen. Die hierbei entstehende Elektronenlücke wird durch Oxidation von Wasser geschlossen, als Nebenprodukte resultierten hieraus Sauerstoff (O_2) und Protonen (H^+). Ausgehend vom primären Akzeptor werden die angeregten Elektronen über mehrere Redoxreaktionen (Plastoquinon (PQ/PQH_2) - Cytochrom b_6f -Komplex - Plastocyanin (PC)) auf Photosystem I (PSI) übertragen. Am Reaktionszentrum des PSI (P700; Absorptionsmaximum bei 700 nm) werden ebenfalls durch Lichtabsorption Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben. Über eine intrinsische Elektronentransportkette werden diese Elektronen auf Ferredoxin (Fd) übertragen, das zur Reduktion von $NADP^+$ zu NADPH gebraucht wird. Die entstandene Elektronenlücke an P700 wird durch die übertragenen Elektronen von PSII geschlossen. In einem sogenannten zyklischen Elektronentransport können Elektronen über Ferredoxin und Plastoquinon ebenfalls auf den Cytochrom b_6f -Komplex übertragen werden. Hierbei kommt es zu einer Protonentranslokation von Stroma zu Lumen. Die im Thylakoid-Lumen befindlichen Protonen dienen der ATP-Synthase (Transmembranprotein) als Antrieb und treiben somit die Synthese von ATP aus ADP und Phosphat (P_i) an (Abbildung 1).

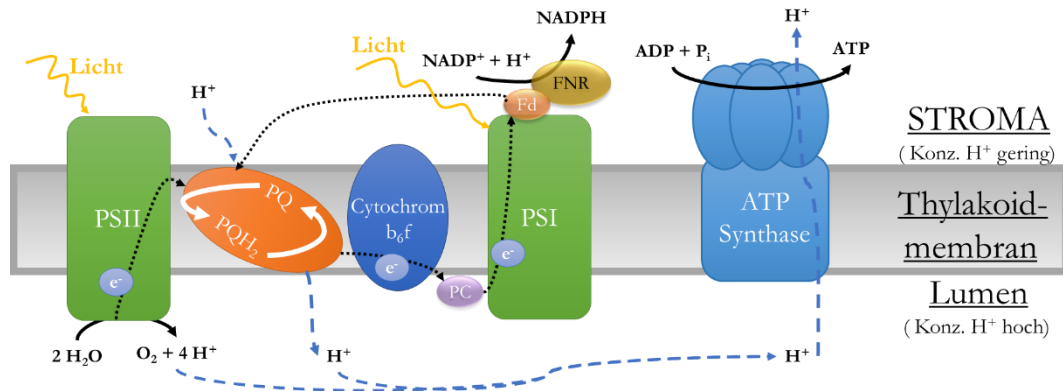


Abbildung 1

Übersichtsschema des photosynthetischen Elektronen- und Protonentransport an der Thylakoidmembran

Elektronen werden am PSII durch Lichtabsorption auf ein höheres Energieniveau gehoben und über mehrere Redoxreaktionen (PQ/PQH₂; Cytochrom b₆f; PC) auf PSI übertragen. Am PSI werden ebenfalls Elektronen durch Lichtabsorption auf ein höheres Energieniveau gehoben und über eine intrinsische Elektronentransportkette auf Fd übertragen, das zur Reduktion von NADP⁺ zu NADPH verwendet wird. Die entstandene Elektronenlücke wird durch das übertragene Elektron von PSII geschlossen. Die Elektronenlücke am PSII wird durch die Oxidation von H₂O geschlossen, hierbei entsteht als Nebenprodukt O₂. Der Protonengradient zwischen Thylakoid-Lumen und Stroma treibt die Synthese von ATP aus ADP und P_i am Transmembranprotein ATP-Synthase an.

e⁻: Elektron, H⁺: Proton; H₂O: Wassermolekül; O₂: molekularer Sauerstoff; PSII: Photosystem II; PQ: Plastoquinon; PQH₂: Plastohydroquinon; PC: Plastocyanin; PSI: Photosystem I; Fd: Ferredoxin; FNR: Ferredoxin-NADP⁺-Reduktase; NADP⁺/NADPH: Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidierte/reduzierte Form); ADP: Adenosindiphosphat; P_i: Phosphat; ATP: Adenosintriphosphat;

[Verändert, Nach: (Taiz 2015; Strasburger et al. 2014)]

Der PSI-Komplex setzt sich aus 19 Untereinheiten sowie 200 Co-Faktoren zusammen. Die zwei großen Untereinheiten PsaA und PsaB bilden als Heterodimer den Kern des Reaktionszentrums mit dem Chlorophyll-a-Dimer P700. Sie koordinieren gemeinsam das Eisen-Schwefel-Cluster FeS_x und beinhalten jeweils **Phylloquinon** (A_{1A}, A_{1B}) sowie Chlorophyll-a-Monomere (A₀), die als Co-Faktor der Elektronentransportkette fungieren. Die kleine Untereinheit PsaC beherbergt die Eisen-Schwefel-Cluster FeS_A und FeS_B und wirkt somit ebenfalls an der Elektronentransportkette mit. Die restlichen Untereinheiten dienen zur Stabilisierung des Komplexes, der Interaktion mit den Lichtsammel-Komplexen (LHC; light harvesting complex) sowie der Bindung von Ferredoxin (Fd) und Plastocyanin (PC) (Abbildung 2).

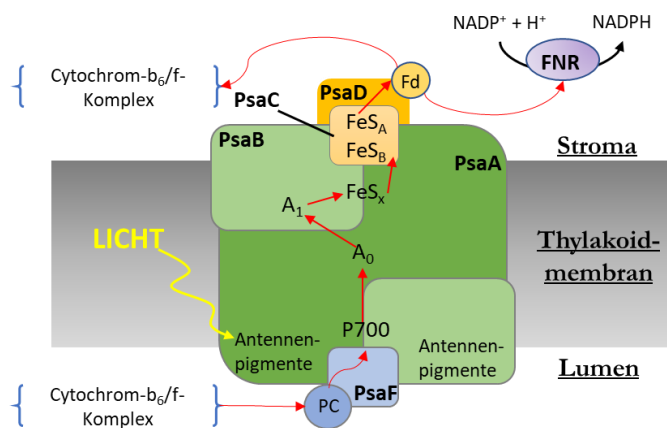


Abbildung 2

Schematischer Aufbau des PSI-Komplexes

Durch Lichtabsorption werden Elektronen am Reaktionszentrum P700 auf ein höheres Energieniveau gehoben. Daraufhin erfolgt ein Elektronentransport über Chlorophyll-a (A_0), Phylloquinon (A_1) sowie Eisen-Schwefel-Cluster (FeS_x) zu Ferredoxin (Fd), das zur Reduktion von $NADP^+$ zu $NADPH$ benötigt wird. Fd kann ebenso Elektronen via Plastoquinon auf den Cytochrom-b₆f-Komplex übertragen, hierbei spricht man vom zyklischen Elektronentransport, dieser dient ebenso zum Aufbau eines Protonengradienten zwischen Thylakoid-Lumen und Stroma. Elektronenfluss (→); PC: Plastocyanin; P700: Chlorophyll-a Dimer P700; A_0 : Chlorophyll-a-Monomer; A_1 : Phylloquinon; FeS_x : Eisen-Schwefel-Cluster; Fd: Ferredoxin; FNR; Ferredoxin- $NADP^+$ -Reduktase; Psa(): Untereinheit von PSI [Verändert; Nach: (Strasburger et al. 2014)]

PSI katalysiert einen transmembranen Elektronentransport, hierfür wird Plastocyanin im Lumen oxidiert und Ferredoxin im Stroma reduziert. Sie kann daher auch als eine lichtgetriebene Plastocyanin-Ferredoxin Oxidoreduktase beschrieben werden.

Für die intrinsische Elektronentransportkette des PSI werden sechs Chlorophyll-*a*-, zwei Phylloquinon-Moleküle (PhQ; A_1) sowie drei Eisen-Schwefel-Cluster (FeS) benötigt.

Die PhQ-Moleküle, die sich in beiden großen Untereinheiten finden, dienen in diesem Prozess als wichtige **Elektronenüberträger**. Dies liegt in ihrer chemischen Struktur begründet, die es ermöglicht zwischen Quinon- und Hydroquinonform zu wechseln und dabei Elektronen aufzunehmen oder abzugeben. (Wallace & Young 1977)

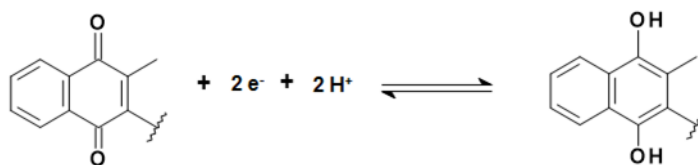


Abbildung 3

2-Methyl-1,4-naphthoquinon-Derivate in Quinon- und Hydroquinonform

Heute sind drei natürliche Derivattypen des **2-Methyl-1,4-naphthoquinon** bekannt, Phylloquinon ist einer davon. Sie unterscheiden sich lediglich in den Prenyl-Seitenketten, die an der Substitutionsposition 3 des Naphtalins angefügt sind.

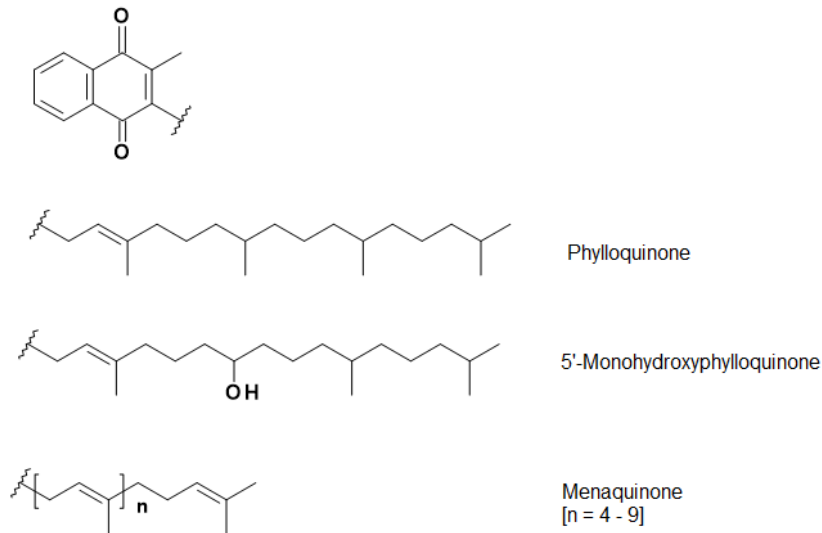


Abbildung 4

Die unterschiedlichen 1,2-Methyl-1,4-naphthoquinon-Derivate

Mit Ausnahme des 5'-Monohydroxyphylloquinon werden sie unter dem generischen Namen Vitamin K zusammengefasst (Collins & Jones 1981; Emonds-Alt et al. 2017). Phylloquinon ist hierbei Vitamin K₁, während die Analoga des Menaquinon mit unterschiedlich langen Isopren-Seitenketten als Vitamin K₂ bezeichnet werden.

Innerhalb des menschlichen Organismus dient Vitamin K als Kofaktor der γ -Glutamylcarboxylase zur Aktivierung von Proteinen durch Addition einer Carboxylgruppe (-COOH) an deren Glutamylreste. Insgesamt sechs der so posttranslational modifizierten Proteine werden mit dem Blut-Gerinnungssystem assoziiert. Schon bei seiner Entdeckung in den 1930ern wurde Vitamin K₁ als Faktor der Blutgerinnung in Vertebraten identifiziert, was sich auch in dem zugeteilten Buchstaben widerspiegelt (K für Koagulation; (Dam 1946)).

Darüber hinaus spielt die Vitamin K abhängige γ -Carboxylierung im Knochenstoffwechsel (Osteocalcin; Knochenmineralisation) sowie im Zellwachstum (Protein S und Gas6; Liganden von Rezeptor-Tyrosinkinasen) eine elementare Rolle (Basset et al. 2017).

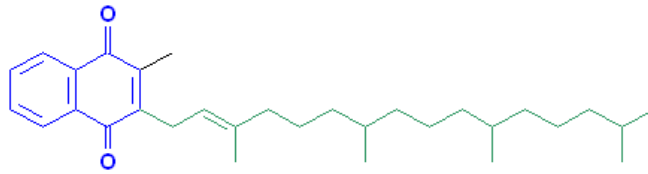


Abbildung 5

Phylloquinon

IUPAC: 2-methyl-3-[(E)-3,7,11,15-tetramethylhexadec-2-enyl]naphthalene-1,4-dione;

Blau: Naphthoquinone ring; Grün: phytyl Seitenkette (C20)

Phylloquinon (Abbildung 5) wird ausschließlich von Pflanzen, Grünalgen und einigen Cyanobakterien produziert. Es dient als essentieller Elektronenüberträger von Chlorophyll *a* zum Eisenschwefelcluster FeS_x des heterodimeren Reaktionszentrums PsaA/PsaB in PSI (Abbildung 2) (Brettel, Sétif & Mathis 1986; Sigfridsson, Hansson & Brzezinski 1995).

Weiterhin agiert es als Elektronenakzeptor während der Bildung von Protein-Disulfidbrücken im Thylakoidlumen (Karamoko et al. 2011; Furt et al. 2010).

Im Gegensatz zu **Phylloquinon** finden sich Varianten des **Menaquinones** auch in nicht photosynthetisch aktiven Organismen, wie etwa Bakterien. Hierbei dienen sie in der Atmungskette, der oxidativen Phosphorylierung und dem Aufbau des Transmembranpotentials als notwendige Elektronenüberträger.

Da es sich bei Phylloquinon und Menaquinon für höhere Tiere um Vitamine handelt, müssen diese per Definition „von außen“ zugeführt werden. Dies geschieht im Fall von Menaquinon teilweise durch die Bakterien der Darmflora, bei Phylloquinon erfolgt die Aufnahme primär über grüne pflanzliche Kost wie beispielsweise Grünkohl, Rosenkohl, Koriander oder Petersilie.

Die Synthesewege von Phylloquinon und Menaquinon sind daher sehr interessante Angriffspunkte für zukünftige Herbizide und Antibiotika, da sie keine Entsprechung in höheren Tieren finden und folglich das Risiko für toxikologisch relevante Effekte minimiert wird.

Das Prinzip, primär solche Ziele für zukünftige Herbizide zu wählen, die nicht in Tieren vorkommen, ist weit verbreitet. So hemmt beispielsweise Glyphosat die 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase (EPSPS), die für die Synthese der aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin essenziell ist. Diese Aminosäuren (mit Ausnahme von Tyrosin, das aus Phenylalanin synthetisiert werden kann) sind sogenannte essenzielle Aminosäuren, die nicht vom tierischen Organismus hergestellt werden können und somit (so wie Vitamine) „von außen“ zugeführt werden müssen.

II.1.2 Syntheseweg von Menaquinon und Phylloquinon

Der Syntheseweg des **Menaquinones** ist seit Jahrzehnten umfassend beschrieben (Bentley & Meganathan 1982; Meganathan & Kwon 2009). Für das **Phylloquinon** konnten Ergebnisse der letzten Jahre paraloge und multifunktionale Enzyme im Biosyntheseweg nachweisen (in den Bereichen der reversen Genetik und biochemischer Studien, am Modellorganismus *Arabidopsis thaliana*) (Gross et al. 2006). Hierbei wird **Phylloquinon** *de novo* in zehn aufeinanderfolgenden enzymatischen Schritten aufgebaut (Reumann 2013). Eine Besonderheit ist hierbei die Aufteilung seines Synthesewegs zwischen Chloroplast und Peroxisom. Somit müssen die Intermediate zwischen diesen Zellkompartimenten ausgetauscht werden (Gross et al. 2006).

Als Vorstufe des Naphthoquinonrings des Phylloquinons dient Chorismat, das aus dem Shikimate Pathway stammt. Dieses wird im ersten Schritt von der Isochorismat-Synthase isomerisiert. In *Arabidopsis* liegt das betreffende Enzym in zwei Isoformen vor, **ICS1** und **ICS2** vor, im bakteriellen Syntheseweg wird das entsprechende Enzym als **MenF** bezeichnet. Die Einzelknockouts dieser pflanzlichen Gene liefern auf Grund der funktionellen Redundanz keinen letalen Phänotyp, sondern resultieren in lebensfähigen, photoautotrophen Pflanzen. Bei einem Doppelknockout (Doppelknockout: Abschalten der Gene beider Isoformen) wird kein Phylloquinon gebildet, und es erfolgt ein letaler Phänotyp (Garcion et al. 2008; Strawn et al. 2007; Wildermuth, Dewdney, Wu & Ausubel 2001; Gross et al. 2006). In einem vom multifunktionalen Enzym **PHYLLO** katalysierten Prozess wird zuerst 2-Oxoglutarat an Isochorismat angehängt, um als Succinyl-Gruppe zu dienen. Hierauf erfolgt die Elimination von Pyruvat sowie die Aromatisierung zu o-Succinylbenzoat (OSB). In Bakterien werden diese Schritte von drei unterschiedlichen Enzymen durchgeführt: **MenD**, **MenH** und **MenC**. Ein Knockout des Gens *phyllo* führt zu einem letalen Phänotyp, da diese Vielzahl an enzymatischen Schritten ausschließlich von diesem Protein abhängt (Gross et al. 2006).

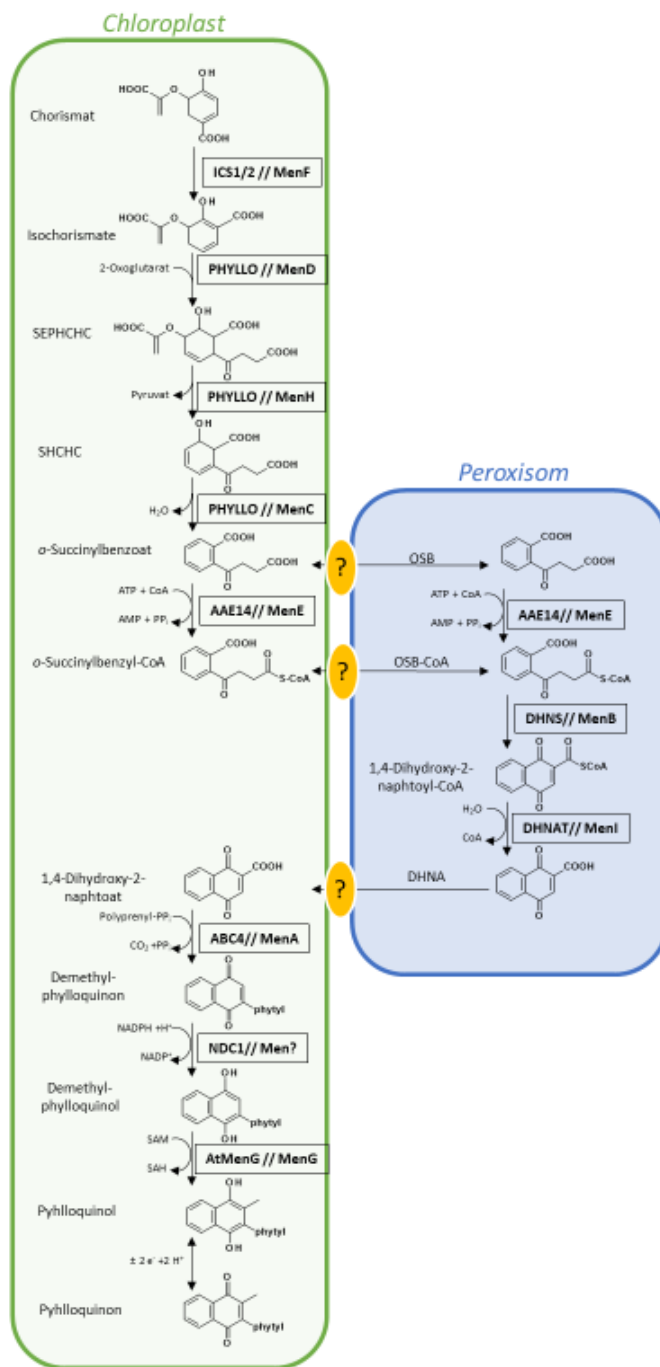


Abbildung 6
 Biosyntheseweg des Phylokinon mit Aufteilung zwischen Chloroplast und Peroxisom
 SEPHCHC: 2-Succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexen-1-carbonsäure
 SHCHC: (1R,6R)-2-Succinyl-6-hydroxy-2,4-cyclohexadiene-1-carbonsäure
 [Verändert; Nach (Babujee et al. 2010; Basset et al. 2017)]

Durch Anhängen von CoA an die Succinyl-Gruppe von OSB entsteht das aktivierte Intermediat o-Succinylbenzyl-CoA (OSB-CoA). Diese Reaktion wird von der OSB-CoA-Ligase (AAE14/MenE) durchgeführt, die sowohl im Chloroplast als auch im Peroxisom nachgewiesen werden kann (Kim, van Oostende, Basset & Browse 2008; Lohmann et al. 2006; Babujee et al. 2010).

Im Peroxisom wird OSB-CoA von der DHNA-CoA-Synthase (DHNS/MenB) zum CoA-Thioester von 1,4-Dihydroxy-2-Naphthoat (DHNA-CoA) cyclisiert. Da die DHNS ausschließlich im Peroxisom nachgewiesen werden kann, muss ihr Substrat komplett (OSB-CoA) oder in seinen Edukten (OSB + CoA) aus dem Chloroplast importiert werden (Babujee et al. 2010; Reumann et al. 2007). Die zuständigen Transporter konnten bisher jedoch nicht aufgeklärt werden.

In der folgenden Reaktion wird DHNA-CoA zu DHNA hydrolysiert. Das betreffende

Enzym, die DHNA-Thioesterase (DHNAT/MenI), liegt in zwei Isoformen vor, die wiederum exklusiv nur im Peroxisom nachgewiesen werden können (Widhalm, van Oostende, Furt & Basset 2009). Die DHNA muss für die Folgereaktionen wiederum ins Chloroplast exportiert werden, der betreffende Transporter konnte bisher nicht identifiziert werden.

Während ein KO des Gens *aae14* letale Konsequenzen nach sich zieht (Kim, van Oostende, Basset & Browse 2008), führte selbst ein Doppelknockout der Gene *dbnat1* und *dbnat2* zu keinen merklichen Beeinträchtigungen. Bei Letzterem könnte jedoch auch ein Knockdown (KD) anstatt eines KOs vorliegen, da die betreffenden Loci noch ein geringes Level an Expression aufwiesen (Widhalm, van Oostende, Furt & Basset 2009; Widhalm et al. 2012).

Für die DHNA-CoA-Synthase sind bisher keine KOs aus *Arabidopsis thaliana* bekannt, in *Synechocystis sp. pcc 6803*, einem Cyanobakterium, konnte durch den KO des Gens der DHNS die Phylloquinon-Synthese jedoch komplett unterbunden werden (Johnson et al. 2000)

DHNA wird daraufhin durch die DHNA-Phytyl-Transferase (**ABC4/ MenA**) prenyliert, die die Kopplung an Phityldiphosphat katalysiert. Es resultiert Demethylphyloquinone (2-phytyl-1,4-naphthoquinone) (Shimada et al. 2005). Ein KO in diesem Schritt führt zum letalen Phänotyp.

Der finale Schritt des Synthesewegs von Phylloquinon besteht in der Methylierung von Demethylphyloquinone unter Verbrauch von *S*-Adenosylmethionine (SAM) durch Demethylphyloquinone-Methyltransferase (**AtMenG/MenG**) (Lohmann et al. 2006). Hierfür ist es jedoch notwendig, dass das Intermediat in seiner reduzierten Form, dem Quinol vorliegt, wie von *Fatimi et al.* bewiesen werden konnte. Dies wird durch die Typ II NAD(P)H-Dehydrogenase C1 (**NDC1**) erreicht (Fatimi et al. 2015). Knockouts in diesem letzten Segment führen zu keinen letalen Effekten, lediglich zu einer stärkeren Photosensitivität unter erhöhten Lichtbedingungen (Lohmann et al. 2006; Fatimi et al. 2015). Es ist weiterhin nicht bekannt, ob es eine enzymatische Entsprechung zur NDC1 innerhalb der Menaquinon-Synthese gibt.

Einige dieser Zwischenprodukte sind Schnittstellen zu anderen plastidären Synthesewegen, wie beispielsweise die von Chlorophyll, Tocopherol (Vitamin E) und Salicylsäure (Leistner 2012; Eugeni Piller, Glauser, Kessler & Besagni 2014; Eugeni Piller et al. 2011; Wildermuth, Dewdney, Wu & Ausubel 2001). Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass Störungen im Syntheseweg von Phylloquinon nicht auch zu weiteren Störungen in der Synthese wichtiger pflanzlicher Metabolite führt. So dient beispielsweise Isochorismat in Pflanzen als hauptsächlicher Vorläufer des Phytohormons Salicylsäure (SA), die die Abwehrreaktion (systemisch und lokal) auf Pathogene vermittelt (Torrens-Spence et al. 2019).

Insgesamt gleichen sich die Architektur der Phylloquinon-Biosynthese in Pflanzen und die der Menaquinon-Biosynthese einiger fakultativ anaeroben Bakterien in großen Teilen.

Die Suche nach neuen Wirkstoffziele für Antibiotika rückte die Menaquinon-Synthese in den Fokus neuerer Studien, die auf Grundlage kristallographischer Daten sowie von Hochdurchsatzscreenings erste Wirkstoffe identifizieren konnten (Paudel, Hamamoto, Panthee & Sekimizu 2016).

Durch die Ähnlichkeit zwischen Menaquinon und Phylloquinon in Struktur sowie Syntheseweg können die (in der Antibiotikaforschung) gefunden Wirkstoffe als Leitfaden, sogenannte *tool-compounds*, dienen, um ebenfalls die Enzyme der Phylloquinon-Synthese inhibieren zu können.

Wie durch die in der Literatur beschriebenen KO-Mutanten gezeigt werden konnte, haben Störungen in diesem Syntheseweg überwiegend letale Konsequenzen für die Pflanze (siehe Tabelle 1). Es handelt sich somit um einen essenziellen Syntheseweg für die Pflanze, dessen Intermediate und Produkt nicht über alternative Synthesewege bereitgestellt werden können.

Zusammenfassend handelt es sich bei diesem Syntheseweg demnach um ein vielversprechendes Ziel für Herbizide, da das Endprodukt für die Viabilität der Pflanze elementar ist und durch die Ergebnisse der Antibiotika-Forschung am bakteriellen Analogon ein Fundus an Wirkstoffen für erste Versuche vorliegt. Weiterhin findet sich dieser Syntheseweg ausschließlich in Pflanzen (Phylloquinon) und Mikroorganismen (Menaquinon), wodurch eine Inhibition von Synthesewegen innerhalb von Mensch und Tier durch die gefunden Inhibitoren weniger wahrscheinlich ist.

Tabelle 1

Die Enzyme des Phylloquinon Synthesewege, ihre Entsprechung in *E.coli* sowie die Folgen des KO
 KO: Knockout; WT: Wild-Typ (nach (Basset et al. 2017))

Name	EC Nummer (Phylloquinon Synthese)	<i>E.coli</i> <i>homolog</i>	<i>A.thaliana</i>	<i>A.thaliana</i> KO <i>Mutante</i>
Isochorismate Synthase	5.4.4.2	MenF	ICS1 (At1g74710) ICS2 (At1g18870)	Einzel KO von <i>ics1</i> und <i>ics2</i> lebensfähig; Doppel-KO <i>ics1/ics2</i> letal (Garcion et al. 2008; Gross et al. 2006)
SEPHCHC Synthase	2.2.1.9	MenD	PHYLLO (At1g68890)	KO ist letal; Reduzierung der PSI Aktivität um 85 - 90% im Vergleich zu WT (Gross et al. 2006)
SHCHC Synthase	4.2.99.20	MenH		
OSB Synthase	4.2.1.113	MenC		
OSB-CoA Ligase	6.2.1.26	MenE	AAE14 (At1g30520)	KO ist letal (Kim, van Oostende, Basset & Browse 2008)
DHNA-CoA Synthase	4.1.3.36	MenB	DHNS (At1g60550)	Bisher nicht charakterisiert
DHNA-Thioesterase	3.1.2.28	MenI	DHNAT1 (At1g48320) DHNAT2 (At5g48950)	Einzel- sowie Doppel- KO sind nicht letal; kein phänotypischer unterschied zu WT bei normalen Lichtverhältnissen (Widhalm et al. 2012)
DHNA Phytyltransferase	2.5.1.130	MenA	ABC4 (At1g60600)	KO ist letal (Shimada et al. 2005)
Demethylphyloquinone Reductase	1.6.5.12	?	NDC1 (At5g08740)	Bei KO kein Unterschied im Phänotyp im Vergleich zu WT unter normalen Lichtverhältnissen; leichter Anstieg in Photosensitivität unter intensivem Licht (Fatihi et al. 2015; Eugeni Piller et al. 2011)
Demethylphyloquinone Methyltransferase	2.1.1.326	MenG/ UbiE	MENG (At1g23360)	<i>AtMenG</i> KO weist langsames Wachstum bei normalem Licht auf; Reduzierung der Häufigkeit von PSI (Lohmann et al. 2006)

I.1.1.1. DHNA-CoA-Synthase (**DHNS**) als Ziel zukünftiger Herbizide

Als ein besonders vielversprechender Angriffspunkt von Antibiotika sowie von Herbiziden kann die *1,4-Dihydroxy-2-Naphthoyl-CoA-Synthase* (**DHNS/AtMenB**) angesehen werden, die die Zyklisierung von OSB-CoA zu DHNA-CoA katalysiert (Abbildung 7).



Abbildung 7
DHNS katalysierte Reaktion:
Zyklisierung von OSB-CoA zu 1,4-Dihydroxy-2-naphthoyl-CoA

Sie gehört der Crotonase-Superfamilie an und wird daher auch als Enoyl-CoA Hydratase/Isomerase D (ECHID) bezeichnet. Die Struktur von MenB konnte zuerst im Jahr 2003 von *Truglio et al.* in *M. tuberculosis* aufgelöst werden (Truglio et al. 2003). Mechanistisch gesehen katalysieren die Enzyme dieser Superfamilie eine Fülle an Reaktionen von Acyl-CoA-Thioestern, wobei immer ein Enolat-Anion als Intermediat stabilisiert werden muss, was zu einer strukturellen Ähnlichkeit innerhalb dieser Gruppe führt (Holden, Benning, Haller & Gerlt 2001). Die Enzyme weisen eine typische Quartärstruktur auf, die aus Trimeren geformt wird und durch konservierte NH-Gruppen die Bildung eines sogenannten „Oxyanion-Lochs“ ermöglicht, welches das besagte Intermediat stabilisiert. In einigen Fällen, wie beispielsweise auch bei **DHNS**, formt sich das aktive Enzym aus zwei dieser Trimere, somit liegt ein $(\alpha_3)_2$ Hexamer vor (Holden, Benning, Haller & Gerlt 2001; Truglio et al. 2003). Jedoch weist **DHNS** hierbei eine weitere Besonderheit auf, da die C-Termini der einzelnen Monomere die Trimer-Trimer-Oberfläche kreuzen und damit den flexiblen Teil des aktiven Zentrums im entgegengesetzten Trimer formen, somit ist das Enzym nur als Hexamer aktiv (Truglio et al. 2003; Johnston, Arcus & Baker 2005).

In der katalysierten Reaktion wird *o*-Succinylbenzoyl-CoA (OSB) zu 1,4-Dihydroxy-2-naphthoyl-CoA (DHNA-CoA) umgesetzt. Dies geschieht in einer vielschrittigen, basenvermittelten Acylierung der beiden Carbonsäure-Anteile des Moleküls, sie kann auch als intramolekulare Claisen-Kondensation beschrieben werden.

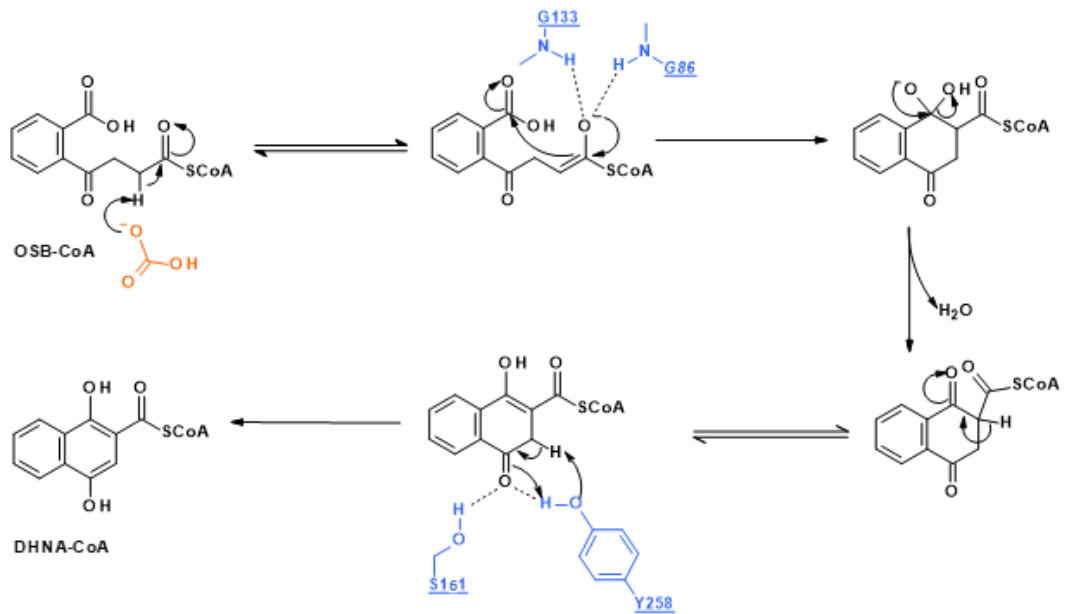


Abbildung 8

Intramolekulare Claisen Kondensation von OSB-CoA zu DHNA-CoA; Typ I Reaktion von EcMenB Bicarbonation (orange); aktive Gruppen von EcMenB (blau) [Nach (Li et al. 2011b; Jiang, Chen, Guo & Guo 2010; Sun et al. 2012)]

Die Reaktion wird durch das Entstehen des Enolat-Intermediates in Gang gesetzt. Das Intermediat wird im ersten Oxyanion-Loch durch Glycin-Reste stabilisiert (Jiang, Chen, Guo & Guo 2010; Li et al. 2011b). Dies ermöglicht den nucleophilen Angriff des Enolats auf die nicht aktivierte Carboxylgruppe, die in diesem Kontext als Elektrophil dient. Es erfolgt der Ringschluss sowie das Entstehen des tetrahedralen Oxyanion, das laut *Chen et al.* durch einen Asparaginsäurerest an über Wasserstoffbrückenbindung stabilisiert wird (Chen et al. 2011). Nach Abspalten von Wasser entsteht der Naphtalin-Ring durch Ketol-Enol-Tautomerisation, wobei erneut Enolat-Intermediate durchlaufen werden.

Chen et al. und *Li et al.* postulieren hierfür ein Netzwerk von Wasserstoffbrücken, resultierend aus strukturellen Veränderungen der aktiven Tasche im Zuge der Reaktion, das die entstehenden Enolate stabilisiert (Chen et al. 2011; Li et al. 2011b). Diese Theorie konnte von *Sun et al.* weiter untermauert werden, somit kann von einem „Induced-Fit“-Mechanismus im Zuge der Reaktion ausgegangen werden (Sun et al. 2013).

Um das initiale Enolat-Intermediat zu generieren, muss der α -Kohlenstoff des Coenzym-A-Thioesters deprotoniert werden. Diese Deprotonierung erfordert in einigen Enzymen die Präsenz eines Bicarbonats als basische Gruppe, wohingegen andere Enzyme ein Aspartat in ihrer aktiven Tasche aufweisen, das diese Rolle einnimmt (Asp-185 bei MtMenB; *Mycobacterium tuberculosis*). Somit lassen sich zwei Typen unterscheiden: Typ I abhängig von

Bicarbonat, Typ II unabhängig von Bicarbonat (Chen et al. 2011; Jiang, Chen, Guo & Guo 2010; Sun et al. 2012; Sun et al. 2013).

Die bisher am umfassendsten charakterisierte MenB-Variante der Phylloquinon-Synthese ist *ScMenB*, die aus dem Cynaobakterium *Synechocystis* sp.PCC6803 stammt. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen von EcMenB (Menaquinon-Synthese) mit seinem Ortholog ScMenB (Phylloquinon-Synthese), offenbart eine große Ähnlichkeit (siehe Abbildung 9, Anhang I; 68,15 % vollständige Übereinstimmung der Sequenz, 80% starke Übereinstimmung). Diese Sequenzanalyse zeigt weiterhin auf, dass es sich bei beiden Enzymen um Typ I Enzyme handeln sollte, da ihnen das entsprechende Aspartat innerhalb der aktiven Tasche fehlt (Abbildung 9) und sie daher auf ein exogenes Bicarbonat angewiesen sind. Ebenso zeigten KO-Mutanten des betreffenden Gens in *E. coli* und *Synechocystis* einen gleichermaßen essentiellen Charakter auf, da beide ohne MenB nicht lebensfähig sind (Song & Guo 2012; Chen et al. 2013). Da für die **DHNS** des Modellorganismus *A. thaliana* keine KO-Linie beschrieben ist (Tabelle 1), können nur Vermutungen über die Konsequenzen angestellt werden. Die Erkenntnisse aus *E. coli* und insbesondere *Synechocystis* (ebenfalls Phylloquinon-Synthese) legen jedoch die Vermutung nahe, dass ein KO ebenfalls letale Folgen nach sich ziehen sollte.

Insgesamt ist die **DHNS** weitestgehend noch nicht beschrieben (Reumann 2013; Basset et al. 2017). Bekannt ist, dass es sich, trotz ihrer Funktion in einem plastidären Syntheseweg, um ein im Zellkern codiertes Protein handelt. Studien an Peroxisomen von Spinat konnten beweisen, dass **DHNS/AtMenB** im Peroxisom lokalisiert ist. Als wichtiger Anhaltspunkt hierfür kann auch das sogenannte PTS2 (*peroxisomal targeting signal type 2*) Nonapeptid (RLSVVTNHL in *Arabidopsis*) gewertet werden, das in höheren Pflanzen am N-Terminus konserviert vorliegt (Gross, Meurer & Bhattacharya 2008; Babujee et al. 2010; Reumann et al. 2007). Hierbei handelt es sich um eine Sequenz aus neun Aminosäuren, die auch als Transitpeptid bezeichnet wird, da sie sowohl den Bestimmungsort als auch den Transportweg des Proteins festschreibt.

Durch Sequenzanalysen lässt sich **AtMenB/DHNS** als Typ I Enzym (s.o.) charakterisieren, diese Klassifizierung gründet auf der Sequenz der aktiven Tasche. Wie aus Abbildung 9 (Auszug der Sequenzanalyse, bildet Teilsequenz der aktiven Tasche ab; für Gesamtabgleich siehe Anhang I) ersichtlich, weist DHNS an der Position 208, die zu Position 185 von MtMenB korrespondiert, ein Glycin anstatt eines Aspartats auf. Somit ist DHNS auf eine exogene basische Gruppe zur Deprotonierung des CoA-Thioesters angewiesen, was sie als Typ I Enzym klassifiziert.

DHNS_ARATH	164	QVQIRRLPKPVIAMVAGYAVGGGHILHMCDDLTAAD-NAIFGQTGPKVGSFDAGYGSSI	222
MENB_ECOLI	112	QFQIRTCPKPVMVAGYSIGGGHVLHMMCDLTAAD-NAIFGQTGPKVGSFDGGWGASY	170
MENB_SYNY3	102	QRLIRSMKVVIALVAGYATGGGHVLHLVCDLTAAD-NAIFGQTGPKVGSFDGGFSSY	160
MENB_MYCTU	140	QRLIRFMPKVVICLVNGWAAGGGHSLHVCDLTASREYARFQTADVGSFDGGYGSAY	199
		* * * * * : : : * * * * * : : : * * * * * : : : * * * * * : : *	

Abbildung 9

Auszug aus Sequenzabgleich von DHNS mit Referenzsequenzen aus E.coli, Synechocystis sp. PCC6830 sowie M.tuberculosis im Ein-Buchstabencode der Aminosäuren; Zahlen: Start-/Endposition der Sequenz; ARATH: Arabidopsis thaliana, ECOLI: Escherichia coli; SYNY3: Synechocystis; MYCTU: M.tuberculosis; „“: vollständige Übereinstimmung; „:“: starke Übereinstimmung; „.“: schwache Übereinstimmung; Kasten (orange): Position des Aspartats zur Deprotonierung des CoA-Thioesters (Asp-185; MtMenB);
Blau: sauer, **Pink:** basisch (ohne Histidin), **Rot:** unpolar/ hydrophob (ohne Tyrosin); **Grün:** polar/ neutral (mit Tyrosin und Histidin)
 Sequenzabgleich durchgeführt mit Clustal Omega (1.2.4) Standardinstellungen (Madeira et al. 2019)*

Ein globaler Abgleich der Aminosäuresequenz von DHNS und EcMenB zeigt eine Sequenzabdeckung von 78 %. Innerhalb dieses Bereichs stimmen die Sequenzen zu 69,1 % vollständig überein, die starke Übereinstimmung liegt bei 80 %. Die unvollständige Sequenzabdeckung liegt einzig in den ersten 73 Aminosäuren des N-terminus begründet, nach Entfernen dieser werden 100 % erreicht. In Anbetracht der Tatsache, dass die DHNS im Peroxisom lokalisiert ist, erscheint dieser Fund erwartbar. Signal- oder Transitpeptide sind vornehmlich N-terminal lokalisiert. Diese erste Sequenz hat somit für die enzymatische Betrachtung keine Aussagekraft, sondern dient dem Transport des Proteins zum Zielort.

II.1.3 MOCB: Der Inhibitor der MenB-Reaktion von *S. aureus*, *E. coli* und *M. tuberculosis*

Inhibitoren für SaMenB, EcMenB sowie MtMenB wurden im Zuge mehrerer Hochdurchsatzscreenings im gekoppelten Enzym-Assay gefunden. Um die enzymatische Reaktion von MenB studieren zu können, bedarf es einer Kopplung dieser Reaktion mit der vorherigen (MenE; OSB → OSB-CoA). Dies ist mit der Instabilität des Substrats (OSB-CoA) begründet, das dazu neigt, unter Abspaltung von CoA zu einem Lacton zu zyklisieren.

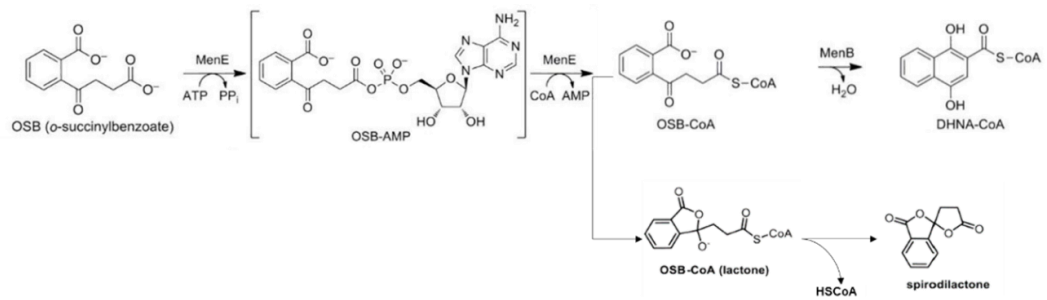


Abbildung 10

MenE-MenB-Reaktion mit OSB-AMP-Intermediat sowie der Lactonisierungsreaktion

OSB wird in einem ersten Schritt von MenE unter Verbrauch von ATP zu dem Intermediat OSB-AMP umgewandelt.

Adenosinmonophosphat (AMP) wird daraufhin von Coenzym-A verdrängt, hierdurch entsteht das Produkt der MenE-Reaktion OSB-CoA. In der darauffolgenden Reaktion, die von MenB katalysiert wird, cyclisiert OSB-CoA zu DHNA-CoA wobei Wasser abgespalten wird, man spricht somit von einer Kondensation. Da Coenzym-A ebenso eine gute Abgangsgruppe darstellt, kann sowohl im basischen als auch im sauren Milieu eine Lactonisierung stattfinden, bei der sich unter Abspaltung von Coenzym-A ein heterocyclisches System intramolekularer Esterbindungen ausbildet.

Hierbei erwies sich, dass insbesondere Analoga zu OSB, wie beispielsweise 4-Oxo-phenylbut-2-Enoate, die größte inhibitorische Wirkung aufweisen (Truglio et al. 2003; Li et al. 2011c; Lu et al. 2012; Matarlo et al. 2016; Xu 2009).

Li et al. konnte zudem zeigen, dass die Inhibitoren als CoA-Addukte in der Zelle vorliegen und in dieser Form einen stärkeren inhibitorischen Effekt auf MenB ausüben. In dieser Form ist es den Inhibitoren jedoch nicht möglich, aufgenommen zu werden. Die Aktivierung bzw. Modifikation hat folglich in der Zelle zu erfolgen, man spricht in diesem Kontext von einer „Prodrug“. Unter dieser Bezeichnung finden sich Stoffe, die in inaktiver oder weniger aktiver Form vom Organismus aufgenommen werden und erst durch einen Umwandlungsschritt (Metabolisierung) in ihre eigentliche aktive Wirkform überführt werden.

Als Mechanismus wurde hierfür eine Michael-Addition postuliert. Zudem wurde postuliert, dass das Inhibitor-CoA-Addukt eine Struktur einnimmt, die der des Enolat-Anions gleicht und somit das „Oxyanion-Loch“ besetzt (Li et al. 2011c).

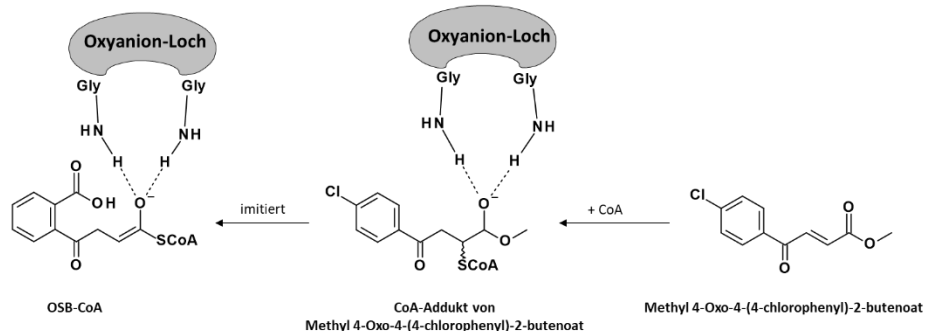


Abbildung 11

Hypothetische Struktur des CoA-Addukts von Methyl 4-Oxo-4-(4-Chlorophenyl)-2-butenolat sowie mögliche Wirkungsweise an MenB [Verändert, nach (Li et al. 2011c)]

Wie von *Taber et al.* gezeigt werden konnte, lassen sich KO-Mutanten von *menB* und *menE* im bakteriellen System (*Bacillus subtilis*) durch Supplementierung eines Intermediats der Phylloquinosynthese retten. Hierbei wurde dem Kulturmedium 1,4-Dihydroxy-2-naphthoat (DHNA) zugesetzt, welches im Syntheseweg (Abbildung 6) nach den von MenE und MenB katalysierten Reaktionen entsteht (Taber, Dellers & Lombardo 1981). Die Auswirkungen der Inhibitoren der DHNS-Reaktion konnten in *M. tuberculosis* ebenfalls durch das Zusetzen von 100 μ M DHNA aufgehoben werden (Li et al. 2011c).

Auch im pflanzlichen System (*A. thaliana*) konnte dieser Effekt gezeigt werden. So war es möglich, die KO-Mutanten für die für *phyllo* sowie für *aae14* codierende Gene, mittels 1 mM DHNA nicht nur zum Keimen zu bringen, sondern ebenfalls über Wochen zu kultivieren (Gross et al. 2006; Kim, van Oostende, Basset & Browse 2008).

Dies legt die Hypothese nah, dass induzierte Störungen des Phylloquinon-Synthesewegs vor dem Intermediat DHNA durch Zugabe von diesem kompensiert werden können. Dieser Effekt kann zur Validierung des Wirkstoff-Wirkort-Verhältnisses beitragen, da nur diesen Stoffwechselweg betreffende Effekte, in solcher Weise ausgeglichen werden sollten.

II.2. Identifikation des Wirkorts von Psoromsäure

II.2.1 Spleißen

Für die Expression eines Proteins muss zuerst ein DNS-Abschnitt (Gen) in mRNA (messenger RNS; Kurier RNS) übertragen werden, diesen Vorgang nennt man Transkription.

Der Großteil eukaryotischer Gene besteht jedoch nicht nur aus einer „sinnhaften“ codierenden Sequenz, den Exons (*exprimierte Sequenzen*), sondern wird häufig von nichtcodierenden Nukleotidabfolgen, den Introns (*intervenierende Sequenzen*), unterbrochen ($\approx 90\%$ bei der proteincodierenden Gene in Pflanzen (Eckardt 2013)). Diese Introns stellen jedoch nicht, wie zuvor angenommen, bloße Unterbrechungen in der codierenden Sequenz dar, sondern weisen ihrerseits eigenständige biologische Funktionen auf. Allgemein lassen sie sich in mindestens fünf Klassen unterteilen. So erfüllt ein Großteil regulatorische Funktionen in der mRNA-

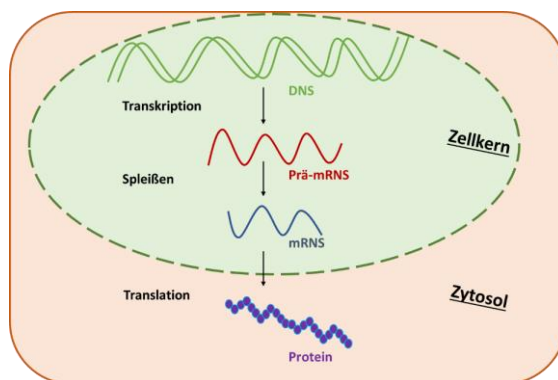


Abbildung 12

*Schematischer Ablauf von DNS zu Protein
Im Zuge der Transkription wird der für ein Gen betreffende Sequenzabschnitt von DNS in prä-mRNA übertragen. Hierbei wird nur der codierende Strang abgeschrieben; von der doppelsträngigen Matrize entsteht ein einzelsträngiges Primärtranskript. Dieses wird daraufhin im Zuge des Spleißens dahingehend prozessiert, dass die resultierende mRNA nur noch Exons enthält, während die Introns entfernt werden. Die mRNA verlässt daraufhin den Zellkern und wird am Ribosom im Zytosol in Protein übersetzt, dieser Prozess wird daher als Translation bezeichnet.*

die codierenden Sequenzen (Exons) nukleotidgenau miteinander zur „reifen“ mRNA verbunden. Diese besteht aus einem durchgehend codierenden Bereich, der von einem Start- und einem Stopp-Codon begrenzt wird. Die mRNA verlässt daraufhin den Zellkern, und es erfolgt die Translation im Zytosol, in der sie zu Aminosäuren und somit zu Protein übersetzt wird.

Prozessierung, andere wiederum codieren für Ribozyme, RNS-Moleküle die ihrerseits eine katalytische Rolle einnehmen (Chorev & Carmel 2012).

Somit resultiert aus der Transkription zunächst eine Primärform der mRNA (prä-mRNA; auch Primärtranskript), die in einem weiteren Schritt von diesen Introns bereinigt werden muss. Diesen „Zensur-Prozess“ bezeichnet man als **Spleißen**, er findet im Zellkern statt (Abbildung 12).

Durch das Spleißens werden die Introns aus dem Primärtranskript herausgetrennt und

Die Zielpunkte für das Spleißwerkzeug auf der prä-mRNS werden durch bestimmte konservierte kurze Nukleotidsequenzen des Introns markiert. Diese finden sich am 5'- und am 3'-Ende des Introns, man spricht hierbei somit von der 5' Spleiß-Stelle (**5'SS**) und der 3' Spleiß-Stelle (**3'SS**). Zusätzlich haben alle Introns eine Verzweigungsstelle (**BPS**; *branch point site*), die ein weiteres obligates Spleiß-Signal darstellt. Somit umfasst jedes Intron drei Spleiß-Signale, die in jeder Spleiß-Reaktion mitwirken (Abbildung 13).

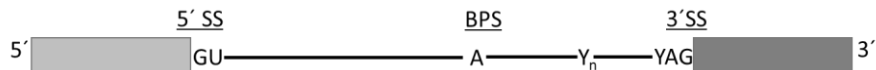


Abbildung 13

Schematische Darstellung einer RNS-Sequenz mit dem Motiv Exon-Intron-Exon mit konservierten Sequenzen

Zur Prozessierung der prä-mRNS bedürfen die Spleißwerkzeuge sogenannter Spleiß-Signale, die für ein Erkennen der Exon-Intron-Exon Grenzen unabdingbar sind.

Diese Signale finden sich am 5'- und 3'-Ende des Introns (5'SS, 3'SS) sowie in Form der Verzweigungsstelle (BPS) innerhalb des Introns.

5'SS: 5' Spleißstelle, BPS: Verzweigungsstelle; A: Adenosin der BPS; Y_n: Polypyrimidin-Sequenz; 3': 3' Spleißstelle;

Auf molekularer Ebene erfolgt der Splicing-Vorgang schrittweise in einem geordneten, komplexen Ablauf, bei dem sich an jedem zu spleißendem Intron das **Spleißosom** bildet, das das „Schneide- und Schweißwerkzeug“ darstellt.

II.2.2 Das Spleißosom

Als **Spleißosom** wird ein Verbund von kleinen, zellkerneigenen Ribonukleoproteinen (*snRNP, small nuclear ribonucleoprotein*) bezeichnet. Dieser Ribonukleoproteinkomplex, setzt sich aus obligat fünf snRNPs sowie fakultativ mehr als 200 weiteren Proteinen zusammen.

Im Detail besteht ein snRNP aus einer kleinen uracilreichen RNS (U snRNS) sowie einer Reihe an fest damit assoziierten Proteinen. (Lin, Taggart & Fairbrother 2016; Hoskins & Moore 2012; Matlin & Moore 2007). Das Spleißen geschieht durch das Zusammen- und Umlagern der Untereinheiten des Spleißosoms (snRNPs) und der assoziierten Proteine (Papasaikas & Valcárcel 2016; Braunschweig et al. 2013; Keren, Lev-Maor & Ast 2010). Hierbei entstehen verschiedene biochemisch unterscheidbare Komplexe, die auf Wechselwirkungen zwischen prä-mRNS-snRNS, snRNS-snRNS, RNS-Protein sowie Protein-Protein basieren.

Darüber hinaus werden zweierlei Typen von Spleißosom unterschieden:

1. Das große oder hauptsächliche **U2**-Spleißosom („major“ Spliceosom)
2. Das kleinere **U12**-Spleißosom („minor“ Spliceosom)

Das **U2**-Typ Spleißosom setzt sich aus dem U1-snRNP, dem U4/U6:U5-tri-snRNP sowie dem namensgebenden U2-snRNP zusammen.

Das **U12**-Spleißosom umfasst, mit Ausnahme des U5-snRNPs, funktionelle Analoga (Will & Lührmann 2005; Turunen, Niemelä, Verma & Frilander 2013).

Diesen beiden Typen des Spleißosoms sind die weitgehend unveränderlichen Werkzeuge der Prozessierung des Primärtranskripts entlang des gesamten Genoms. Ausnahmen hiervon sind das Selbst-Spleißen bestimmter Intron-Typen (Gruppe I-; Gruppe II-, Gruppe III-Introns) sowie das tRNS-Spleißen, diese beiden Wege stellen jedoch, global gesehen, eher Raritäten dar.

Die Wahl zwischen den beiden Spleißosom-Typen wird durch die zuvor erwähnten Signal-Sequenzen des Introns bestimmt. So weisen die Introns, die vom U2-Typ entfernt werden GT-AG Termini auf, während die des U12-Typs entweder AT-AC oder GT-AG sein können (Will & Lührmann 2005; Szcześniak et al. 2013; Turunen, Niemelä, Verma & Frilander 2013).

II.2.3 Die Chemie des Spleißens

Chemisch gesehen handelt es sich bei dem „Herausschneiden“ der Intronsequenz um zwei aufeinanderfolgende Transester-Reaktionen, die vom Spleißosom katalysiert werden.

Der erste Schritt besteht aus einem nukleophilen Angriff durch die 2'-Hydroxy-Gruppe des Adenosins (**A**) der Verzweigungsstelle (**BPS**) auf die 3'-5' Phosphodiesterbindung am 5'-Ende des Introns. Hieraus resultiert einerseits eine 2'-5' Phosphodiesterbindung an der BPS sowie andererseits eine freie 3'-Hydroxygruppe am 5'-Exon. In dem nun folgenden zweiten Schritt

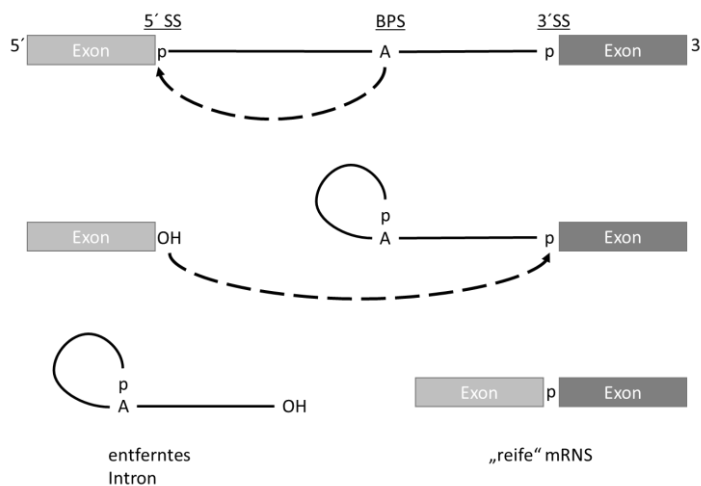


Abbildung 14

Schematischer Ablauf der zwei katalytischen Schritte des Spleißens

Der Prozess des Spleißens umfasst zwei aufeinanderfolgende Transesterreaktionen.

Im ersten Schritt erfolgt ein nukleophiler Angriff der 2'-OH-Gruppe des Adenosins der BPS auf die 3'-5' Phosphodiesterbindung zwischen Exon und Intron am 5'-Ende des Introns. Hierdurch zyklisiert das Intron sich selbst zu einer lassoformigen Struktur, weiterhin resultiert eine freie 3'-OH-Gruppe am 5'-Exon. Diese führt einen zweiten nukleophilen Angriff auf die 3'-5' Phosphodiesterbindung am 3'-Ende des Introns durch, der die Freisetzung des Introns bewirkt und die beiden Exons verbindet.

Kästen: Exon, Linie: Intron, Pfeil (unterbrochen): Nukleophiler Angriff; p: Phosphatgruppe; OH: Hydroxygruppe

5'SS: 5'Spleiß-Stelle; 3'SS: 3'Spleiß-Stelle; BPS: Verzweigungsstelle; A: Adenosin der BPS;

[NACH: (Will & Lübrmann 2005)]

reagiert diese OH-Gruppe nun nukleophil mit der Phosphodiesterbindung zwischen dem 3'-Ende des Introns und dem 3'-Exons (3'-5' Phosphodiesterbindung), somit werden die beiden Exons zum fertigen Spleißprodukt verbunden, während das verzweigte Intron freigesetzt wird (Abbildung 14).

II.2.4 Biologische Rolle des „herkömmlichen“ Spleißens und seiner Alternativen

Neben der „herkömmlichen“ Variante (Entfernen aller Introns) weist der Vorgang des Spleißens bedeutsame Alternativen auf. Dabei werden beispielsweise Introns in der Sequenz belassen, Exons übersprungen oder alternative Spleiß-Stellen an 5'-Ende oder 3'-Ende verwendet (Abbildung 15).

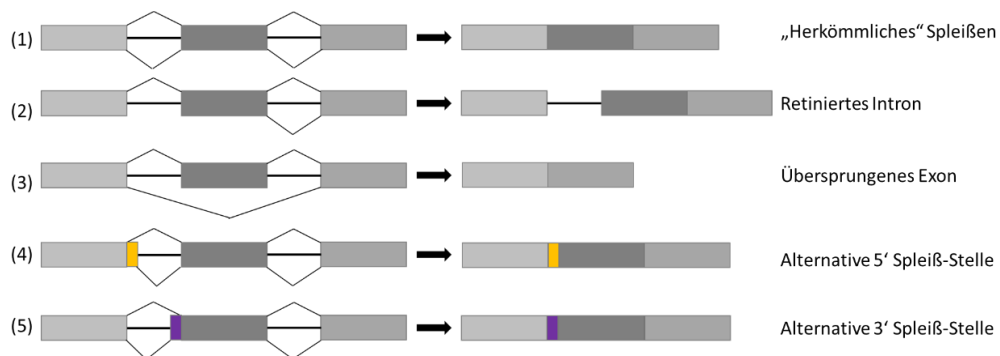


Abbildung 15

Spleißmuster des herkömmlichen und Alternativen Spleißens

(1) herkömmlich (konsekutiv), (2) retiniertes Intron; (3) Übersprungenes Exon; (4) Alternative 5'SS; (5) Alternative 3'SS

Das Genom von *A. thaliana* umfasst 34.212 Gene, von denen lediglich 27.667 für Proteine codieren (Cheng et al. 2017). Demgegenüber konnte bisher die Expression von bis zu 74.194 unterschiedlichen Proteinen nachgewiesen werden. Diese Differenz wird dadurch erklärt, dass 60 % der proteincodierenden Gene, die ein oder mehrere Introns beinhalten, alternativ gespleißt werden (Zhang et al. 2017; Cheng et al. 2017; Eckardt 2013). Das bedeutet, dass aus einer prä-mRNS im Durchschnitt 2,68 unterschiedliche Transkripte entstehen (Zhang et al. 2017).

Zusammenfassend eröffnet der Prozess des Spleißens mit seinen Alternativen eine Möglichkeit, vorhandene genetische Information in unterschiedlicher Weise zu interpretieren und somit die „Palette der möglichen Proteine“, das Proteom, um ein Mehrfaches zu erweitern.

II.2.5 Ablauf des Spleißens

Der folgende Abschnitt illustriert den schematischen Ablauf des Spleißens mit der Zusammen- und Umlagerung der Untereinheiten des **U2-Typ Spleißosoms** (exemplarisch, ähnlich bei U12-Typ). Im ersten Schritt bindet die U1 Untereinheit die 5'SS und formt den **E Komplex** (*early*),

hierdurch wird der Prozess initiiert. In diesem Schritt bindet zudem der Spleißfaktor SF1 an der BPS und rekrutiert die U2AF-Proteine an den Polypyrimidintrakt und die 3'SS.

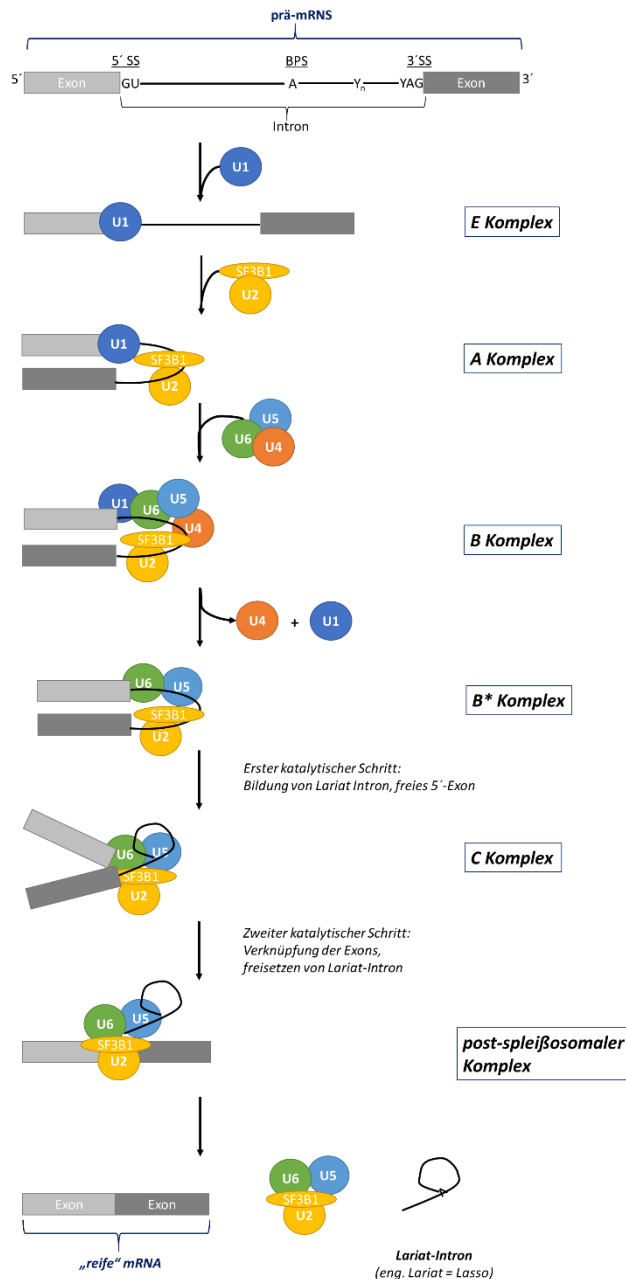


Abbildung 16
 Schematischer, schrittweiser Aufbau des Spleißosoms, sowie Ablauf des Spleißens des U2-Spleißosoms, illustriert an einer Exon-Intron-Exon-Sequenz
 Kasten: Exon, Linie: Intron; Kreis: Untereinheiten des Spleißosoms
 oval: SF3B1 -Untereinheit des U2-snRNPs
 5'SS: 5' Spleiß-Stelle, 3'SS: 3' Spleiß-Stelle, BPS: Verzweigungsstelle
 A: Adenosin der Verzweigungsstelle; Y_n: Polypyrimidintrakt

zum Formen des aktivierten **B* Komplexes** führt.

In der Theorie fungiert U4 in diesem Zusammenhang als Abschirmung für U6, da prinzipiell jede -OH- und Phosphatgruppe zweier Nukleotide einer Phosphoryltransfer-Reaktion unterzogen werden könnte. Erst nach Auflösung der U4:U6 Struktur kann U6 an U2 binden

Durch eine ATP-abhängige Verdrängung von SF1 durch das U2 snRNP geht das Spleißosom in den **A Komplex** über. Dieser wird durch kleinere Untereinheiten stabilisiert, hauptsächlich die Faktoren SF3a und SF3b. Diese binden sowohl die 5'- und 3'-Sequenz, als auch die das Adenosin der BPS umgebenden Nukleotide. Somit wird die U2 Untereinheit an der BPS verankert.

Dieser Komplex rekrutiert nun den U4/U6:U5 tri-snRNP Komplex, mit dem der **B Komplex** geformt wird. Der **B Komplex** enthält alle für das Spleißen benötigten Komponenten, ist jedoch noch inaktiv. Durch Änderungen in der Anordnung seiner einzelnen Bestandteile werden die Untereinheiten U1 und U4 aus dem Komplex verdrängt, was

und so das katalytische Zentrum formen (Papasaikas & Valcárcel 2016). Hierbei bindet die U6 Untereinheit Teile von U2 sowie Basen der 5' SS. Das so entstehende Gerüst stabilisiert nun einerseits die Bindung des Spleißosoms an der prä-mRNS, während es andererseits die reaktiven Gruppen zusammenführt. Die resultierende Anordnung ermöglicht es, dass vier Phosphatgruppen zwei Mg^{2+} -Ionen stabilisieren, die die Phosphoryltransfer-Reaktion vermitteln (Steitz & Steitz 1993; Hang, Wan, Yan & Shi 2015; Fica et al. 2013). Es entsteht der sogenannte katalytische Kern.

Im folgenden Schritt läuft der erste katalytische Schritt des Spleißens ab, mit Ausbildung des **C Komplexes**. Chemisch gesehen greift hierbei die 2'-OH Gruppe des Adenosins der Verzweigungsstelle (BPS) das Phosphoratom der Phosphodiesterbindung der 5' SS an. Durch diese Bindung zirkularisiert das Intron, man spricht hierbei vom Lariat Intron (eng. Lariat = Lasso), und das 5'Exon wird freigesetzt. Durch Bindung dieses ersten Exons an die U5 snRNS verbleibt das Exon in seiner Position am Spleißosom.

Die nun freie 3'OH-Gruppe des 5'-Exons greift im Zuge des zweiten katalytischen Schritts die Phosphatgruppe am der 3'SS an, dies führt zur Verknüpfung beider Exons und der Freisetzung des Lariat-Introns. Daraufhin löst sich das Spleißosom von der „reifen“ mRNS.

II.2.6 Alternatives Spleißen

Neben den aus dem “herkömmlichen” Spleißen resultierenden Transkripten kann das Proteom durch das sogenannte Alternative Spleißen (AS) erweitert werden. Hierbei können aus einer einzigen Gensequenz multiple unterschiedliche mRNS entstehen. Diese Möglichkeit resultiert aus einer sequenzbedingten Vieldeutigkeit von Introns, Exons und ihren Grenzen. Somit können Introns situationsbedingt in der codierenden Sequenz verbleiben oder entfernt werden. In vielzelligen Organismen findet dieses Verfahren breite Anwendung. So werden über 90 % der menschlichen Gene alternativ gespleißt (Braunschweig et al. 2013; Keren, Lev-Maor & Ast 2010), bei *A. thaliana* geht man aktuell von über 60 % der Multiintron-Genen aus (Marquez et al. 2012; Zhang et al. 2017). Hierbei kommt den alternativ gespleißte Isoformen oftmals die Funktion einer Schalterstellung zu. So werden beispielsweise die Glykolyse sowie Apoptose und Zellteilung, über alternativ gespleißte Transkripte reguliert (Biamonti, Maita & Montecucco 2018; Li & Manley 2010).

Insbesondere im Bereich der Stressantwort-Reaktion der Pflanze spielt das Alternative Spleißen eine wichtige Rolle. Die Regulierung erfolgt durch Beeinflussung des Abszissinsäure Wegs (ABA; *abscisic acid*) (Laloum, Martín & Duque 2018), der die Reaktion der Pflanze auf abiotische Stressoren vermittelt. Stimulation der Pflanze mit ABA, erhöhte Salzkonzentration oder Hitze führen zu einer vermehrten Nutzung von abweichenden Spleißstellen, die somit das Transkriptom den veränderten Gegebenheiten anpassen (Zhu et al. 2017).

Ebenso lässt sich diese Tendenz zur Produktion unterschiedlicher Transkripte aus einer prä-mRNS in anderen Stoffwechselwegen der Stressantwort-Reaktion feststellen. Zusammenfassend orchestriert das Verhältnis der einzelnen Spleiß-Varianten zueinander die Gesamtantwort des Organismus auf den Stimulus (Filichkin et al. 2015; ZHANG, DENG, XIAO & LIU 2013; Du et al. 2015; Ner-Gaon et al. 2004).

Beispielhaft sei dies an der Produktion des Hitzestress-Transkriptionsfaktor A2 (*HsfA2*) gezeigt. Hitzestress-Transkriptionsfaktoren (Hsfs) nehmen die zentrale Rolle bei der Vermittlung der Aktivierung von Hitzeschock-Genen ein (Koskull-Döring, Scharf & Nover 2007). Während die Volllängen-Variante des Transkriptionsfaktors A2 (*HsfA2*) nicht in der Lage ist, an den eigenen Promotor zu binden, ist es einer alternativ gespleißten, verkürzten Variante (*S-HsfA2*) nachweislich möglich, diese Bindung einzugehen und somit einen positiven Feedback-Loop auszulösen (Liu et al. 2013).

Zusätzlich ist *S-HsfA2* in der Lage, Hitzestress-Elemente (HSE) zu binden und somit die Stressantwortreaktion weitergehend zu vermitteln (HSE; *heat stress element*; Palindromische Sequenzen in Promotorregion von hitzestressaktivierten Genen).

Neben den zuvor beschriebenen essenziellen Sequenzen (5'SS, 3'SS, BPS) für die Rekrutierung des Spleißosoms können weitere *cis*-wirkende Elemente innerhalb der Exons und Introns die Spleißstellennutzung und -Effizienz beeinflussen. Hierbei kann zwischen fördernden Sequenzen (sogenannten Enhancern) und inhibierenden Sequenzen (sogenannten Silencern) unterschieden werden.

Diese Sequenzen werden von den *trans*-wirkenden Faktoren gebunden, bei denen es sich zumeist um nicht-snRNPs handelt. Beispiele hierfür sind die Gruppe der SR-Proteine, die durch ihre Bindung an *Enhancer*- oder *Silencer*-Sequenzen den Gesamtprozess sowie das Auftreten einer Isoform steuern (Shang, Cao & Ma 2017; Wachter, Rühl & Stauffer 2012). Diese Modulation erfolgt gewebespezifisch, daher wurde das Alternative Spleißen in der Vergangenheit oftmals auch als „gewebespezifisches Spleißen“ bezeichnet (Seyffert & Balling 1998).

Die SR-Proteine (Serin/ Arginin reiche Proteine) bilden eine Familie hochkonservierter, mit dem Spleißen assoziierter Proteine. Sie enthalten N-terminal ein oder zwei RNS-Bindedomänen (RRM; *RNA Recognition Motif*) und die namensgebende C-terminale Arginin- und Serin-reiche Domäne (RS-Domäne), die reversibel phosphoryliert werden kann. Mittels der RRM binden die SR-Proteine die *cis*-wirkenden Elemente der prä-mRNS, während die RS-Domäne in Protein-Protein-Interaktion involviert ist und somit zur Rekrutierung der Untereinheiten des Spleißosoms beiträgt. Sie spielen somit sowohl im herkömmlichen also auch im alternativen Spleißen eine Rolle. Die entscheidende Rolle der SR-Proteine für den Organismus lässt sich am Beispiel von SR45 aufzeigen. Es handelt sich hierbei um ein Protein, das den SR-Proteinen ähnlich ist und zwei RS-Domänen aufweist. Bei einer Mutation von SR45 in Arabidopsis kommt es zu einer Reihe von Entwicklungsdefekten. Diese beinhalten Änderungen in der Morphologie von Blatt und Blüte, verzögertes Blühen und Wurzelwachstum sowie Störungen im ABA und Zucker-Signalweg, die über das gesamte Genom zu Änderungen im Spleißmuster verschiedenster prä-mRNS führen (Carvalho et al. 2016; Ali et al. 2007; Carvalho, Carvalho & Duque 2010).

Während weitere solcher *trans*-wirkenden Faktoren bei vielzelligen Tiere bereits identifiziert und weitergehend zu Proteinfamilien klassifiziert werden konnten, sind im Bereich der höheren Pflanzen nur einige wenige solcher Spleißfaktoren umfassend beschrieben. Neben den zuvor erwähnten SR-Proteinen sind ebenso die Polypyrimidin-Trakt Bindeproteine (PTB) zu nennen.

II.2.7 Fehl-Spleißen

Ein präzises Spleißen der prä-mRNS ist somit die Voraussetzung für die korrekte Translation von Proteinen, da schon die In- oder Exklusion eines einzigen Nukleotids das finale Transkript komplett verändert.

Daher hängt der Prozess maßgeblich von dem Vorhandensein und der Übereinstimmung der Sequenzen ab, die die Exon-Intron-Grenzen definieren und als Erkennungssequenz für die Spleißmaschinerie dienen. Mutationen in diesen Bereichen können zu unfunktionellen oder gar schädlichen Proteinen führen. Hierbei können sich neue 5' oder 3' Spleiß-Stellen ergeben oder bestehende Spleiß-Stellen deaktiviert werden, mit dem Resultat einer fehlerhaften mRNS-Sequenz.

Neben dem Verbleib eines Introns, dem Überspringen eines Exons oder dem Schaffen verlängerter oder verkürzter Exons kann sich auch beim Spleißen ein sogenannter *Frameshift* (Verschieben des Leserahmens) ergeben, der die gesamte codierende Sequenz verändert. Beispielfhaft sei hier die autosomal rezessive Krankheit Mukoviszidose genannt, bei der eine Reihe von Mutationen zum Entstehen sogenannter Pseudo-Exons führen. Das resultierende Protein, ein Ionen-Kanal, kann daraufhin den Ionenhaushalt der Zelle nicht mehr korrekt regulieren. Als Folge ist der Mukus, das Sekret der Schleimdrüsen, visköser als bei gesunden Personen, was zu einem Verstopfen der Bronchien sowie Folgeerkrankungen führt (Sanz, Hollywood, Scallan & Harrison 2017).

II.2.8 Inhibitoren des Spleißens

In der jüngeren Vergangenheit waren das Spleißen beeinflussende Moleküle Gegenstand intensiver Forschungsarbeit. Zum einen ging es um die Suche nach Molekülen, um den Spleißvorgang in bestimmten Teilschritten stoppen und für nähere Analysen sezieren zu können. Zum anderen suchte man Moleküle, um spezifische Spleiß-Events inhibieren zu können.

Um dem Spleißosom in seiner Komplexität gerecht zu werden (unterschiedlichsten Bestandteilen wie RNSs und Proteinen), bedarf es zur Beeinflussung der Untereinheiten verschiedenster Wirkstoffe.

Besonders die Inhibitoren der SF3B1-Untereinheit des U2 snRNPs konnten einen großen Beitrag zum besseren Verständnis der vielen Funktionen von SF3B1 liefern. Hierbei handelt es sich um in der Natur vorkommende Stoffe, die schon in geringer Konzentration (nM) den „Wettstreit“ der Intron-Substrate um das Spleißosom klar beeinflussen (Kotake et al. 2007). Es konnte gezeigt werden, dass SF3B1 nicht nur das U2 snRNP am Verzweigungsspunkt (BPS) stabilisiert, sondern ebenfalls eine Rolle in der Exon-Ligation spielt (Corrionero, Miñana & Valcárcel 2011; Folco, Coil & Reed 2011).

Dies ist weiterhin neben dem Beitrag zum besseren Verständnis des Faktors im Prozess relevant, da nachgewiesen werden konnte, dass Mutationen in SF3B1 häufig bei Patienten mit Brustkrebs, chronischer lymphatischer Leukämie sowie Pankreaskrebs nachgewiesen werden konnten (Landau et al. 2013; Ellis et al. 2012; Biankin et al. 2012).

Hierbei führt die Mutation zu einer Veränderung in der Wahl des Verzweigungspunkts, was daraufhin zu einer irrtümlichen 3' Spleiß-Stelle führt (DeBoever et al. 2015; Alsafadi et al. 2016). Durch den Einsatz der Inhibitoren konnte das Wachstum der Krebszellen (in Zellkultur) nachweislich gemindert werden. Hierbei verschieben die Inhibitoren durch ihr Wirken auf SF3B1 das Gleichgewicht zu Gunsten alternativ gespleißter Versionen, die beispielsweise in Apoptose und Zell-Zyklus mitwirken (Lagisetti et al. 2013; Kotake et al. 2007; Lagisetti et al. 2014; Moore, Wang, Kennedy & Silver 2010).

Die SF3B1-Inhibitoren stellen dabei eine Besonderheit dar, da ihr Effekt so klar zugeordnet und ebenfalls im Zelltest bestätigt werden konnte.

Der Effekt anderer Spleiß-Inhibitoren indes lässt sich oftmals nicht direkt im zellulären Test abbilden, da viele dieser Stoffe weitere „*off-target*“-Effekte (Effekte außerhalb des Zielbereichs) aufweisen, die ebenfalls zytotoxisch wirken.

II.2.8.1. Herboxidien

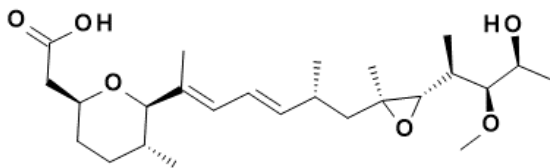


Abbildung 17
Strukturformel von Herboxidien (GEX1A)

Herboxidien (GEX1A) ist ein Sekundärmetabolit von *Streptomyces* sp. A7847 (Isaac, Ayer, Elliott & Stonard 1992), der initial wegen seiner phytotoxischen Effekte beschrieben wurde. Auf wichtige Unkräuter und Ungräser zeigte er in 17.3 g/ha (7 g/ac ;(Isaac, Ayer, Elliott & Stonard 1992)) beziehungsweise 86.4 g/ha (35 g/ac; (Edmunds, Trueb, Oppolzer & Cowley 1997)) starke inhibitorische Effekte, ohne bei Weizen Schäden zu verursachen. Der zugrundeliegende Wirkmechanismus konnte jedoch nicht ergründet werden. Durch eine Studie von Sakai et al., deren Ziel das Auffinden neuer Wirkstoffe für Tumorthherapie war, konnte eine Änderung im Spleißmuster in Gegenwart des Wirkstoffes berichtet werden, was die Vermutung eines Kausalzusammenhangs zwischen Wirkstoff und Spleißvorgang nahelegte (Sakai et al. 2002). Erst 2011 konnte durch mehrere Gruppen gezeigt werden, dass Herboxidien die SF3b Untereinheit des U2 snRNPs zum Ziel hat und somit das Spleißmuster beeinflusst (Hasegawa

et al. 2011; Gao, Vogt, Forsyth & Koide 2013). Da es sich bei dieser Untereinheit um einen elementaren Bestandteil des Spleißosoms handelt, der an jeder Spleiß-Reaktion mitwirkt (s.o.), können Auswirkungen sowohl in Produkten des herkömmlichen als auch in der des Alternativen Spleißens gefunden werden.

Am Modellorganismus *A. thaliana* konnten durch Behandlung mit Herboxidien sowie durch einen weiteren Inhibitor der SF3b-Untereinheit (Pladoenolid B) eine Stressantwort-Reaktion für abiotische Stressoren ausgelöst werden. Ebenso führte die Behandlung zu einem Auslösen des ABA-Signalwegs sowie einer Signalkaskade, die als Spleiß-Stress-Signalweg beschrieben wurde (Ling et al. 2017; AlShareef et al. 2017).

Auf Ebene der gesamten Pflanze konnten eine stark reduzierte Keimungsrate sowie eine allgemeine Reduzierung von Wachstum und Entwicklung beobachtet werden. So wurde bei Keimlingen von Arabidopsis, Reis sowie Tomate, die nach einer fünftägiger Wachstumsphase auf herkömmlichem MS-Medium auf Medium mit Herboxiden transferiert wurden, ein Stopp in Wurzel- und Blattwachstum erreicht. Damit konnte gezeigt werden, dass der Effekt nicht auf den Organismus *A. thaliana* beschränkt ist.

II.2.8.2. Psoromsäure

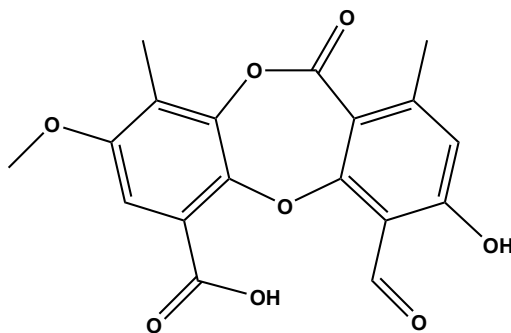


Abbildung 18
Strukturformel von Psoromsäure

Bei der Psoromsäure handelt es sich um einen Sekundärmetaboliten aus Flechten, die zur übergeordneten Gruppe der Depsidone gehört. Sie wurde erstmals 1882 aus der Flechte *Psoroma crassum* Körber isoliert, die hierbei die namensgebende Rolle einnimmt (Asahina & Hayashi 1933). Innerhalb der medizinischen Forschung findet die Psoromsäure viele Anwendungsgebiete, wie in Tabelle 2 aufgezählt.

Tabelle 2

Potenzielle medizinische Anwendungsgebiete des Flechtensekündärmetaboliten Psoromsäure

Funktion	Literatur
Inhibition des Fettsäurebiosynthese (FAS-II) Stoffwechselwegs in <i>Plasmodien</i> (Malaria)	(Lauinger et al. 2013)
Prävention von Atherosklerose durch Bindung freier Radikale sowie Inhibition der Lipidperoxidation	(Behera, Mahadik & Morey 2012)
Inhibition der RabGGTase in der Therapie von Krebs und Osteoporose	(Deraeve et al. 2012)
Inhibition der HIV-1 Integrase in der AIDS-Therapie	(Neamati et al. 1997)

Darüber hinaus konnte durch einen von *Samatov et al.* entwickelten Hochdurchsatz-Screen gezeigt werden, dass Psoromsäure den Prozess des Spleißens *in-vitro* ab einer Konzentration von 250 μM komplett zum Erliegen bringt (Samatov et al. 2012). Hierbei kam es zu einer Akkumulation der prä-mRNS sowie des Lariat-Intermediats. Durch Auftragen dieser *in-vitro* Reaktion nach definierten Zeitpunkten auf ein natives Agarosegel konnte der Prozess des Zusammen- und Umlagerns der Untereinheiten des Spleißosoms dargestellt werden. Hierdurch war es möglich, visuell die Komplexe zu identifizieren, deren „Weiterentwicklung“ durch Psoromsäure verzögert beziehungsweise verhindert wurde. In der Präsenz von Psoromsäure akkumulieren primär aktivierte B-Komplexe (B^*), deren Aktivität jedoch nach Entfernen von Psoromsäure wiederhergestellt werden konnte. Es handelt sich hierbei folglich um keine „totgelegten“ Komplexe, sondern um ein Anhalten des Prozesses (Samatov et al. 2012).

Das genaue Wirkstoffziel der Psoromsäure im Prozess des Spleißens konnte bisher nicht aufgeklärt werden. Basierend auf den in der Literatur vorliegenden Ergebnissen sollte es sich jedoch um eine reversible Inhibition handeln, da die B^* -Komplexe nach Entfernen der Psoromsäure (B^* wurden per Affinitätsselektion aus Mixtur nach 2 h entfernt) im Prozess des Spleißens fortführen (Samatov et al. 2012; Effenberger, Urabe & Jurica 2017).

III. Zusammenfassende Einordnung der Projektteile vor dem Hintergrund des wirkstoffzielbasierten Ansatzes

III.1.1 Teil I: Phylloquinon-Synthese

Zusammenfassende Bewertung der Phylloquinon-Synthese für den Target Ansatz basierend auf den zuvor beschriebenen Grundvoraussetzungen (Seite 13):

Basierend auf den dargelegten Informationen, kann die Phylloquinon-Synthese, hierbei insbesondere die von DHNS/AtMenB katalysierte Reaktion, als vielversprechendes Ziel und Ansatzpunkt für zukünftige Herbizide erachtet werden. Sie wird den Grundvoraussetzungen gerecht.

- Essenzieller Prozess:
Phylloquinon ist für den Elektronentransport in Photosystem I und somit für die Photosynthese essenziell. Der Knockout verschiedener Gene des Synthesewegs zieht letale Konsequenzen nach sich (Tabelle 1). Dieser letale Effekt lässt sich durch Supplementation mit dem Intermediat DHNA kompensieren; dies gilt ebenfalls für die Auswirkungen der Inhibitoren der DHNS im Bakterium.
- Literaturbekannte *tool-compounds*:
In Bakterien findet sich die Menaquinon-Synthese, die ein Analogon zur Phylloquinon-Synthese darstellt. Erstere ist das Ziel aktueller Bestrebungen in der Entwicklung neuer Antibiotika, die mittels Hochdurchsatzscreenings erste Wirkstoffe, für die von MenB katalysierte Reaktion, identifizieren konnten.
- Ähnlichkeit in Aminosäuresequenz:
Auf Sequenzebene und insbesondere im Bereich der aktiven Tasche weisen die DHNS von *A.thaliana* sowie MenB von *E.coli* und *M.tuberculosis* eine große Übereinstimmung auf. Dieser Umstand erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass die bekannten Inhibitoren im pflanzlichen System ebenfalls wirken.
- Keine Redundanzen:
Der pflanzliche Organismus weist keine funktionellen oder genomischen Redundanzen für die von DHNS katalysierte Reaktion auf; das betreffende Gen liegt ohne Isoformen vor.

- Abwesenheit in tierischen Organismen:

Wie der Trivialname Vitamin K suggeriert, handelt es sich bei Phylloquinon und Menaquinon um organische Verbindungen, die der menschliche Organismus nicht eigenständig synthetisieren kann; der betreffende Stoffwechselweg fehlt im tierischen System. Dieser Umstand minimiert die potenziellen Risiken für toxikologische Probleme potenzieller Inhibitoren.

III.1.2 Teil II: Spleißen

Basierend auf den zuvor beschriebenen Kriterien kann der Prozess des Spleißens übergreifend als aussichtsreicher Kandidat für die Entwicklung zukünftiger Herbizide erachtet werden.

Die Produktion des Großteils der pflanzlichen Proteine ($\approx 90\%$ der proteincodierenden Gene in Pflanzen enthalten Introns) bedarf initial des Entfernens von Introns aus dem Produkt der Transkription (prä-mRNS); es handelt sich somit um einen essenziellen Prozess.

Bedingt durch die Erkenntnisse aus Grundlagen- sowie Krebsforschung kann auf einen Fundus an bekannten Wirksubstanzen zurückgegriffen werden, deren Wirksamkeit teilweise auch im pflanzlichen Organismus bewiesen wurde; literaturbekannte *tool-compounds* liegen somit vor.

Durch die beinahe vollständige Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen eines Großteils der Untereinheiten des Spleißosoms zwischen Pflanze und Mensch ist die Wahrscheinlichkeit für die Wirksamkeit der bekannten Wirksubstanzen sehr hoch; eine große Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen ist somit gegeben. Dieser Umstand maximiert jedoch die potenziellen Risiken für toxikologische Probleme von herbiziden Wirkstoffen, deren Ziel-Prozess das Spleißen ist.

Für die Nutzung des Spleißens als angehenden Ziel-Prozess neuer Herbizide müssen Untereinheiten, Faktoren und Prozesswege identifiziert werden, die spezifisch für den pflanzlichen Organismus sind. Basierend auf diesen Erkenntnissen kann das Spleißen als neuartiger Ziel-Prozess adressiert werden.

IV. Zielsetzung

Wie zuvor beschrieben, untergliedert sich das Forschungsvorhaben in zwei Teilbereiche, die unterschiedliche Prozesse (Phylloquinon-Synthese und Spleißen) zum Thema haben. Hieraus ergeben sich unterschiedliche Zielsetzungen.

Innerhalb des Themenschwerpunkts „Phylloquinon-Synthese“ liegt der Fokus darauf zu überprüfen, ob der für MtMenB/EcMenB/SaMenB beschriebene Inhibitor Methyl 4-Oxo-4-(4-Chlorophenyl)-2-butenolat (MOCB) ebenfalls die DHNS/AtMenB in *A. thaliana* inhibiert sowie zu validieren, ob die DHNS ein Ziel für zukünftige Herbizide sein kann.

Hierfür gilt es, die ***in-vivo* Aktivität** des potenziellen Wirkstoffs zu zeigen und darüber hinaus zu überprüfen, ob sich der resultierende Phänotyp mittels Supplementation eines Folgeprodukts der DHNS-Reaktion komplementieren lässt.

Im Zuge der **chemischen Validierung** wird die Beeinflussung der DHNS-Reaktion durch den aktivierten Inhibitor MOCB-CoA, innerhalb eines biochemischen Tests, *in-vitro* überprüft. Darüber hinaus kann die mathematische Beschreibung der resultierenden Enzymkinetik Hinweise zum Modus sowie der „Stärke“ der Inhibition geben.

Die **genetische Validierung** besteht aus dem Erstellen von transgenen Linien, mittels derer die Wirkstoff-Wirkort-Beziehung weitergehend gefestigt werden soll. Einerseits mittels einer Überexpressionslinie, die theoretisch eine erhöhte Toleranz aufweisen sollte, andererseits mittels Knockdown-Linien (KD), die anfälliger für den Wirkstoff sein könnten.

Für eine weitere Darstellung der Wirkstoff-Wirkort-Beziehung kann mittels einer ***in-silico*-Studie** ein Homologie-Modell der DHNS erstellt werden, um daraufhin den potenziellen Wirkstoff MOCB computergestützt in die aktive Tasche einzufügen. Das Ergebnis dieser Studie wird zwar prinzipiell keinen Beweischarakter haben, könnte jedoch bei der Interpretation der Ergebnisse anderer Abschnitte helfen.

Das Ziel des zweiten Teilbereichs ist es, zu überprüfen, ob der Wirkstoff Psoromsäure eine herbizide Wirkung aufweist und ob diese auf die Inhibition des Spleißens zurückzuführen ist.

Als erster Schritt gilt somit das Aufzeigen einer ***in-vivo* Aktivität** des Wirkstoffs. Hierfür werden Arabidopsis-Pflanzen in Gegenwart von aufsteigenden Wirkstoffkonzentrationen kultiviert und deren phänotypische Entwicklung beurteilt.

Die Auswirkung der Psoromsäure auf den Spleiß-Vorgang wird mittels **Transkriptom-Analyse** überprüft. Der Fokus liegt hierbei im Auffinden und Zuordnen fehlgespleißter Transkripte zu ihren jeweiligen Genorten, sowie ihrer biologischen Rolle.

Abschließend werden die Ergebnisse der computergestützten Transkriptom-Analyse mittels RT-PCR **biochemisch validiert**. Die resultierenden Fragmente potenziell fehlgespleißter Transkripte lassen sich mittels Agarosegel gemäß ihrer Größe auftrennen.

V. Ergebnisse

VI. Teil I: Validierung von DHNS (At1g60550) als Wirkstoffziel

VI.1.1 Nachweis der pflanzlichen *in vivo* Aktivität des Inhibitors der bakteriellen DHNS-Analoga: Methyl 4-Oxo-4-(4-Chlorophenyl)-2-butenolat

Zur Überprüfung der *in-vivo* Aktivität von Methyl 4-Oxo-4-(4-Chlorophenyl)-2-butenolat (**MOCB**), dem aus der Antibiotikaforschung stammenden Inhibitor von MenB (bakteriell), wurden Arabidopsispflanzen damit behandelt, um seine Effekte auf den Phänotyp zu evaluieren.

In der ersten Teststufe fertigte man hierfür ½ MS-Platten an, die aufsteigende Konzentrationen von MOCB enthielten. Diese Platten bestückte man daraufhin mit Samen und beurteilte Keimung und Wachstum (Wurzel und Spross) nach 14 Tagen.

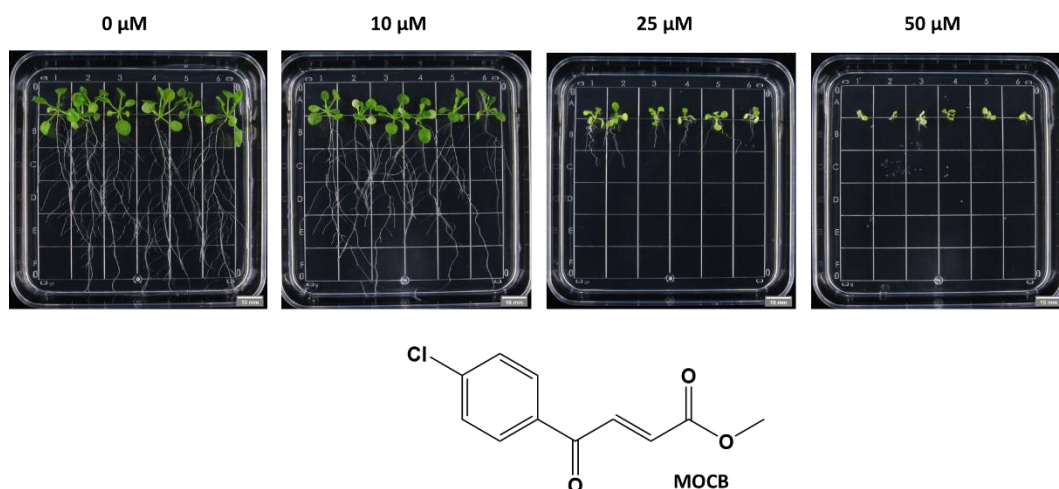


Abbildung 19

Arabidopsispflanzen in Präsenz des Inhibitors MOCB in verschiedenen Konzentrationen Pflanzen wurden 14 Tage auf ½ MS-Medium in Schrägplatten kultiviert. Der Inhibitor wurde in DMSO gelöst; die DMSO-Konzentration wurde konstant (0,1%) gehalten

In Gegenwart des Inhibitors kommt es zu einer dosisabhängigen Verzögerung von Wachstum und Entwicklung der Pflanzen. Ebenso ist eine Änderung des Farbtons von Grün zu einer helleren gelblichen Färbung im Phänotyp festzustellen.

Die Pflanzen auf der Kontrollplatte weisen sechs entfaltete Blätter auf, ein weiteres Blattpaar befindet sich in der Entwicklung. Die Wurzeln dieser Pflanzen erstrecken sich bis zum unteren Ende der Platte; sie durchqueren hierbei fünf Felder, dies entspricht 6,5 cm. Weiterhin weisen die Wurzeln eine Vielzahl an Seitenwurzeln auf.

Mit ansteigender InhibitorKonzentration kommt es zu Änderungen im Phänotyp der Pflanzen. So treten ab einer Konzentration von 10 μM weniger Seitenwurzeln auf, und die Sprösslinge wirken insgesamt kleiner. Dies kann als Anzeichen für ein gemindertes Wachstum gewertet werden. Weiterhin nehmen die älteren Blätter eine hellere bis gelb-weißliche Färbung an.

Bei einer MOCB-Konzentration von 25 μM sind Entwicklung und Wachstum deutlich verzögert. Es sind lediglich vier entfaltete Blätter sichtbar, die Wurzeln sind ebenfalls stark verkürzt, sie erreichen nur noch eine Länge von maximal 2 cm und weisen keinerlei Seitenwurzeln auf. Ebenso manifestiert sich eine „helle“ leicht gelbliche Färbung der Pflanze, welche, wie schon bei 10 μM , insbesondere die älteren Blätter betrifft.

Diese Auswirkung auf den Phänotyp wird durch die Verdopplung der Konzentration des Inhibitors (50 μM) weiter intensiviert, Wachstum und Entwicklung kommen beinahe vollständig zum Erliegen. So löst sich die Wurzel kaum von der Saatposition (maximal 0.5 cm), und die zwei vollständig entfaltenen Blätter weisen eine klare Gelbfärbung auf.

MOCB zeigt somit inhibitorische Effekte, die die Gesamtentwicklung der Pflanze dosisabhängig beeinträchtigen und zu einer helleren bis gelblichen Färbung der Blätter führt. Diese Änderung im Farbton manifestiert sich bei den älteren Blättern, die jungen Blätter haben einen deutlich grüneren Farbton. Diese Beobachtungen sind mit der Grundhypothese, der Inhibition der Phylloquinon-Synthese durch MOCB, vereinbar. Jedoch bedarf es einer weiteren Eingrenzung des Wirkmechanismus.

Vor dem Hintergrund der in der Literatur beschriebenen Ergebnisse der KO-Linien, anderer Enzyme des Stoffwechselwegs, erfolgte ein weiterer Kultivierungsversuch.

Diese in der Literatur beschriebenen KO-Mutanten konnten mittels Zugabe des Zwischenprodukts DHNA (1,4-Dihydroxy-2-Naphthoat) „gerettet“ werden. Ebenfalls war es möglich, bei Bakterien die Effekte des Inhibitors durch Zugabe dieses Intermediats aufzuheben.

Somit ergibt sich für den Folgeversuch die Arbeitshypothese, dass die Effekte von MOCB auch bei *A. thaliana* durch Zugabe von DHNA aufgehoben werden können.

Zur Überprüfung wurden 6-Loch-Platten mit $\frac{1}{2}$ MS-Medium sowie ansteigenden Konzentrationen von MOCB angefertigt. Hierbei wurden zwei Versuchsgruppen gebildet, einer Hälfte wurden zusätzlich 100 μM DHNA zugesetzt (Reihe [+]), der anderen nicht (Reihe [-]). Die Kultivierung erfolgte wiederum für 14 Tage.

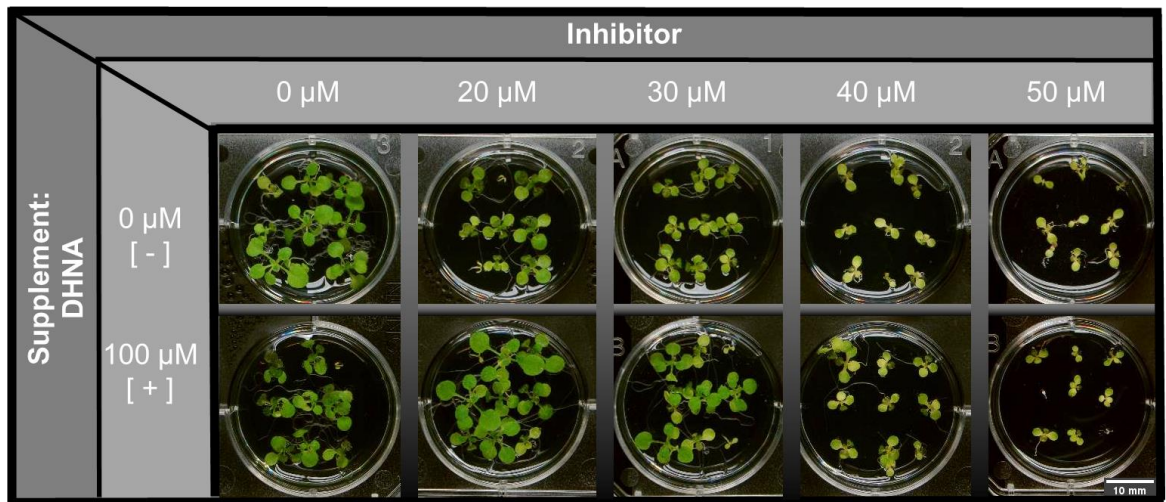


Abbildung 20

*Komplementation der Effekte von Methyl 4-Oxo-4-(4-Chlorophenyl)-2-butenat verschiedener Konzentrationen auf *Arabidopsis thaliana* im Anflug*

Pflanzen wurden 14 Tage auf $\frac{1}{2}$ MS Medium kultiviert, Wirkstoff wurde in 0.1 % DMSO zugegeben sowie DHNA in 0.05% Ethanol; Spalten: [-] kein DHNA zugesetzt, [+] 100 μ M DHNA zugesetzt; Spalten: Konzentration des Inhibitors MOCB.

Wie aus Abbildung 20 ersichtlich, zeigt sich der dosisabhängige Effekt des Inhibitors MOCB (wie schon zuvor für Quadratplatten berichtet) auch dann, wenn die Pflanzen im 6-Loch-Platten-Format kultiviert werden (obere Reihe; [-]; kein Zusatz des Supplements). Mit steigender Konzentration des Inhibitors sind eine Gelbfärbung sowie eine Verzögerung des Wachstums zu beobachten.

In der unbehandelten Kontrollgruppe ([-], 0 μ M MOCB; obere Reihe, 1. links) weisen die Pflanzen sechs vollständig entfaltete Blätter auf, wobei die Anlagen für das nächste Blattpaar ebenfalls schon präsent sind. Die Wurzeln dieser Pflanzen durchziehen das gesamte Medium, und die Sprösslinge weisen eine starke Grünfärbung auf.

In der Versuchsgruppe ohne Inhibitor-Zusatz ([+], 0 μ M MOCB; untere Reihe, 1. links) wirken die Pflanzen insgesamt kleiner und weniger weit entwickelt. Die Grünfärbung erscheint gleichermaßen intensiv (im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe [-], 0 μ M MOCB), auch in der Anzahl der entfalteten Blätter lässt sich kein Unterschied feststellen, ebenso weisen die Pflanzen lange Wurzeln auf, die das Medium durchziehen. Das Supplement scheint somit selbst phytotoxische Eigenschaften aufzuweisen, die Entwicklung und Wachstum der Pflanzen beeinflussen, aber zu keiner Änderung im Farbton führen.

Beide Gruppen werden vom Inhibitor mit steigender Konzentration beeinflusst, dies spiegelt sich im Phänotyp der Pflanzen in Bezug auf Größe, Entwicklung und Färbung wider.

Durch Zusetzen des Zwischenprodukts DHNA können diese Effekte bei 20 μM , 30 μM sowie 40 μM MOCB abgemildert bis aufgehoben werden (Vergleich [+] [-]).

Die Pflanzen weisen in den Proben 20 μM und 30 μM MOCB ([+], 20 μM & 30 μM MOCB) eine intensivere Grünfärbung als ihre nicht supplementierten Konterparts auf ([-], 20 μM & 30 μM MOCB). Durch den Zusatz sind Entwicklung und Wachstum bei 20 μM MOCB unbeeinflusst, die Pflanzen dieser Probe erscheinen sogar größer und weiter entwickelt als die Pflanzen der Versuchsgruppe ohne Inhibitor-Zusatz ([+], 0 μM MOCB). Bei 30 μM erscheinen die Sprösslinge etwas kleiner und ähneln in ihrer Größe der Versuchsgruppe ohne Inhibitor-Zusatz ([+], 0 μM MOCB), eine Beeinflussung durch den Inhibitor MOCB ist jedoch beim Vergleich mit der unbehandelten Kontrollgruppe ([-], 0 μM MOCB) ersichtlich. Dieser Trend setzt sich in der 40 μM MOCB-Probe fort. Die Pflanzen sind im Vergleich zur nicht supplementierten Probe ([-], 40 μM MOCB) weiter entwickelt und weisen eine grünere Farbe auf, jedoch sind klare Effekte des Inhibitors ersichtlich ([+], 40 μM MOCB). Bei einer Inhibitorkonzentration von 50 μM sind keine nennbaren Unterschiede zwischen supplementierter und nicht supplementierter Probe zu erkennen.

Die Erkenntnisse dieser Komplementationsstudie zeigen, dass es möglich ist, die Effekte des Inhibitors MOCB durch Zugabe des Intermediats zu mindern beziehungsweise, bei niedrigeren Dosen des Inhibitors, komplett auszuräumen. Weiterhin zeigt sich jedoch, dass DHNA selbst ebenfalls eine negative Änderung im Phänotyp bewirkt, die durch eine geringe Dosis an Inhibitor ausgeräumt wird.

Bei Betrachtung der Strukturformel des Inhibitors MOCB, lassen sich verschiedenste Struktur motive erkennen, die das Ziel für weitere Optimierungen des Inhibitors sein können. Es lässt sich somit eine allgemeine Strukturformel erstellen, die zur Identifikation möglicher Analoga verwendet werden kann (Abbildung 21).

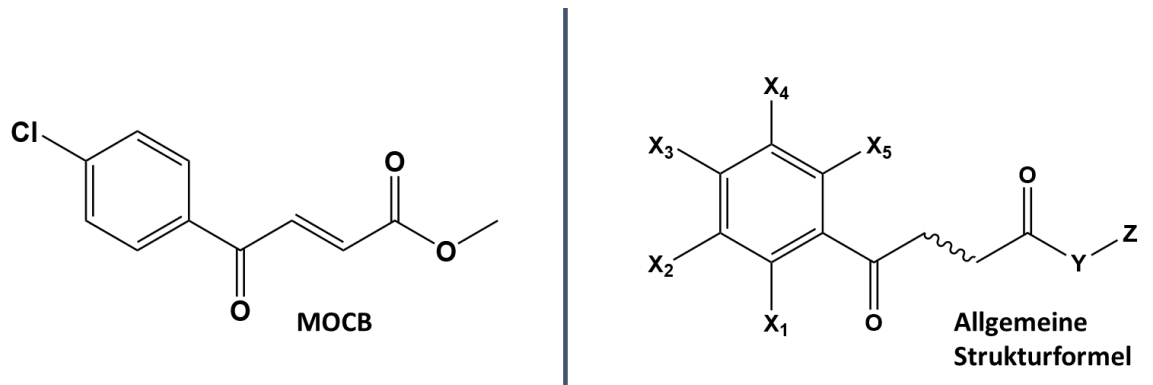


Abbildung 21

Inhibitor MOCB und die davon abgeleitete allgemeine Strukturformel;

X: mögliche Position für Halogen; Y: mögliche Position für O-R (Ester), S-R (Thioester), HN-R (Amid), OH (Carbonsäure), Z: mögliche Position für Alkylgruppe oder Wasserstoff (H); „gewellte“ Bindung: Einfach oder Mehrfachbindung zwischen 2 und 3 Kohlenstoffatom

Auf Grundlage dieser allgemeinen Formel und der Einschränkung nur in jeweils einem Strukturmotiv von MOCB abzuweichen, konnte eine Anzahl an Substanzen identifiziert und für erste phänotypische Untersuchungen verwendet werden.

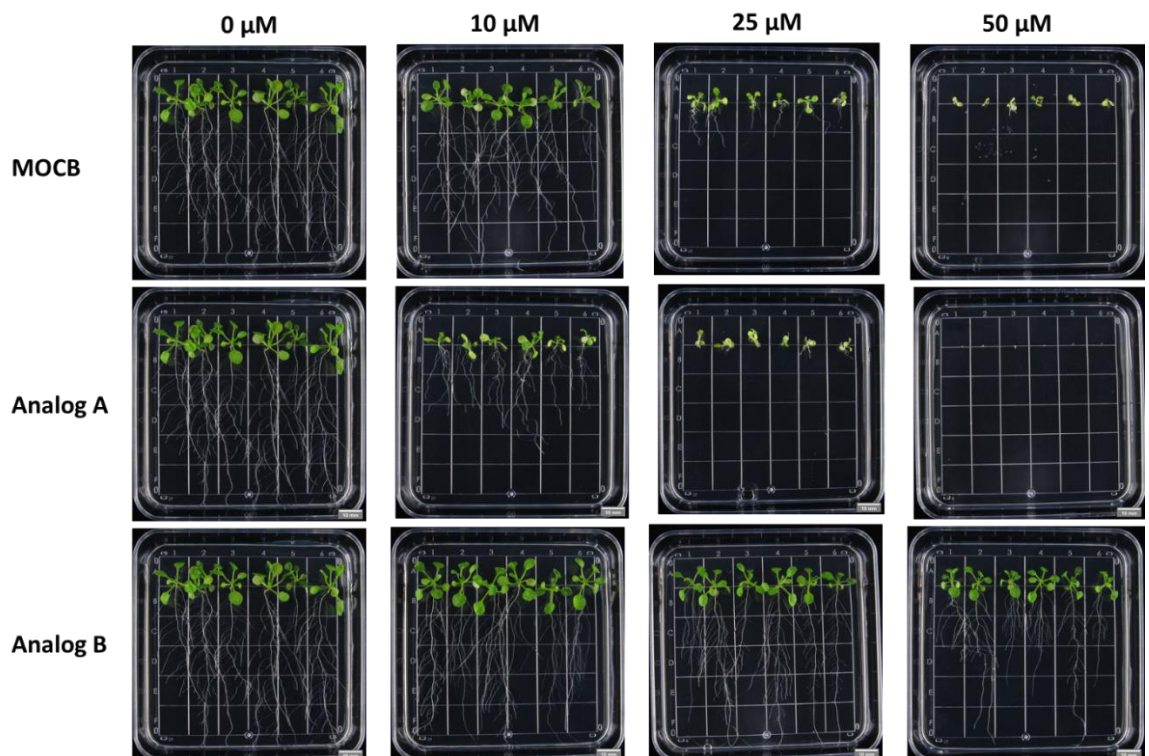


Abbildung 22

Phänotypische Effekte struktureller Analoga von MOCB auf Arabidopsis thaliana

Pflanzen wurden 14 Tage auf $\frac{1}{2}$ MS-Medium in Schrägplatten kultiviert. Der Inhibitor wurde in DMSO gelöst; die DMSO-Konzentration wurde konstant (0,1%) gehalten

Von besonderem Interesse waren hierbei solche Substanzen, welche im Gegensatz zu MOCB, nur ein aktives Zentrum zur Aktivierung mit Coenzym-A aufweisen und somit zum besseren Verständnis der Aktivierung beitragen können.

Die unterschiedlichen Effekte der so gefundenen Analoga sind beispielhaft in Abbildung 22 dargestellt.

In Gegenwart der Verbindung „Analog A“ wird das Wachstum der Pflanzen sowie ihre Färbung deutlich früher beeinträchtigt, als dies bei MOCB der Fall war. Bei 10 μM war eine klare Beeinträchtigung des Wurzelwachstums zu bemerken (maximal 4,9 cm, Durchschnitt 3,5 cm; Kontrolle 6,7 – 7 cm). Ebenso waren die Sprösslinge deutlich kleiner und wiesen eine merkliche Gelbfärbung auf. Durch Erhöhung der Konzentration auf 25 μM wurden diese Effekte weitergehend intensiviert, bei 50 μM blieb das Auflaufen der Samen völlig aus.

Im Gegensatz hierzu kam es durch den Zusatz des Inhibitoranalogons B („Analog B“) nur zu geringen Effekten im Phänotyp der Pflanzen. Erst bei einer Konzentration von 50 μM war eine Änderung zu beobachten. Diese Sprösslinge wirkten im Vergleich zu denen geringerer Wirkstoffkonzentrationen sowie der Kontrolle in der Entwicklung gehemmt. Das Wurzelwachstum war gemindert (Hälfte der Pflanzen \sim 5 cm), und es traten weniger Seitenwurzeln auf. Die Grünfärbung blieb jedoch von diesem Stoff unbeeinträchtigt.

VI.1.2 Chemische Validierung der DHNS als Wirkstoffziel von MOCB – *In-vitro*

Enzym-Assay

Während die *in-vivo*-Analyse die Wirkung des Inhibitors (MOCB) auf den Phänotyp der Pflanze beschreibt, prüft die *in-vitro*-Analyse den angenommenen biochemischen Wirkmechanismus: Hierbei werden Wirkstoff und potenzielles Zielenzym (mit seinem Substrat und Kofaktoren) in einer künstlichen Umgebung zusammengebracht und die resultierenden Effekte auf die Aktivität des Enzyms evaluiert. Sollte der Wirkstoff eine inhibitorische Wirkung aufweisen, so würde sich diese in einer Änderung der Umsatzrate beziehungsweise der mit ihr assoziierten Konstanten widerspiegeln.

Die chemische Validierung trägt neben einer Aussage über die Stärke der Inhibition (IC_{50} -Wert; halbmaximale inhibitorische Konzentration), der Bindungsaffinität des Inhibitors (K_i -Wert; Inhibitionskonstante, Dissoziationskonstante Enzym-Inhibitor-Komplex) zu einem besseren Verständnis der Interaktion von Inhibitor und Wirkort bei. Weiterhin lassen die erhaltenen

Ergebnisse Rückschlüsse auf den Modus der Inhibition zu (kompetitiv, nicht-kompetitiv und unkompetitiv).

Obendrein erlaubt der *in-vitro* Test eine Unterscheidung, ob es sich bei dem vorliegenden Hemmstoff um die eigentliche Wirksubstanz handelt, oder um deren Vorläufer (Prodrug).

DHNS/MenB setzt das Substrat OSB-CoA zu DHNA-CoA um, welches spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 392 nm detektiert werden kann. Somit kann die Produktbildungsrate über die Zeit ermittelt werden.

Wie von Truglio et al. und Li et al. für die DHNS-Analoga aus *Mycobacterium tuberculosis* und *Staphylococcus aureus* beschrieben, ist das Substrat der DHNS, OSB-CoA, instabil und neigt zur Bildung des Laktons unter Abspaltung von Coenzym-A (Truglio et al. 2003; Li et al. 2011b; Li et al. 2011c). Das Substrat muss somit erst durch eine vorgeschaltete enzymatische Reaktion hergestellt werden. Daraus ergibt sich für die *in-vitro* Studie eine gekoppelte Reaktion zweier Enzyme, da für das Studium der DHNS-Reaktion zuvor das Substrat über MenE synthetisiert werden muss.

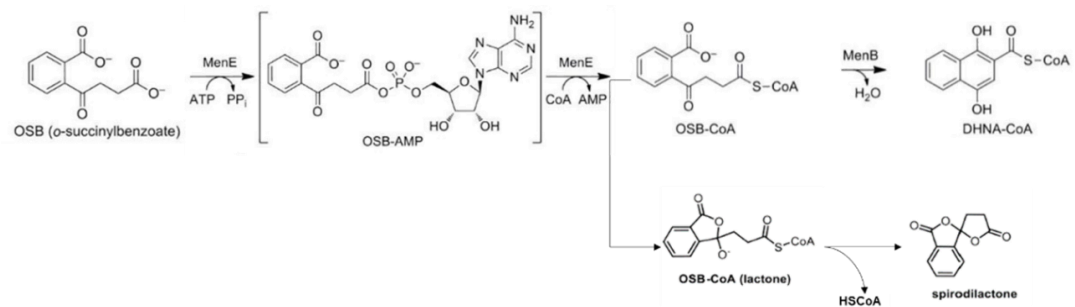


Abbildung 23

Reaktionsverlauf gekoppelte Enzymreaktion von MenE und MenB

OSB wird von MenE über ein OSB-AMP Intermediat mit Coenzym-A (CoA) aktiviert; es entsteht OSB-CoA, das Substrat von MenB.

Dieses Zwischenprodukt neigt zur Weiterreaktion zum Laktone, daher kann OSB-CoA nicht einzeln zugesetzt werden sondern muss innerhalb des Versuchs produziert werden.

MenB katalysiert eine intramolekulare Claisen-Kondensation, bei der ein weiteres aromatisches System entsteht. Das Produkt kann aufgrund dieses aromatischen Systems spektrophotometrisch von den Edukten unterschieden werden.

Für die Aufnahme der Enzymkinetik wurde ein System, bestehend aus EcMenE und DHNS/AtMenB aufgebaut. Bei EcMenE handelt es sich um die aus *E. coli* stammenden OSB-CoA-Ligase (menE; II.1.2). Sie wurde für dieses Testsystem ausgewählt, da ihre Expression und Isolierung sowie ihre Aktivität im *in-vitro*-Test durch Literatur umfassend belegt wurden. Hierbei dienten die Erkenntnisse von *Truglio et al.*, *Li et al.*, *Chen et al.* und *Jiang et al.* bezüglich der gekoppelten Reaktion als Leitlinie (Truglio et al. 2003; Li et al. 2011b; Li et al. 2011c; Chen et al. 2011; Jiang, Chen, Guo & Guo 2010). Darüber hinaus nimmt EcMenE in

diesem Kontext lediglich die Rolle eines „Hilfsenzym“ ein, welches zur bedarfsweisen Produktion des Substrats der Folgereaktion benötigt wird. Der Rückgriff auf ein aus *E. coli* (und nicht aus *A. thaliana*) stammendes Enzym erschien vor diesem Hintergrund zulässig.

Zur Überprüfung der grundsätzlichen Durchführbarkeit des Tests mit den gewählten Puffern und Detektionsverfahren wurde zudem EcMenB als Positivkontrolle inkludiert, da das System EcMenE-EcMenB durch die Literatur belegt ist (Matarlo et al. 2016; Li et al. 2011b).

Im Folgenden soll der Aufbau des Testsystems beschrieben werden.

VI.1.2.1. Versuche zur rekombinanten Produktion der Proteine

Die Proteinproduktion erfolgte rekombinant. Zur Vermeidung etwaiger Probleme durch unterschiedliche Präferenzen in der Nutzung der Codons wurden diese auf den Produktionsorganismus *E. coli* optimiert. Die verwendeten Konstrukte sind in Tabelle 3 aufgelistet. Die eingesetzten Methoden zum Erstellen dieser sind im Bereich Material und Methoden aufgeführt.

Tabelle 3*Verwendete Konstrukte für Überexpression der Proteine des Enzym-Assays*

Konstrukt	Beschreibung (Protein)
pET15b-EcMenE	Aus <i>E. coli</i> stammende Version von MenE in nativer Form (EcMenE)
pET15b-EcMenE-His₆	EcMenE mit C-terminalem Histidin-Hexapeptid (EcMenE-His₆)
pET15b-His₆-EcMenE	EcMenE mit N-terminalem Histidin-Hexapeptid sowie TEV-Schnittstelle (His₆-EcMenE)
pET15b-EcMenB	Aus <i>E. coli</i> stammende Version von MenB in nativer Form (EcMenB)
pET15b-EcMenB-His₆	EcMenB mit C-terminalem Histidin-Hexapeptid (EcMenB-His₆)
pET15b-His₆-EcMenB	EcMenB mit N-terminalem Histidin-Hexapeptid sowie TEV-Schnittstelle (His₆-EcMenB)
pET15b-DHNS	Aus <i>A. thaliana</i> stammende Version von MenB in nativer Form (DHNS)
pET15b-DHNS-His₆	DHNS mit C-terminalem Histidin-Hexapeptid (DHNS-His₆)
pET15b-His₆-DHNS	DHNS mit N-terminalem Histidin-Hexapeptid sowie TEV-Schnittstelle (His₆-DHNS)

Die anfänglichen Vektoren orientierten sich an den in der Literatur beschriebenen Konstrukten der Enzyme aus *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli* sowie *Staphylococcus aureus*, die einen Histidin-Tag (His₆-tag) für Affinitätschromatographie beinhalten (Li et al. 2011b; Li et al. 2011c; Truglio et al. 2003). Publikationen anderer Forschungsgruppen weisen jedoch daraufhin, dass ein solcher Affinitäts-Tag die Proteinfaltung der EcMenB einschränke und das aktive Enzym nur ohne einen solchen Tag aufzureinigen sei (Jiang, Chen, Guo & Guo 2010; Chen et al. 2011; Song & Guo 2012).

Infolgedessen wurden sowohl für EcMenB, EcMenE als auch für DHNS Expressionsstudien unternommen, um zu ergründen, ob ein Affinitäts-Tag (N- oder C-terminal) die Proteinproduktion beeinträchtigt, und welche Strategie zur Reinigung die vielversprechendste ist.

VI.1.2.2. Variante 1: EcMenB-His₆ und DHNS-His₆

(Ergebnis: Ausbleiben der Produktion der Proteine)

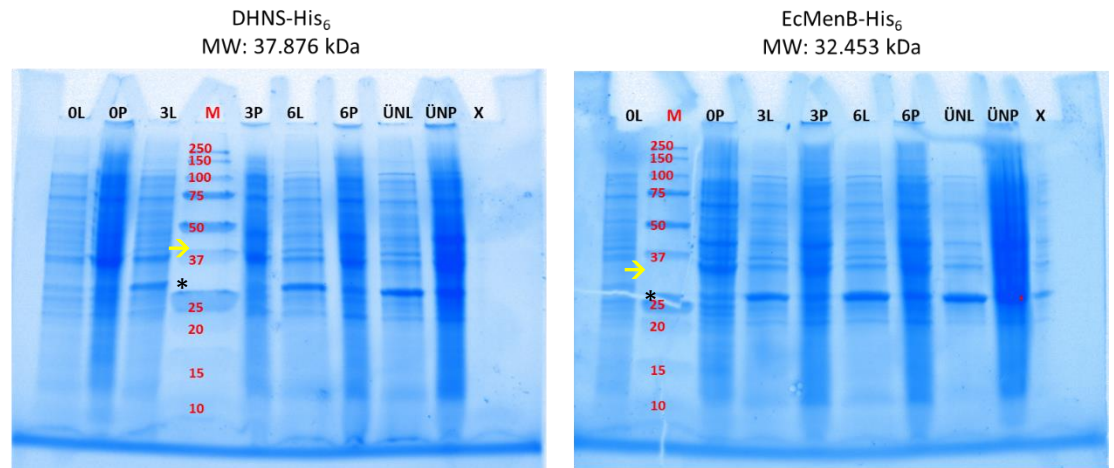


Abbildung 24

SDS-Gele der Expressionsstudie für DHNS und EcMenB mit C-terminalem His₆-Tag in BL21 (DE3) Zellen

L: Lysat, P: Pellet, 0: bei Induktion mit 1mM IPTG, 3: 3 h nach Induktion, 6: 6 h nach Induktion, ÜN: „Übernachtskultur“ 18 h nach Induktion, X: Leerstelle, M: Marker (in kDa 250,150,100,75,50,37,25,20,15,10; Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards)

→: (Pfeil gelb) erwartete Position der Proteinbande; *: (Stern schwarz) Induzierte Bande unklarer Herkunft

Sowohl EcMenB als auch DHNS wurden mit einem C-terminalen His₆-Tag in *E. coli* BL 21 (DE3) Zellen produziert. Abbildung 24 zeigt exemplarisch zwei SDS-Gele einer Testexpression von DHNS-His₆ und EcMenB-His₆. Hierfür wurden transformierte BL 21 (DE3) Zellen bis zu einer optische Dichte (OD_{600 nm}) von 0.6 wachsen lassen, an diesem Zeitpunkt (t = 0 h) wurde die Produktion des Proteins durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert.

Die zu analysierenden Proben wurden an definierten Zeitpunkten (0 h, 3 h, 6 h und 18 h) entnommen und mittels eines Lysis-Puffers (BugBuster Reagenz; Material und Methoden) aufgeschlossen. Weiterhin untergliederte man die Proben in Überstand (**L**; Lysat, lösliche Fraktion) und feste Bestandteile (**P**; Pellet, unlösliche Fraktion).

Bei den vorliegenden Gelen handelte es sich um das Ergebnis einer Testexpression, somit wurden keine weiteren Reinigungsschritte unternommen. Dieser Versuch diente einzig der Überprüfung, ob die Proteine im vorliegenden Konstrukt produziert werden und ob sie in die lösliche Fraktion überführbar sind. Diese Kriterien (Produktion und Löslichkeit) stellen die Grundvoraussetzungen für weitere Isolations- und Reinigungsschritte dar.

Bei einer rekombinanten Überexpression wäre eine klar erkennbare Bande in Höhe des Molekulargewichts des Proteins zu erwarten gewesen (Kennzeichnung gelber Pfeil in Abbildung

24). Eine solche Bande konnte jedoch weder für EcMenB noch für DHNS in diesen Proben gefunden werden; weder im Pellet (**P**) noch im Überstand (**L**) ließ sich eine Bande mit korrekter Größe indentifizieren (DHNS-His₆: 37.876,77 Da; EcMenB-His₆: 32.453,71 Da; gelber Pfeil). Dies legt die Vermutung nahe, dass ein C-terminaler Tag die Produktion des Proteins unterbindet.

In beiden Expressionen ist jedoch das Erscheinen einer Bande im Größenbereich zwischen 25 – 30 kDa zu erkennen, die durch Zugabe von IPTG induziert wird und sich im Zeitverlauf intensiviert (Kennzeichnung schwarzer Stern). Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass das Protein zwar überexprimiert, aber schon während der Produktion durch Proteasen abgebaut wurde.

Zur Überprüfung dieses Befunds wurden die Proben der Übernachtskulturen via Westernblot und Immunodetektion auf das Vorhandensein eines Proteins mit His₆-Tag überprüft. Sollte das Protein durch Endo- oder N-terminale Exoproteasen abgebaut werden, so könnten die

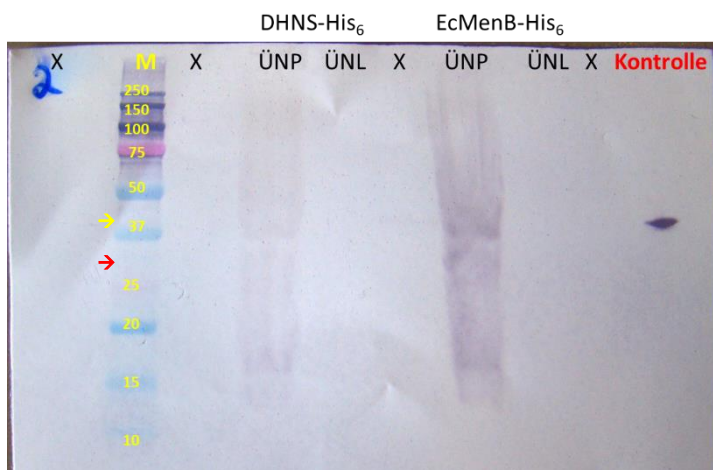


Abbildung 25

Westernblot mit Immunodetektion gegen His₆-Tag für Übernachtskulturen der Testexpressionen von DHNS-His₆ und EcMenB-His₆

ÜN: Übernachtskultur; P: Pellet; L: Lysat; : erwartete Position Proteinbande

DHNS-His₆; : erwartete Position Proteinbande EcMenB-His₆; Kontrolle: Protein mit His₆-Tag 37 kDa; M: Marker (Precision Plus Protein™ Dual Color Standard; Biorad)

merklichen Banden im Bereich von 25 kDa ein Signal in der Immunodetektion erzeugen. Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Protein aufgrund seiner Aminosäuresequenz ein leicht verändertes Laufverhalten aufweist und somit nicht auf der erwarteten Höhe aufzufinden ist. Wie aus Abbildung 25 ersichtlich, können keine eindeutigen Signale der Immunodetektion des Histidin-Hexapeptids gezeigt werden.

In den Fraktionen mit den unlöslichen Bestandteilen des Zellaufschlusses sind schwache Signale nachweisbar, die sich über die jeweilige Gesamtstrecke des Gels erstrecken. Dieser Fund ist zu erwarten, da der Antikörper nicht in Ausschließlichkeit die His₆-Sequenz bindet, sondern sich ebenso, wenn auch schwächer, an Histidin-reichen Sequenzmustern anlagert. Die sichtbaren Spuren müssen somit als Hintergrund angesehen werden. Das Erscheinungsbild einer positiven Immunodetektion wird von der Kontrolle (rechte Spalte) dargestellt.

Diese Ergebnisse führen zur augenscheinlichen Erkenntnis, dass ein C-terminaler His₆-tag die Produktion der Proteine EcMenB und DHNS unterbindet. Auf Grundlage dieser Ergebnisse, wurden weitere Bestrebungen verworfen, EcMenB-His₆ und DHNS-His₆ zu produzieren und zu isolieren.

VI.1.2.3. Variante 2: His₆-EcMenB und His₆-DHNS

(Ergebnis: Produziertes Protein ist unlöslich)

Bei Platzieren des Affinitätstags am N-Terminus erfolgte Proteinproduktion für EcMenB und DHNS. Hierbei verblieb der Großteil des Proteins unlöslich im Pellet, in Form von Einschlusskörpern.

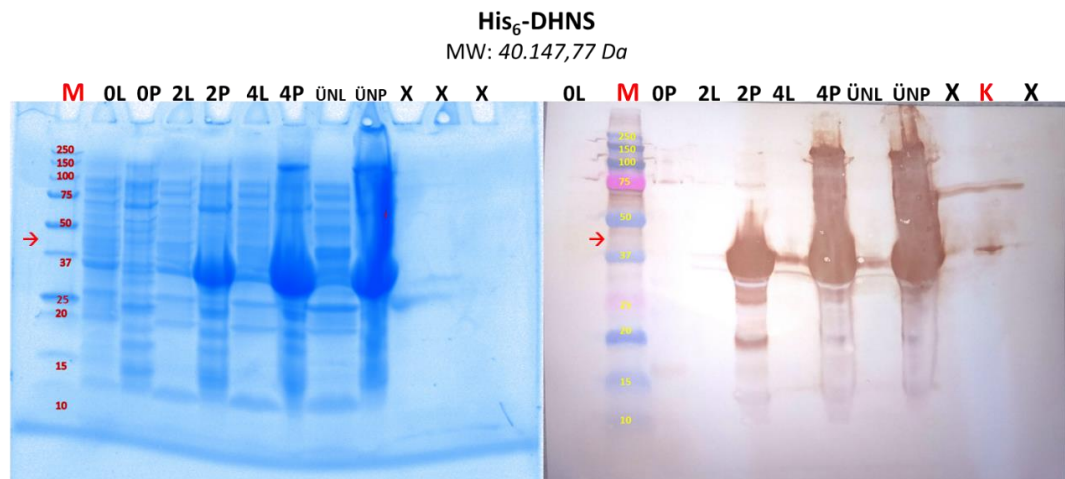


Abbildung 26

SDS-Gel und Westernblot mit Immunodetektion der Testexpression von His₆-DHNS in BL21 (DE3)

M: Marker; L: Lysat/Überstand; P: Pellet; 0: 0 h (Zeitpunkt Induktion mit 1 mM IPTG); 2: 2 h nach Induktion; 4: 4 h nach Induktion; ÜN: Übernachtskultur (~18 h nach Induktion); X: Leerstelle; K: Kontrolle (Protein mit His₆-Tag 37 kDa)

[Wachstum bis OD₆₀₀ 0.6 bei 37°C; Produktion bei 25°C]

Wie durch Abbildung 26 gezeigt, kommt es durch Zugabe von IPTG zur Produktion des Wertproteins DHNS-His₆. Dies ist an der klar ersichtlichen intensiven Bande in Höhe von 30 – 37 kDa zu erkennen.

Wie ebenfalls aus Gel (linke Seite) und Westernblot (rechte Seite) ersichtlich, findet sich das Gros des Proteins in den Spuren der unlöslichen Bestandteile des Zellaufschlusses. Es steht daher für eine weitergehende Reinigung in Isolation nicht zur Verfügung. Zum Verändern des Verhältnisses von löslichem zu unlöslichem Protein, wurden weitere Expressionsversuche mit verschiedenen Temperaturen, IPTG-Konzentrationen, Lysispuffern (Ionenstärke und pH) und

Aufschlussverfahren (Enzymatische Lyse, Ultraschallverfahren und French-Press) unternommen. Diese Bemühungen führten jedoch zu keiner merklichen Verschiebung des Verhältnisses (löslich/unlöslich). Als ein letzter Versuch wurden Pellets nach dem Aufschluss über Nacht mit der Tabak Etch Virus Protease (TEV-Protease) behandelt, um den Polyhistidin-Tag über die Schnittstelle zwischen Histidin-Sequenz und Wertprotein abzuschneiden und somit die Löslichkeit zu verbessern. Auch damit ließ sich keine Verbesserung erreichen.

Folglich konnte die weitere Reinigung nur mit dem geringen Anteil an löslichem Protein fortgesetzt werden.

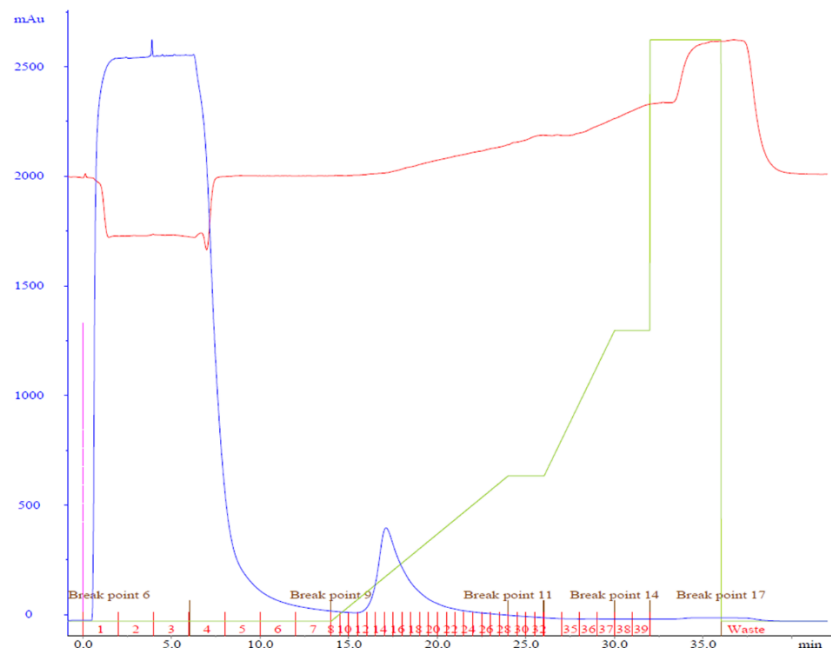


Abbildung 27

Chromatogram der Affinitätschromatographie zu His₆-DHNS, 5 ml HisTrap auf ÄKTA prime blau: Absorption bei 280 nm; grün: Konzentration Elutionspuffer, rot: Leitfähigkeit, pink: Injektion, rote Schrift X-Achse: Fraktionen; braun: Logbuch Programmabschnitte Methode; Abszisse: Zeit; Ordinate: Absorption
Elutionsprofil der Affinitätschromatographie für His₆-DHNS. Nach Beladen der Säule (Fraktionen 1- 3; starke Absorption bei 280 nm im Durchfluss) kommt es in den Fraktionen 13- 16 (7,5-12% Eluitionsbuffer; 75 - 120 mM Imidazol) zur Elution eines Proteins (Absorption ~ 450 mAU). Bei Steigerung der Konzentration des Elutionsbuffers auf 100% (1 M) kommt es zu keinen weiteren Ausschlägen in der Absorption

Zur Isolation der löslichen Fraktion von His₆-DHNS wurde die Methode der Nickel-Affinitätschromatographie an einem ÄKTAprime plus System verwendet. Hierbei finden Sepharose-Säulen Einsatz, die Ni²⁺, gebunden an Nitrilotriessigsäure (NTA), enthalten. Die Isolierung des Fusionsproteins (Protein + His₆-Tag) beruht darauf, dass Ni²⁺ mit zwei der Histidin-Resten des Proteins interagiert und sie somit binden kann. Die Elution bei diesem Verfahren erfolgt zumeist über einen Imidazol-Gradienten, der die Histidin-Reste verdrängt

und somit das Protein von der Säule löst. Die verwendeten Puffer orientierten sich an der Literatur ((Truglio et al. 2003); Tabelle 4).

Tabelle 4

Puffer der Nickel-Affinitätschromatographie [nach (Truglio et al. 2003)]

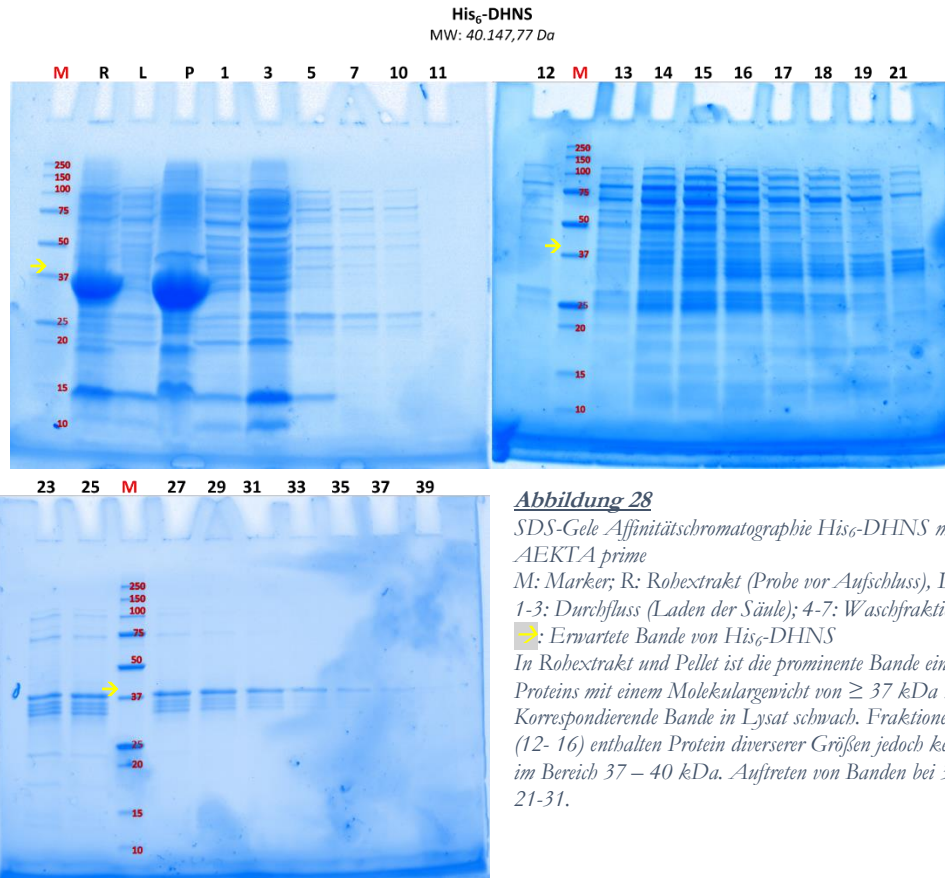
	<i>Zusammensetzung</i>	<i>Vermendung</i>
<i>Lysis-Puffer</i>	20 mM Tris-HCl pH 8; 500 mM NaCl; 5 mM Imidazol	Zellaufschluss, Auftragen des Lysats auf die Säule, Waschschrift
<i>Elutions-Puffer</i>	20 mM Tris-HCl pH 8; 500 mM NaCl; 1 M Imidazol	Elution des Proteins mittels Gradienten

Auf das Auftragen des Lysats auf die Säule folgte ein Waschschrift, um ungebundenes Protein von der Säule zu entfernen, sowie ein Elutionsschrift, bestehend aus zwei Gradienten.

Wie aus dem Chromatogramm (Abbildung 27) ersichtlich, kam es während des Elutionsschrifts bei den Fraktionen 13 – 16 zu einer Änderung der Absorption bei 280 nm; Protein wurde von der Säule gelöst. Im weiteren Verlauf wurde die Konzentration des Elutionsbuffers bis auf einen Anteil von 100 % gesteigert und die Säule so mit 1 M Imidazol gespült, jedoch ohne, dass es zu einem weiteren Ausschlag kam.

Zur weiteren Analyse lud man die einzelnen Fraktionen auf SDS-Gele (Abbildung 28), um Identität sowie Reinheit des gelösten Proteins zu ergründen.

Die Gele zeigen eindeutig das Vorhandensein eines überexprimierten Proteins im Pellet und Rohextrakt (hierbei handelt es sich um die Probe vor dem Zellaufschluss).



Im folgenden Verlauf dieses Reinigungsschritts ist jedoch keine weitere Bande dieser Art zu sehen. Die Bestandteile des eluierten Proteins der Fraktionen 13 – 16 sind divers und nicht der erwarteten Größe von His₆-DHNS zuzuordnen (gelber Pfeil). Im weiteren Verlauf (Fraktionen 21 – 31) kann das Auftreten mehrerer Banden im Bereich 37 kDa beobachtet werden. Diese führten jedoch zu keiner Änderung im Chromatogramm; die Konzentration des eluierten Proteins lag unterhalb der Detektionsgrenze des Systems und musste daher für die folgenden Versuche aufkonzentriert werden. Unter der Annahme, dass das lösliche Protein die korrekte Faltung aufweist und somit als Homohexamer vorliegt, sollte der Proteinkomplex eine Größe von 240,15 kDa aufweisen. Nach Zusammenführen und Aufkonzentrieren dieser Proben mit einer Zentrifugen-Filtereinheit (Molekulargewichtsabscheidegrenze 100 kDa), ließ sich kein Protein nachweisen. Somit handelte es sich bei diesen Banden entweder um ein anderes Protein mit ähnlichem Molekulargewicht, oder aber um Mono- bzw. Oligomere der DHNS, unterhalb von 100 kDa. Da laut Literatur lediglich das Hexamer die aktive Form des Enzyms darstellt (MW: 191 kDa (Ec); 240 kDa (At)), können diese Proben somit als inaktiv erachtet werden.

Auf Grundlage der vorliegenden Ergebnisse wurden die Produktion und Reinigung der Proteine EcMenB und DHNS mit Sequenzen für Affinitätschromatographie eingestellt.

VI.1.2.4. Variante 3: EcMenB und DHNS; Produktion der Proteine ohne Affinitätstag
(Ergebnis: Protein wird produziert und ist löslich)

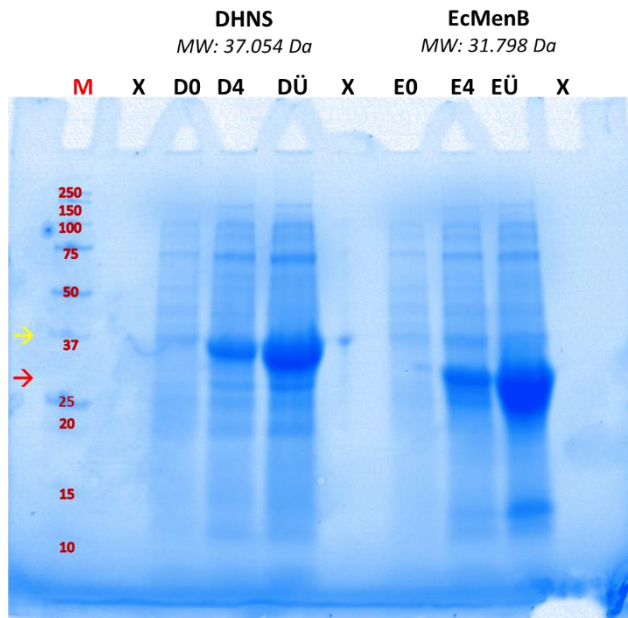


Abbildung 29
Auftragung der Lysate der Testexpression von DHNS und EcMenB

M: Marker; X: Leerstelle; D: DHNS; E: EcMenB; 0: Probe zum Zeitpunkt der Induktion (1 mM IPTG); 4: 4 h nach Induktion; Ü: Übernachtskultur (~18 h); : Erwartete Höhe der Bande von DHNS : Erwartete Höhe der Bande von EcMenB; Wachstumsphase bis OD₆₀₀:0.6 bei 37°C; Post-Induktion / Produktionsphase: 25°C

Wegen der erfolglosen Versuche von Produktion und Isolierung der Fusionsproteine mit Histidin-Tag, wurden weitere Bestrebungen in diesem Bereich eingestellt. Die Proteinproduktion erfolgte daher mit der Sequenz der Proteine in ihrer nativen Form.

Wie aus Abbildung 29 ersichtlich, konnten die Proteine DHNS und EcMenB, im Zuge der Testexpression, in der löslichen Phase aufgefunden werden. Die Spuren des jeweiligen Proteins weisen eine definierte Bande in der erwarteten Größe auf, die Intensität der Banden steigert sich in Abhängigkeit zur Zeit.

Da die Proteine ohne Affinitätstags vorliegen, konnte keine Immundetektion zur finalen Verifizierung der Identität der Banden durchgeführt werden. Um festzustellen, ob das produzierte Protein auch das tatsächlich erwünschte ist, bedurfte es des Enzym-Assays sowie alternativer Analysemethoden.

Die Reinigung erfolgte für EcMenB in zwei Schritten. Zunächst wurde eine Anionenaustauschchromatographie durchgeführt (Abbildung 30; Puffer: Tabelle 5).

Tabelle 5
Puffer der Reinigung von EcMenB

	Zusammensetzung	Verwendung
Lysis-Puffer	20 mM NaPi pH 8	Lyse, Auftragen des Lysats auf die Säule, Waschschrift
Elutionspuffer	20 mM NaPi pH 8; 1 M NaCl	Elution über Gradienten

Gemäß des Chromatogramms eluierten mehrere Gruppen getrennt von der Säule. Das erste Absorptionsmaximum erstreckt sich hierbei über die Fraktionen 16 – 23, darauf folgt eine Doppelspitze, mit den Fraktionen 33 und 38 im Zentrum.

Die den drei Ausschlägen zugeordneten Proben sowie Repräsentanten von Durchfluss und Waschschrift wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Hierbei erschien nur in den Fraktionen 19 – 21 eine Bande im für das Molekulargewicht von EcMenB erwarteten Bereich (Abbildung 30, rechter Teil), diese Fraktionen wurden daraufhin für die folgenden Schritte vereint.

Bei der Elution der Fraktionen 19-21 lag der Anteil des Elutionspuffers bei 27-35 % (grüne Linie Abbildung 30, links). Unter Berücksichtigung des Volumens der Säule (5 ml) wurde die Salzkonzentration des Aufbewahrungspuffers und Laufpuffers der Größenausschlusschromatographie auf 300 mM NaCl gesetzt. Das Volumen der Säule spielte hierbei eine Rolle, da das Eluat erst die gesamte Säule durchwandern musste, um an den Detektor zu gelangen, folglich erfolgte die Elution 5 ml vor der angegebenen Konzentration.

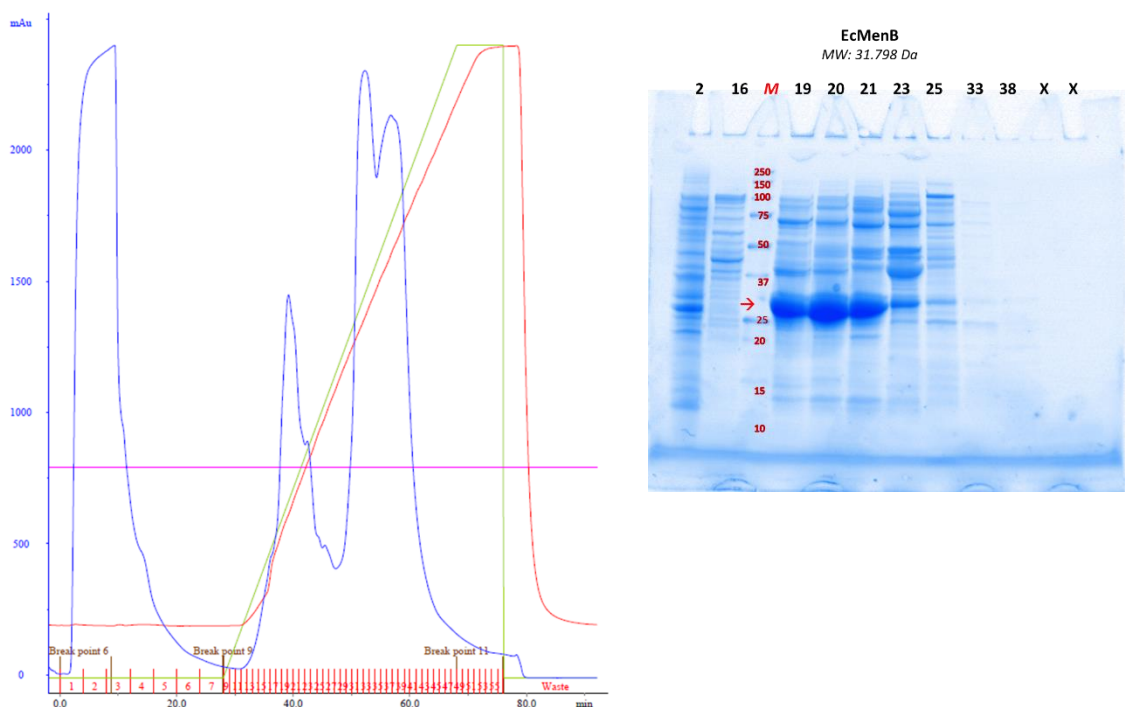


Abbildung 30

Chromatogramm und SDS-PAGE der Anionenaustauschchromatographie von EcMenB;

links: blau: Absorption 280 nm [mAU]; rot: Leitfähigkeit; grün: Konzentration Elutionspuffer; Abszisse: Zeit; Ordinate: Absorption; rechts: M:Marker; X: Leerstelle; 2: Durchfluss; 16 – 25: Erste Erhebung in Absorption; 33: Zweite Spitze; 38: Drittes Maximum;

Darauf folgten Analyse und Reinigung mittels Größenausschlusschromatographie, sowie anschließend die Analyse der den Ausschlägen des Chromatogramms zugeordneten Fraktionen

(8 – 16) mittels SDS-PAGE (denaturierend) und Native-PAGE. Im denaturierenden Gel (Abbildung 31, rechter Teil oben) befand sich bei allen Fraktionen der Reinigung die dominante Bande auf einer Höhe von ~32 kDa. Dies entsprach der erwarteten Höhe des Monomers von EcMenB (~32 kDa, roter Pfeil).

Im Gegensatz zur SDS-PAGE liefert die Native-PAGE Informationen über den Oligomerisierungszustand des Proteins. Innerhalb des nativen Gels (Abbildung 31, rechter Teil unten) dominieren zweierlei Banden mit unterschiedlichem Molekulargewicht (zwischen 66 und 146 kDa, beziehungsweise zwischen 146 und 242 kDa). Basierend auf der Erkenntnis der SDS-PAGE (Größe des einzigen verfügbaren Moleküls ~ 32 kDa) kann angenommen werden, dass es sich bei den Banden um Oligomere der EcMenB handeln sollte. Die erstere, kleinere Bande (roter Stern) könnte somit ein Trimer abbilden (~95 kDa), die zweite (obere Bande; gelber Stern) entspräche dem Hexamer und damit der (gemäß der Literatur, (Truglio et al. 2003)) aktiven Form des Proteins (~190 kDa).

Somit konnte die höchste Konzentration an aktivem Protein in den Fraktionen 11 – 12 erwartet werden, da dort die Banden des vermutlichen Hexamers am intensivsten und die Banden des Trimers relativ schwach waren.

Für weitere Analysen wurden lediglich diese Fraktionen zu einer Probe vereint, um bestmöglich Verunreinigungen durch inaktives Protein zu vermeiden.

Zur Verwendung im Enzym-Test wurde diese Probe aufkonzentriert. Hierfür diente eine Zentrifugen-Filtereinheit mit einer Molekulargewichtsabscheidegrenze von 100 kDa. Dieser Schritt konnte als finaler Reinigungsschritt von EcMenB betrachtet werden, da Proteine mit einem geringeren Molekulargewicht die Membran passieren konnten und so aus der Probe entfernt wurden.

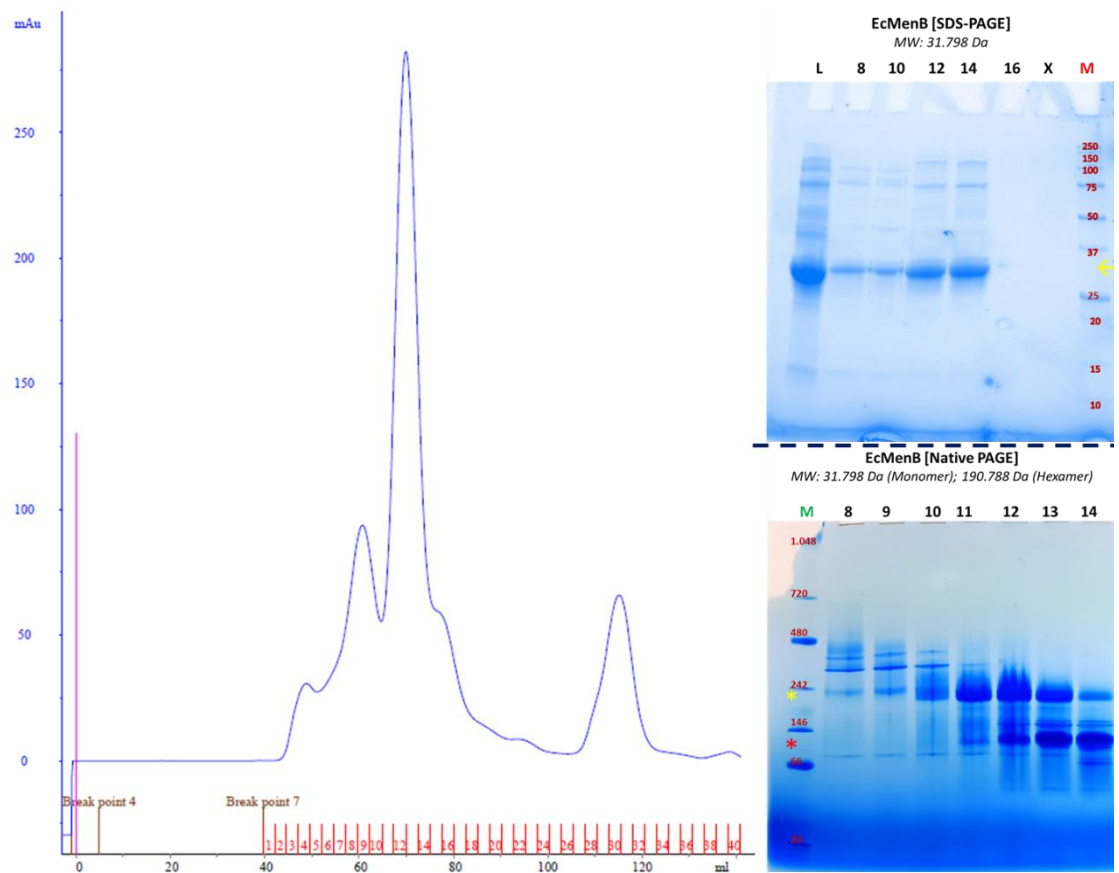


Abbildung 31

Elutionsprofil Größenausschlusschromatographie EcMenB mit Fraktionen analysiert via SDS- und Native-PAGE

Abszisse: Volumen [ml]; Ordinate: Absorption [mAU]; rechts oben: Gel der SDS-Page; L: Ladung; M: Marker; Zahl: Fraktion
rechts unten: Gel der Native-PAGE; M: Marker

Analog zu der zuvor beschriebenen Isolation von EcMenB geschah die Reinigung von DHNS, dem MenB-Entsprechung aus *A. thaliana*, wobei die zuvor gewonnen Erkenntnisse eine Optimierung und Vereinfachung der Reinigungsmethodik zuließen.

Die Reinigung für DHNS erfolgte ebenfalls mittels Anionenaustauschchromatographie. Die Methode wurde hierbei so weit optimiert (Herabsetzen der Ionenstärke des Lysispuffers, Verwendung von zwei gekoppelten HiTrap Q XL 5 ml Säulen), dass aufgrund der hohen Reinheit die Größenausschlusschromatographie ausgelassen werden konnte (Puffer: Tabelle 6).

Tabelle 6

Puffer der Reinigung von DHNS

	Zusammensetzung	Verwendung
Lysis-Puffer	10 mM NaPi pH 8	Lysis, Auftragen des Lysats auf die Säule, Waschsritt
Elutionspuffer	10 mM NaPi pH 8; 1 M NaCl	Elution mittels Gradient

Als letzter Reinigungsschritt diente erneut das Aufkonzentrieren der vereinten Fraktionen mittels einer Zentrifugen-Filtereinheit, mit einem Molekulargewichtsabschneidegrenze von 100 kDa.

Die Abbildungen 32 und 33 illustrieren den Reinigungsprozess für DHNS, beginnend mit dem Auftrennen des Zelllysates nach Ionenstärke. Das Chromatogramm (Abbildung 32, linke Seite) des Reinigungsschrittes offenbart mehrere Erhebungen, die sich über die Fraktionen 24 – 52 erstrecken. Zur Identifizierung der einzelnen Fraktionen wurde jede zweite Probe von Fraktion 22 bis 52, Fraktionen des Lade- und Waschvorgangs sowie Lysat und Pellet per SDS-PAGE analysiert (Abbildung 32, rechte Seite oben und unten). Ab Fraktion 24 bis hin zu Fraktion 36 ist eine prominente Bande in Höhe des Molekulargewichts des Monomers (gelber Pfeil) zu sehen. Da in den Fraktionen 34 und 36 eine Vielzahl an weiteren Proteinbanden auftrat sowie die Bande des Zielproteins abnahm, wurden lediglich die Fraktionen 25 bis 33 zu einer genaueren Analyse auf ein weites SDS-Gel aufgetragen (Abbildung 33).

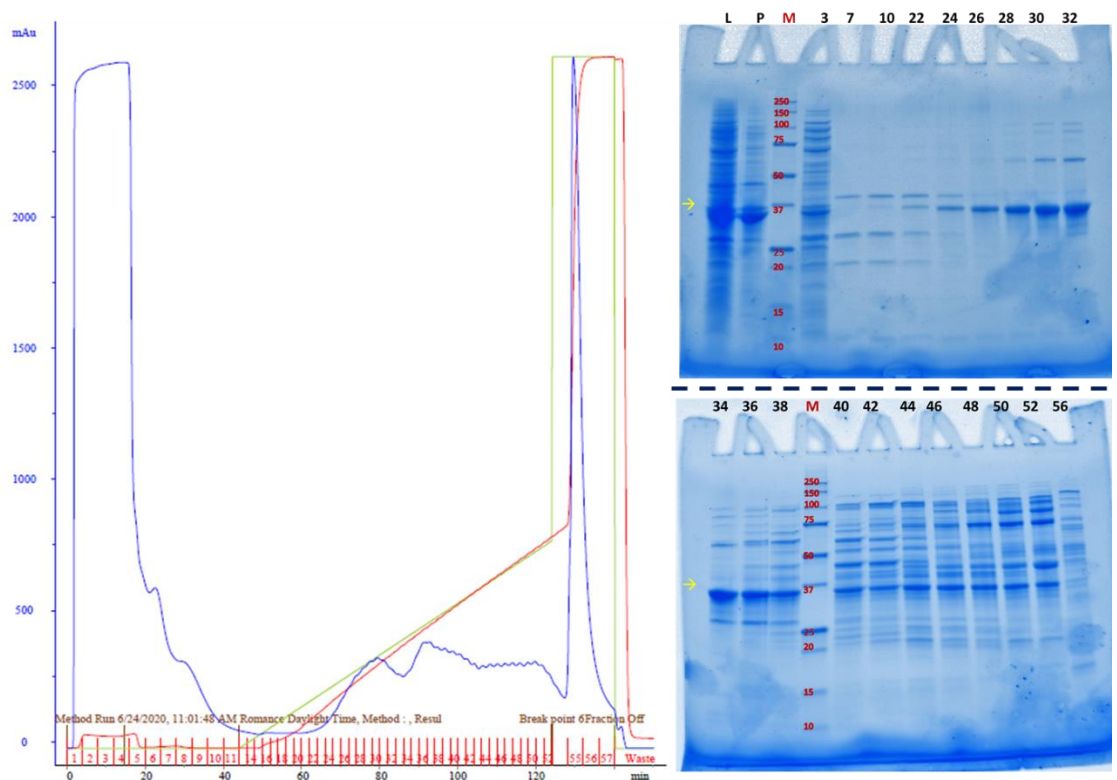


Abbildung 32

Chromatogramm (links) der Anionenaustauschchromatographie DHNS in 2x HiTrap Q XL sowie Gele der SDS-PAGE (rechts) zur Identifizierung der DHNS-baltigen Fraktionen

links: Abszisse: Zeit; Ordinate: Absorption 280nm; blau: Absorption; rot: Leitfähigkeit; grün: Gradient Puffer B;

rechts: M: Marker; L: Lysat; P: Pellet; Zahl: Fraktion; gelber Pfeil: Höhe der für DHNS erwarteten Bande (~37 kDa)

Innerhalb der aufgetragenen Fraktionen (25 – 33) intensiviert sich die Bande auf Höhe von 37 kDa bis hin zu Fraktion 31 (Abbildung 33, linke Seite; gelber Pfeil). Gleichzeitig treten ab

den Fraktionen 27 und 30 weitere klare Banden auf (27 : ~60 kDa (schwarzer Pfeil); 30: ~27 kDa (roter Pfeil)). Um die Verunreinigung durch Fremdprotein möglichst gering zu halten, wurden somit nur die Fraktionen 25 – 30 zusammengeführt und über eine Zentrifugen-Filtereinheit eingengt. Wie dem nativen Gel (Abbildung 33, rechte Seite; gelber Stern erwartete Höhe Hexamer) zu entnehmen ist, konnte durch das Aufkonzentrieren eine weitere Bande zwischen 66 und 146 kDa entfernt werden (Vergleich P und K in Abbildung 33; roter Stern).

Das so erhaltene Protein wurde daraufhin im Enzymtest eingesetzt.

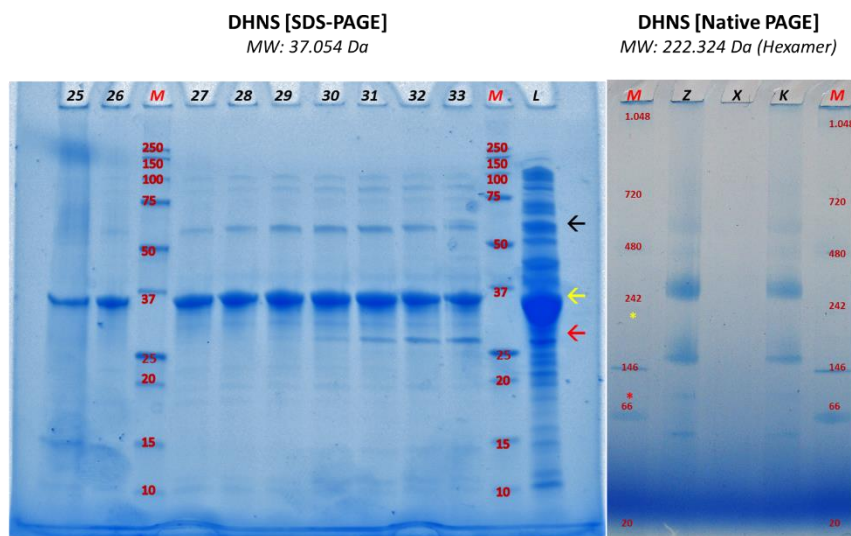


Abbildung 33

SDS- und Natives-Gel für DHNS nach Anionenaustauschchromatographie und Aufkonzentrieren mit Zentrifugen-Filtereinheit (Massenabscheidengrenze 100 kDa);

M: Marker; Nummer: Fraktion; L: Lysat; Z: zusammengeführte Fraktionen (Fraktionen 25 – 30); K: Konzentrat

VI.1.2.5. Produktion und Reinigung des „Hilfsenzym“ EcMenE, in allen drei Varianten

Wie zuvor schon für DHNS und EcMenB beschrieben, erfolgte auch die Produktion des oben genannten „Hilfsenzym“ in drei Varianten, die sich durch die Position beziehungsweise das Vorhandensein eines His₆-Tags zur Nickel-Affinitätschromatographie unterscheiden.

Variante 1 stellt hierbei die native Form des Enzyms dar (EcMenE). Die Aufreinigung erfolgte mittels Anionenaustauschchromatographie (Puffer: Tabelle 7), das Chromatogramm sowie die SDS-Gele finden sich in Abbildung 34.

Tabelle 7

Puffer der Reinigung von EcMenE

	<i>Zusammensetzung</i>	<i>Verwendung</i>
<i>Lysis-Puffer</i>	20 mM Tris-HCl pH 8	Lyse, Auftragen des Lysats auf Säule, Waschschritt
<i>Elutionspuffer</i>	20 mM Tris-HCl pH 8; 1 M NaCl	Elution mittels Gradienten

Gemäß dem Chromatogramm eluierten bei ansteigender Ionenkonzentration zwei Fraktionen, die sich über die Proben 15 – 25 sowie 30 – 40 erstreckten. Wie mittels eines ersten SDS-Gels (Abbildung 34, rechts oben) identifiziert, befand sich das überexprimierte Protein innerhalb des ersten Absorptionsmaximums, da in Probe 21 (Repräsentant dieses Ausschlags; Mittelpunkt) eine klare Bande mit einem Molekulargewicht von ~ 50 kDa zu erkennen ist. Folglich wurden die Fraktionen dieser Spitze auf ein weiteres SDS-Gel (Abbildung 34, rechts unten) aufgetragen und in Hinsicht auf Reinheit und Intensität der Banden im Bereich um 50 kDa analysiert. Als Ergebnis dieser Analyse wurden die Proben 18 – 21 vereint und mittels Zentrifugen-Filtereinheit, zur Verwendung für weitere Reinigungsschritte, konzentriert (Molekulargewichtsabscheidegrenze 30 kDa).

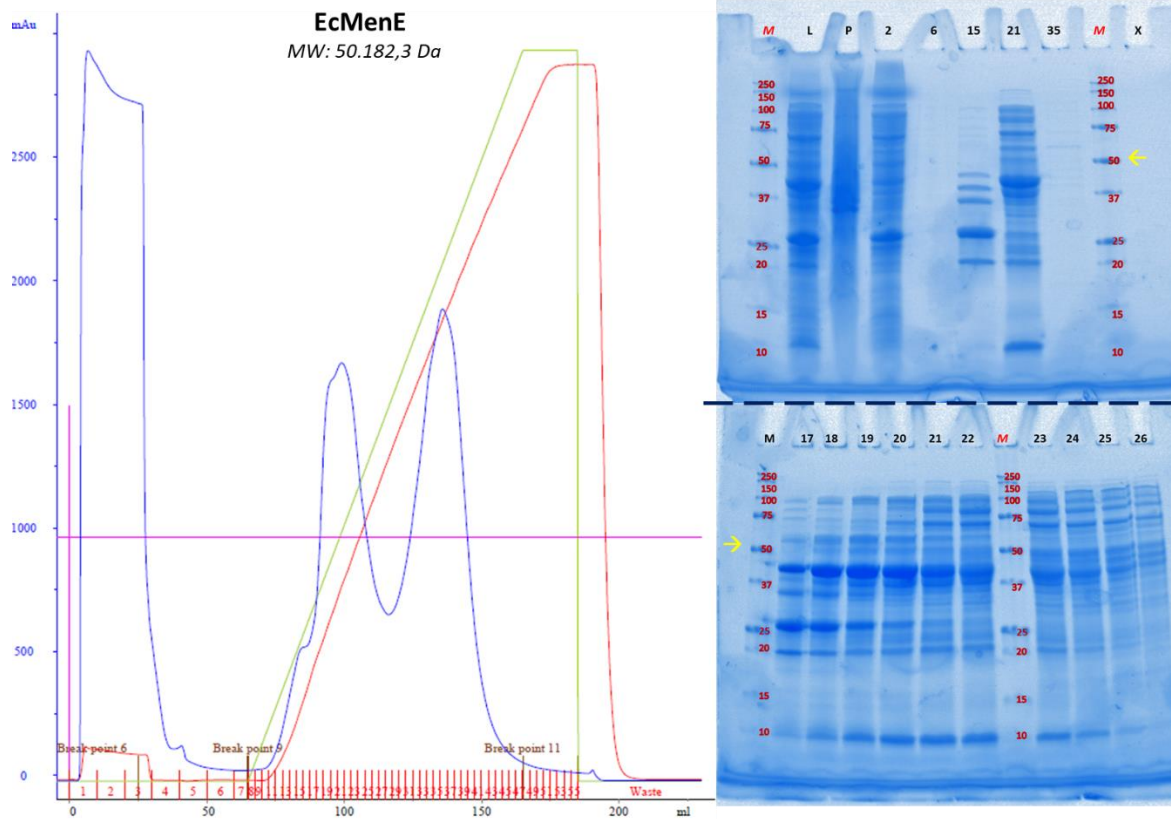


Abbildung 34

Reinigung von EcMenE mittels Ionenaustauschchromatographie; HiTrap Q XL 5ml

Abszisse: Volumen [ml]; Ordinate: Absorption [mAU]; blau: Absorption; rot: Leitfähigkeit; grün: Gradient von Puffer B;

rechts: Gele der SDS-PAGE; M: Marker; L: Lysat; P: Pellet; X: Leer; Zahl: Fraktion; Größe EcMenE markiert gelber Pfeil

Parallel zur Produktion und Reinigung von EcMenE (Variante 1) liefen Produktion und

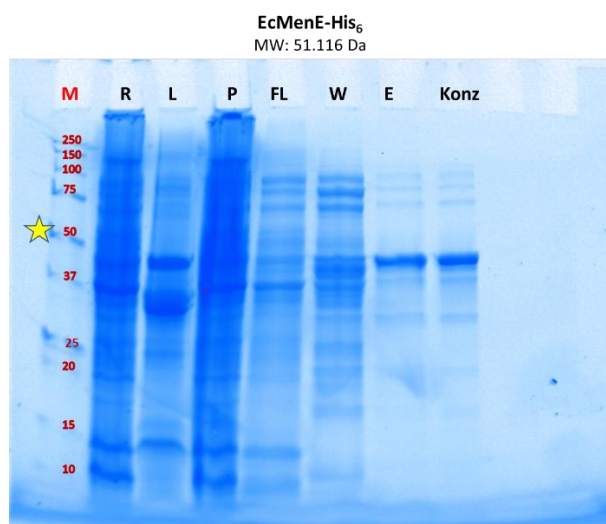


Abbildung 35

Reinigung von EcMenE-His₆ mittels Affinitätschromatographie

M: Marker; R: Rohextrakt; L: Lysat (lösliche Phase); P: Pellet (unlösliche Phase); FL: Durchfluss; W: Waschschrift; E: Eluat; Konz: Konzentrat
Stern: Erwartete Höhe für Bande von EcMenE-His₆

Reinigung ebenso für die His₆-getaggten Formen EcMenE-His₆ (Variante 2; Hexahistidin-Tag C-terminal) sowie His₆-EcMenE (Variante 3, bei der die Sequenz zur Affinitätschromatographie N-terminal positioniert wurde).

Im Fall von Variante 2 befindet sich der His₆-Tag C-terminal (EcMenE-His₆). Wie aus Abbildung 35 zu ersehen (SDS-Gel resultierend aus Reinigung mit Ni-NTA Fast Start Kit, Qiagen; Puffer: Tabelle 8), konnte das Protein in hoher Reinheit produziert werden. Das SDS-Gel weist

eine klare Bande im Bereich von 50 kDa im Lysat sowie in der Elutionsfraktion und dem

Konzentrat auf (nach Wechseln des Puffers mittels PD-10 Säule sowie Aufkonzentrieren mittels Zentrifugen-Filtereinheit mit Molekulargewichtsabscheidegrenze von 30 kDa). Dies entsprach dem Molekulargewicht des erwarteten Proteins.

Tabelle 8

Puffer der Reinigung von EcMenE-His₆ mittels Ni-NTA Fast Start Kit

<i>Zusammensetzung</i>	
<i>Lysispuffer</i>	20 mM Tris-HCl pH 8; 500 mM NaCl; 5 mM Imidazol
<i>Waschpuffer</i>	20 mM Tris-HCl pH 8; 500 mM NaCl; 60 mM Imidazol
<i>Elutionspuffer</i>	20 mM Tris-HCl pH 8; 500 mM NaCl; 500 mM Imidazol
<i>Lagerungspuffer</i>	50 mM Tris-HCl pH8; 300 mM NaCl; 2 % Glycerin

VI.1.2.6. Aktivitätstest von EcMenE-His₆

Der Nachweis der enzymatischen Aktivität von EcMenE-His₆ wurde mittels des Malachitgrün-Tests (Abbildung 36) erbracht:

Die von MenE katalysierte Reaktion setzt OSB zu OSB-CoA unter Verbrauch von ATP um, ATP wird hierbei zu AMP und Pyrophosphat (PP_i) umgewandelt. Durch zusätzliche Zugabe von Pyrophosphatase entstehen so pro verbrauchtem Mol ATP zwei Mol Phosphat, die durch den Malachitgrün-Test quantitativ erfasst werden können. Hierbei wurde die eine Fraktion mit dem Substrat (OSB) versetzt, bei der anderen fehlte dieser Zusatz.

Wie aus dem Graphen des Aktivitätstest (Abbildung 36; linke Seite) sowie der 96-Loch-Platte zu entnehmen (Abbildung 36, rechte Seite), fand in Gegenwart des Substrats ein ATP-Verbrauch bzw. fand die Produktion von Phosphat statt. Hierbei wurde ab einer Enzymmenge von 12.5 µM ein Plateau erreicht. Ohne den Zusatz von OSB erfolgte augenscheinlich keine Reaktion, da kein freies Phosphat detektiert werden konnte.

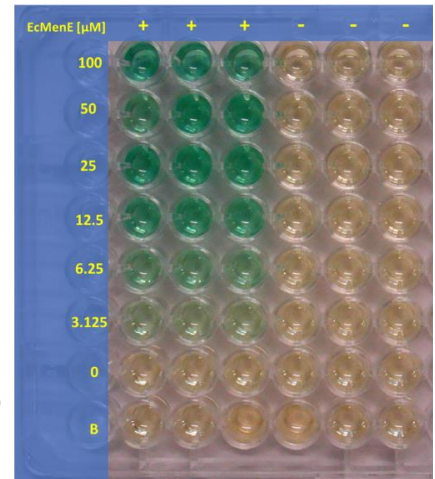
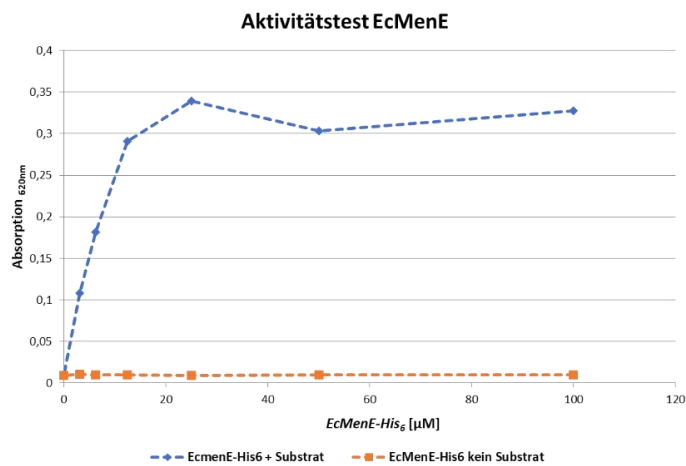


Abbildung 36

Malachitgrün-Test in 96-Loch Platte für verschiedene Konzentrationen von EcMenE-His₆
 +: 60 µM OSB zugesetzt; -: kein OSB zugesetzt; B: Blank

links: graphische Auswertung des Aktivitätstests; Abszisse: Enzym-Konzentration; Ordinate: Absorption
 blau: 60 µM Substrat (OSB) zugesetzt; orange: kein Substrat zugesetzt

EcMenE-His₆ konnte somit erfolgreich produziert und isoliert werden und zeigte Enzymaktivität. Es konnte daher für den gekoppelten Test als Hilfsenzym eingesetzt werden.

Die Reinigung von His₆-EcMenE (Variante 3) erfolgte entsprechend zur EcMenE-His₆ (Variante 2) mittels Nickel-Affinitätschromatographie. Wie aus Abbildung 37 zu entnehmen, wurde zur besseren Überwachung und gegebenenfalls Anpassung der Reinigung ein Chromatographie-System (ÄKTAprime plus) verwendet. Wie vom Chromatogramm offenbart, eluierte im Zuge des Gradienten lediglich ein Ausschlag. Die betreffenden Fraktionen wurden sodann mittels SDS-PAGE analysiert, aufgrund ihrer hohen Reinheit zusammengeführt und nach Austausch des Puffers (PD-10 Säule) unter Verwendung einer Zentrifugen-Filtereinheit aufkonzentriert.

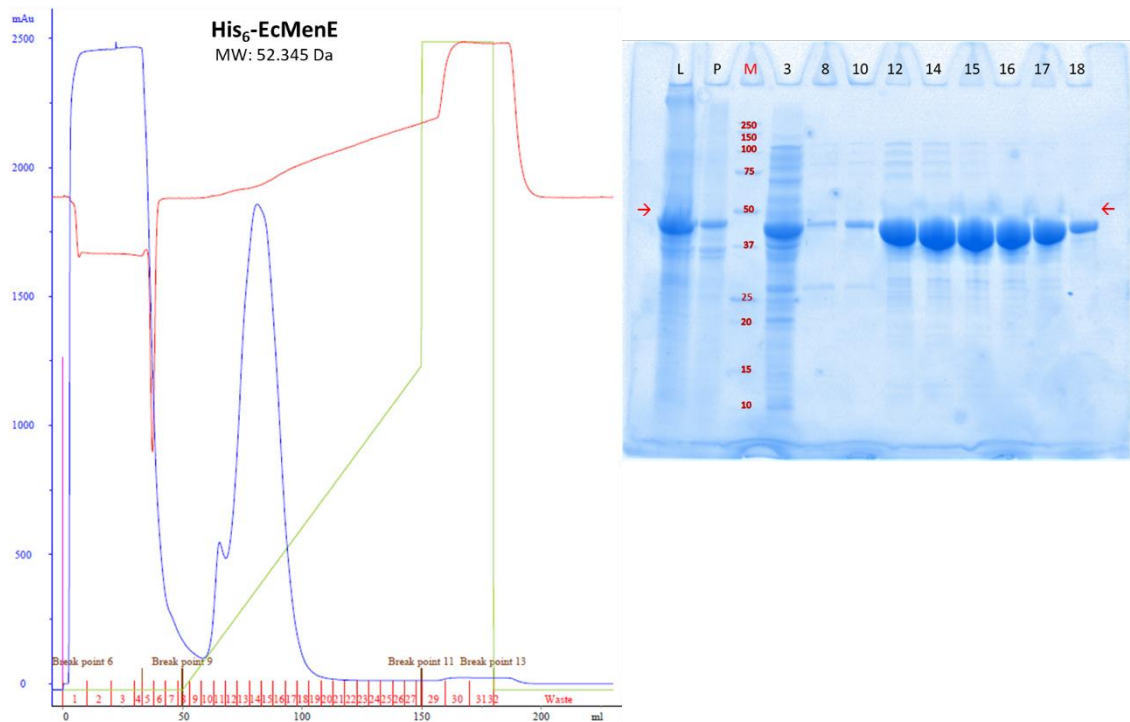


Abbildung 37

Reinigung von His₆-EcMenE mittels Affinitätschromatographie; HisTrap FF 5ml

links: Chromatogramm; Abszisse: Volumen; Ordinate: Absorption; blau: Absorption; rot: Leitfähigkeit; grün: Gradient Puffer B; rechts: Gel der SDS-PAGE: L: Lysat; P: Pellet; M: Marker; Zahl: Fraktion

Das so erhaltene Enzym konnte daraufhin mittels des Malachitgrün-Assays auf seine Aktivität überprüft werden (Abbildung 38). Wie der Abbildung zu entnehmen ist, zeigte das Enzym Aktivität und erreichte ab einer Konzentration von $2,3 \cdot 10^{-1} \mu\text{M}$ ein Plateau. Mittels Eichgrade war es möglich, die gemessenen Werte der Absorption bei 620 nm in μM Phosphat umzurechnen. Wie der Tabelle zu entnehmen ist, korrespondiert der Absorptionswert des Plateaus zu einer PO_4 -Konzentration von $\sim 120 \mu\text{M}$. Da pro umgesetzten Mol Substrat zwei Mol PO_4 freigesetzt werden, entspricht dies $60 \mu\text{M}$ OSB (0,3 nmol), der vollen Menge an eingesetztem Substrat. Das Substrat wurde somit innerhalb von 5 min komplett umgesetzt.

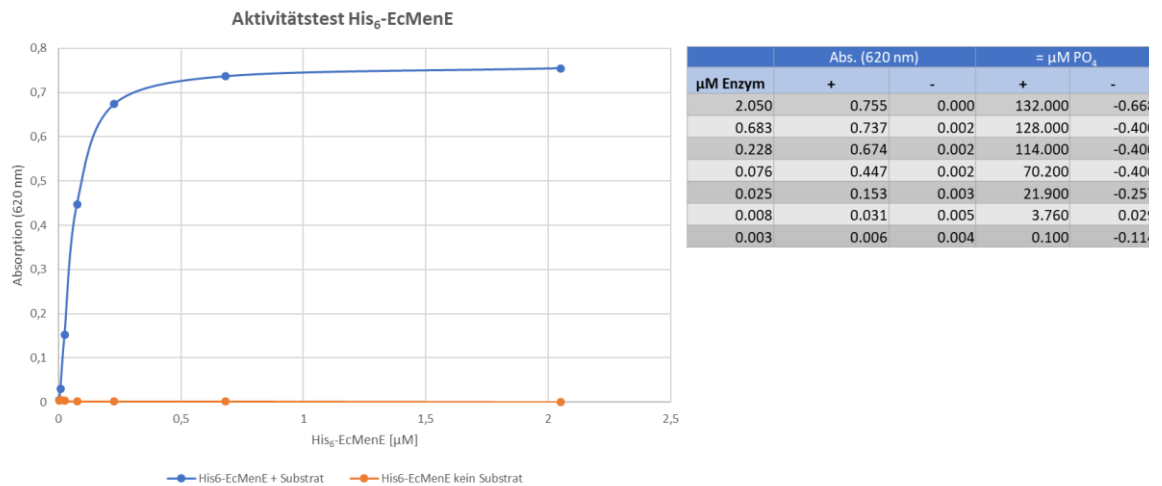


Abbildung 38

Malachit-Grün-Assay für His₆-EcMenE mit korrespondierender Phosphat-Bilanzierung mittels Eichgrade
 Der Malachit-Grün-Assay wurde mit Konzentrationen an His₆-EcMenE zwischen 3×10^{-3} - 2,05 µM durchgeführt.
 links: graphische Auswertung Aktivitätstest: Abszisse: Enzym-Konzentration; Ordinate: Absorption;
 rechts: Phosphat-Bilanzierung

Basierend auf diesen Ergebnissen konnte His₆-EcMenE (Variante 3) ebenfalls als Hilfsenzym für den gekoppelten Enzym-Assay genutzt werden. Der Vergleich der Varianten 3 und 2 (Affinitätstag N- bzw. C-terminal) offenbart weiterhin, dass die Form mit N-terminalem Tag eine deutlich höhere Aktivität aufweist, da das Plateau schon bei einer Konzentration von 0,23 µM im Gegensatz zu 12,5 µM erreicht wird.

Auf Grund der vereinfachten Reinigung sowie der Aktivität der Versionen mit Hexahistidin-Sequenz (Varianten 2 und 3) wurden die Versuche mit Variante 1 (kein Affinitäts-Tag) aus zeitlichen Gründen nicht weiter verfolgt.

VI.1.2.7. Vortest zum Aufbau der Enzymkinetik mittels EcMenE-EcMenB

Zur Auslotung der grundsätzlichen Durchführbarkeit des Assays unter den beschriebenen Bedingungen wurde als Vortest die in der Literatur schon beschriebene gekoppelte Reaktion der aus *E. coli* stammenden Enzyme aufgesetzt (Bedingungen: Tabelle 9 [nach (Li et al. 2011b; Jiang, Chen, Guo & Guo 2010)]). Die Konzentration der Substrate ATP und CoA wurde stets doppelt so hoch wie die von OSB gehalten, um einzig OSB als limitierenden Faktor zu haben.

Tabelle 9

Reaktionsbedingungen des gekoppelten Enzymassays von EcMenE und EcMenB [nach (Li et al. 2011b; Jiang, Chen, Guo & Guo 2010)]

Puffer	100 mM NaPi pH 7; 150 mM NaCl; 1 mM MgCl ₂ ; 10 mM HNaCO ₃
Substrate	120 µM ATP; 120 µM CoA; 60 µM OSB

Durch den Malachitgrün-Test war belegt, dass EcMenE (Varianten 2 und 3) Aktivität aufweist. Somit wurde der Test mit EcMenE-His₆ (Variante 2) und EcMenB (im Verhältnis von mindestens 5:1; Verhinderung von Substratlimitierung durch erstes Enzym) angesetzt und über 24 min laufen gelassen. Hierbei wurde die Produktbildung bei einer Wellenlänge von 392 nm detektiert, dem in der Literatur beschriebenen Absorptionsmaximum von DHNA-CoA. Da in

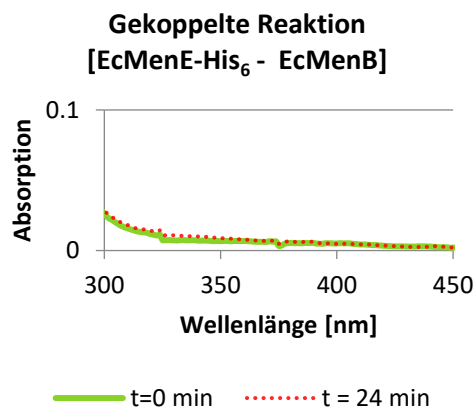


Abbildung 39

Test auf Änderung im Absorptionsspektrum (300 – 450 nm) durch Produktbildung durch gekoppelte Reaktion von EcMenE-His₆ und EcMenB

der Literatur ein Verschieben des Absorptionsmaximums des Produkts in Gegenwart der Enzyme berichtet wurde, erfolgten die Messungen für einen Wellenlängenbereich von 300 – 450 nm, um etwaige Abweichungen zu detektieren und den Test dahingehend anpassen zu können (Chen et al. 2011).

Abbildung 39 zeigt das Absorptionsverhalten des Reaktionsansatzes über die Wellenlänge, für zwei Zeitpunkte. Hierbei stellt die grüne Linie den Startzeitpunkt (t = 0 min) dar, die rote unterbrochene Linie markiert den Endzeitpunkt (t = 24 min). Wie der Abbildung zu entnehmen ist, erfolgte keine Absorptionsänderung innerhalb dieser Zeitspanne; es wurde folglich kein Produkt gebildet.

Zur Ermittlung des Grundes für das Ausbleiben der Reaktion wurden die enzymatischen Schritte erneut einzeln betrachtet.

Um die Aktivität von EcMenB überprüfen zu können, bedarf es des Substrats OSB-CoA, das durch die Reaktion von EcMenE produziert wird. Die Aktivität von EcMenE-His₆ war durch den Verbrauch von ATP in Gegenwart des Substrats OSB soweit validiert. Jedoch kann mit diesem Testverfahren keine Aussage über das tatsächliche Vorhandensein des Intermediats/Produkts der MenE-Reaktion getroffen werden. Weiterhin ist durch die Literatur beschrieben, dass OSB-CoA instabil ist und zur Bildung des Laktons neigt, das nicht als Substrat der MenB-Reaktion dient.

Zur besseren Überwachung der Reaktion und Detektion neuer Reaktanten wurde eine HPLC-Analyse durchgeführt. Hierfür wurden zuerst alle verfügbaren und plausiblen Reaktanten (ATP, AMP, ADP, CoA und OSB) einzeln aufgetragen, um die jeweilige Retentionszeit als auch die Fläche unterhalb der Kurve für eine definierte Konzentration zu ermitteln. Die Detektion erfolgte bei 258 nm, um den Verbrauch der Substrate darstellen zu können, ebenfalls sollte der CoA-Anteil des OSB-CoA bei dieser Wellenlänge darzustellen sein. Daraufhin erfolgte das Auftragen der Reaktion.

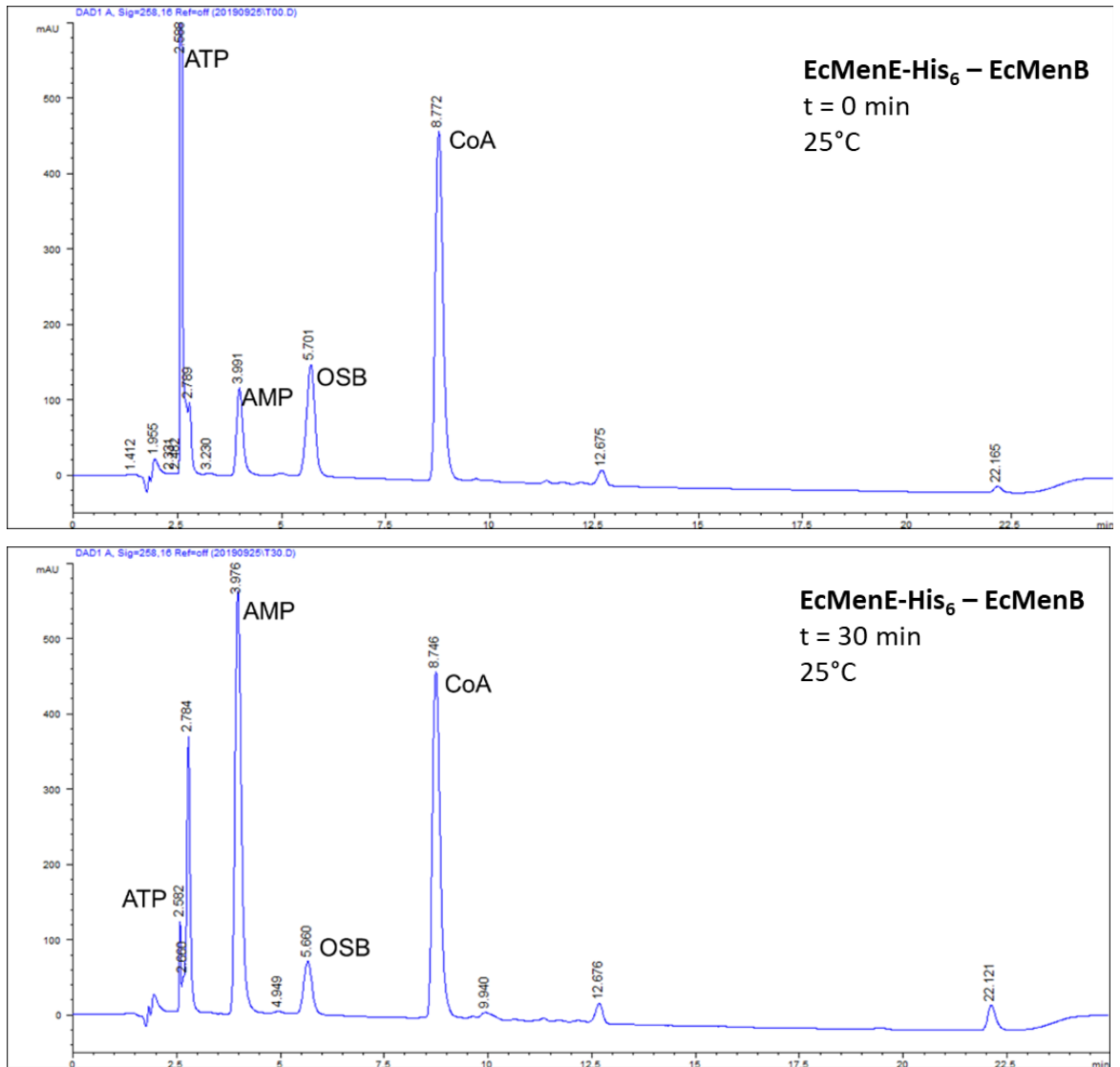


Abbildung 40

HPLC-Analyse der gekoppelten Reaktion von EcMenE-His₆ und EcMenB

Abszisse: Zeit in Minuten; Ordinate: Absorption in mAU (tausendstel Absorptionseinheiten)

Die gekoppelte Reaktion wurde für 30 min bei 25°C inkubiert und nach Entfernen der Enzyme mittels HPLC in Reaktanten und Produkte aufgeschlüsselt. Der Vergleich der Ausgangssituation (t = 0 min) mit dem Endpunkt (t = 30 min) offenbart Änderungen in der Konzentration von ATP (Verbrauch) und AMP (Bildung) sowie leichte Änderungen im Bereich des OSBs. Die Konzentration von CoA bleibt hingegen unverändert. Weiterhin kann kein Auftreten einer weiteren Fraktion bei anderer Retentionszeit beobachtet werden.

In Abbildung 40 sind die Profile der HPLC-Läufe zum Startzeitpunkt der Reaktion (t = 0 min) sowie nach 30 Minuten (t = 30 min) dargestellt.

Im Anfangszustand (Abbildung 40, oben) sieht man einen deutlichen Ausschlag von ~600 mAU (mAU: Absorption in tausendstel Absorptionseinheiten) nach 2.6 min der ATP zugeordnet werden kann. OSB folgt bei 5.7 min (~ 170 mAU) sowie CoA bei 8.8 min (~ 480 mAU). Ebenfalls ist ein kleinerer Ausschlag für AMP (~120 mAU) zu erkennen, dies mag dem Umstand geschuldet sein, dass zwischen Zugabe der Enzyme und Abstoppen der Reaktion einige Sekunden vergingen.

Beim Vergleich des Anfangszustands mit dem Zustand nach 30 min (Abbildung 40, unten) resultiert eine klare Änderung im Bereich von ATP und AMP. Während die Höhe des Ausschlags bei ATP von 600 mAU auf 120 mAU reduziert ist, steigt die Absorption bei der Retentionszeit von AMP von 120 mAU auf ~600 mAU. Eine Umwandlung von ATP zu AMP kann somit angenommen werden. Bei Betrachtung des dem OSB zugeordneten Ausschlags lässt sich eine Abnahme von 170 mAU auf 80 mAU beobachten. Im Gegenteil hierzu erscheint CoA unverändert (gleichbleibend hoher Ausschlag bei 480 mAU). Weiterhin kommt es wider Erwarten zu keinem Auftauchen neuer Ausschläge (DHNA-CoA oder OSB-CoA). Weder Produkt noch Intermediat sind nachweisbar. Auch die Flächenintegrale unterhalb der Kurve belegen diese Ergebnisse; ATP wird verbraucht, AMP entsteht, die Konzentration von OSB ändert sich, jedoch im Fall von CoA kommt es zu keinerlei Änderung.

Tabelle 10

Stoffmenge der Reaktanten in Ansatz basierend auf Fläche unterhalb der Kurve

Reaktant	t = 0	t = 15	t = 30
	nMol	nMol	nMol
ATP	13.7		
AMP	2.2	9.5	10.8
OSB	9.9	4.7	4.9
CoA	12.3	12.2	12.6

Das Wissen über den Ablauf der enzymatischen Reaktion (Abbildung 10) legt eine Interpretation dieser Ergebnisse nahe: Das Intermediat OSB-CoA reagiert unmittelbar nach seinem Entstehen zum Spirodilacton weiter, womit kein Substrat für die folgende Reaktion zur Verfügung steht. Die Gründe hierfür sind vielseitig: Schon geringfügige Abweichungen vom idealen neutralen pH-Wert zum sauren oder basischen Bereich begünstigen eine Lactonisierung. Diese kann außerdem durch eines der Proteine (EcMenE, EcMenB) beziehungsweise den His₆-Tag gefördert werden.

Zur Überprüfung eines etwaigen Einflusses der Position des Hexahistidin-Tags auf die Reaktion, wurde der Ansatz (anstelle von Variante 2) mit His₆-EcMenE (His₆-Tag, N-terminal; Variante 3) wiederholt (Bedingungen: Tabelle 9).

Nochmals wurde der Wellenlängenbereich von 300 – 450 nm untersucht, um etwaige Abweichungen vom Literaturwert des Absorptionsmaximums (392 nm) detektieren zu können.

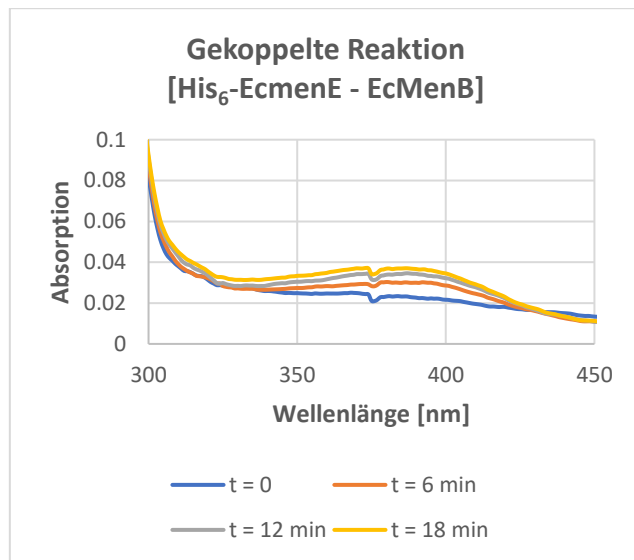


Abbildung 41

Spektrogramm der gekoppelten Reaktion His₆-EcMenE und EcMenB (Spektrum von 300 – 450 nm);
Im Zuge der Reaktion von His₆-EcMenE und EcMenB kommt es zum Auftreten einer Änderung im Absorptionsspektrum zwischen 340 und 430 nm. Die Absorption nimmt im Lauf der Zeit zu.

Das resultierende Spektrogramm ist in Abbildung 41 dargestellt. Wie der Abbildung zu entnehmen ist, kommt es bei den verschiedenen Zeitpunkten, im Bereich 338 – 430 nm, zu einer Änderung der Absorption, die ihr Maximum im Bereich von 390 nm findet. Mit zunehmender Zeit erhöht sich der Absorptionswert, es kommt zur zunehmenden Bildung eines Produkts im kennzeichnenden Wellenlängenbereich von DHNA-CoA. Ein N-terminaler His₆-Tag an EcMenE behindert somit die Reaktion nicht. Auf Grundlage dieses Resultats wurde für

die weiteren Versuche nur noch His₆-EcMenE (Variante 3) als Hilfsenzym eingesetzt.

Die Variante ohne jegliche zusätzlichen Sequenzen (Variante 1 als Hilfsenzym) wurde ebenfalls getestet und führte in der gekoppelten Reaktion mit MenB zur Produktbildung. Es konnten jedoch keine sichtlichen Vorteile für die „ungetaggte“ Variante gefunden werden, weiterhin wies Variante 1 eine geringere Reinheit auf, was die Bestimmung der Konzentration des eingesetzten Enzyms zusätzlich erschwerte. Daher fiel die Entscheidung zugunsten des besser verfügbaren Enzyms His₆-EcMenE (Variante 3).

Mit dem nun vorliegenden Beweis der grundsätzlichen Durchführbarkeit des Enzym-Tests richteten sich die folgenden Versuche nur noch auf das eigentliche pflanzliche Zielprotein DHNS, da EcMenB und dessen Inhibition durch MOCB-CoA schon literaturbekannt sind.

VI.1.2.8. Aufnahme der Enzymkinetik von EcMenE-DHNS

Zur Aufnahme der Enzymkinetik wurden His₆-EcMenE und DHNS in einem Verhältnis von 5 : 1 (20 µM : 4 µM) verwendet (Reaktionsbedingungen: Tabelle 9) . In dieser Konstellation wurde die Reaktionsgeschwindigkeit mittels der Produktbildungsrate (Änderung der Absorption bei 392 nm) bei variierenden Substratkonzentrationen (OSB) gemessen. Hierbei wurde ausschließlich die lineare Phase/Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion verwendet, da in diesem Zustand keine Substratlimitierung bzw. Produktinhibierung vorliegt. Es handelt sich um eine Reaktion erster Ordnung (die Reaktionsgeschwindigkeit ist proportional zur Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes). Eine graphische Auftragung dieser Daten findet sich beispielhaft für je eine Substratkonzentration in Abbildung 42; zur Charakterisierung der Kinetik erfolgte die Messung in Triplets (Daten im Anhang).

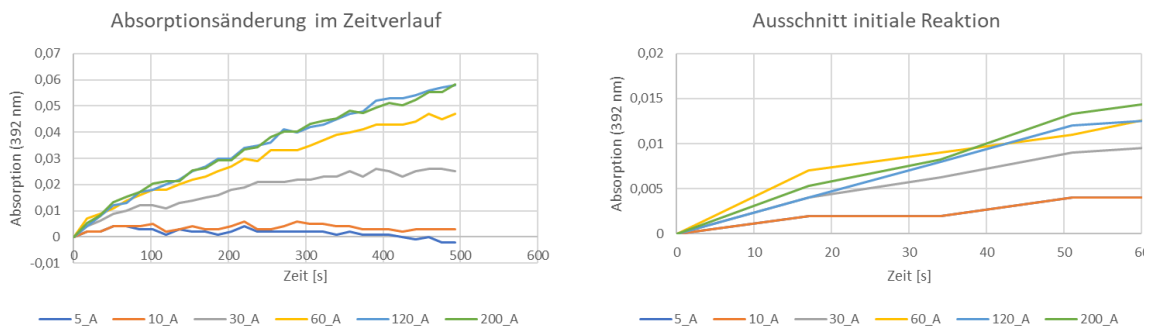


Abbildung 42

Änderung der Absorption bei 392 nm im Verlauf der Zeit sowie bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen;

Ziffer: Substratkonzentration (5 µM; 10 µM; 30 µM; 60 µM; 120 µM; 200 µM); Buchstabe: Reihe A von C (Durchführung in Triplets)

Abszisse: Zeit; Ordinate: Absorption

Die gekoppelte Reaktion von His₆-EcMenE und DHNS wurde für 493 Sekunden unter stetiger Messung der Absorption bei 392 nm durchgeführt, hierbei wurden sechs Substratkonzentrationen in Triplets verwendet. Um lediglich die initiale Reaktion zu detektieren erfolgte die Ermittlung der Reaktionsgeschwindigkeit maximal über die ersten 51 Sekunden um ein lineares Verhalten zur Grundlage zu haben.

Wie aus der Auftragung zu entnehmen ist, flacht die durch die Steigung der Kurve illustrierte Reaktionsgeschwindigkeit nach 60 Sekunden ab (Abbildung 42; links). Die Ermittlung der Geschwindigkeit der initialen Reaktion erfolgte jeweils einzeln pro Substratkonzentration und umfasste maximal eine Zeitspanne von 51 Sekunden (Abbildung 42; rechts).

Mittels des Lambert-Beer'schen Gesetzes (Formel 1) ist es möglich, die Absorptionsänderung in eine Konzentrationsänderung des Produkts umzuwandeln.

$$E_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} * c * d \quad (1)$$

$$\text{mit: } d = 1 \text{ cm; } DHNA - CoA_{\epsilon_{392nm}} = 4 * 10^3 \text{ Mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Die folgenden Abbildungen (Abbildung 43, Abbildung 44) zeigen zwei unterschiedliche Auftragungen der so erhaltenen Daten.

In Abbildung 43 ist eine direkt-lineare Enzymkinetik nach Michaelis-Menten zu sehen. Hierbei beschreibt die Sättigungshyperbel die Umsatzgeschwindigkeit (v) als Funktion der Substratkonzentration ($[S]$) mit der Formel (2).

$$v_0 = \frac{v_{max} * [S]}{K_m + [S]} \quad (2)$$

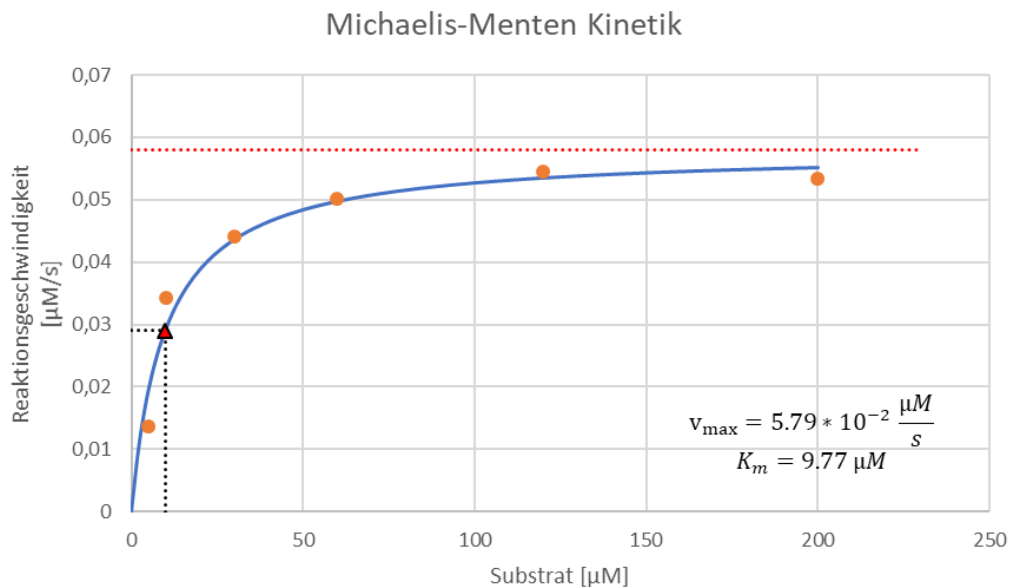


Abbildung 43

Direkt-lineare Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit zur Substratkonzentration; Beschreibung des Verhältnisses von Reaktionsgeschwindigkeit (initiale Reaktion) zur Substratkonzentration (Datenpunkte in orange), mittels Michaelis-Menten Kinetik (blaue Linie). Mit steigender Substratkonzentration nähert sich die Reaktionsgeschwindigkeit ihrem Maximum (v_{max} , rote Linie gestrichelt) asymptotisch an. Die Michaelis-Menten Konstante K_m ist als Substratkonzentration bei $\frac{1}{2} v_{max}$ definiert, sie gibt somit die Konzentration an, bei der die Hälfte des aktiven Enzyms in einem Enzym-Substratkomplex gebunden ist (dargestellt durch rotes Dreieck).

Wie aus dieser Auftragung zu erkennen, steigt die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Substratkonzentration an, wobei schon ab einer Substratkonzentration von $10 \mu\text{M}$ ein Abflachen der Steigung zu beobachten ist. Ab einer OSB-Konzentration von $80 \mu\text{M}$ wird ein Plateau erreicht, dass sich asymptotisch an die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (v_{max} ; dargestellt als rote gestrichelte Linie) annähert. Die Kinetik der gekoppelten Reaktion folgt somit einem Michaelis-Menten Verhalten.

Die Ermittlung der enzymkinetischen Parameter (v_{max} : maximale Reaktionsgeschwindigkeit; K_m : Michaelis-Menten Konstante [Substratkonzentration bei $\frac{1}{2} v_{max}$]) kann entweder durch eine

graphische Auswertung erfolgen oder mittels nichtlinearer Regressionsanalyse, Letzteres kam mittels des R-Pakets ‚drm‘ zur Anwendung (Skript Anhang).

Das Bestimmtheitsmaß der resultierenden Funktion ergibt sich aus dem Quotienten von erklärter Variation und Gesamtvariation (detaillierte Formeln siehe Anhang).

$$R^2 = \frac{\sum_{j=1}^n (x_j - \bar{v})^2}{\sum_{j=1}^n (v_j - \bar{v})^2} = \frac{\text{erklärte Streuung}}{\text{Gesamtstreuung}} \quad (3)$$

mit: j : Substratkonzentration v_j : Messwert; x_j : durch Funktion prognostizierter Wert;
 \bar{v} : Mittelwert der Messertwerte

Hieraus ergeben sich für diese Analyse die enzymkinetischen Parameter in Tabelle 11.

Tabelle 11

Enzymkinetische Parameter von His₆-EcMenE-DHNS durch Regressionsanalyse auf Michaelis-Menten Kinetik

PARAMETER	WERT
K_m	9,77 μM
v_{max}	$5,79 * 10^{-2} \frac{\mu\text{M}}{\text{s}}$
k_{cat}	$1,45 * 10^{-2} \frac{1}{\text{s}}$
$\frac{k_{cat}}{K_m}$	$1,48 * 10^{-3} \frac{1}{\text{s} * \mu\text{M}}$
R^2	0,86

Wie schon zuvor erwähnt, markiert die Michaelis-Menten Konstante diejenige Substratkonzentration, bei der die Hälfte der Maximalgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion erreicht ist; die Hälfte des aktiven Enzyms liegt bei dieser Konzentration in einem Enzym-Substrat-Komplex vor. Folglich dient der K_m -Wert zur Charakterisierung der Affinität zwischen Enzym und Substrat; je niedriger dieser Wert ist, desto größer ist die Affinität von Enzym und Substrat.

Die Wechselzahl beziehungsweise die molekulare Aktivität (k_{cat}), steht für die Anzahl an Substratmolekülen, die pro Sekunde in Produkt umgewandelt werden. Sie berechnet sich aus der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit (v_{max}) und der Konzentration an eingesetztem Enzym (E_0) durch Formel 4.

$$k_{cat} = \frac{v_{max}}{E_0} \quad (4)$$

Der Quotient aus k_{cat} und K_m beschreibt die katalytische Effizienz des Enzyms und setzt somit die molekulare Aktivität sowie die Affinität von Enzym zu Substrat in Relation.

Alternativ zu diesem nichtlinearen Verfahren kann der Sachverhalt ebenso durch reziproke Auftragung linearisiert werden. Wird, wie in Abbildung 44, das Invers der Umsatzgeschwindigkeit gegen das Invers der Substratkonzentration aufgetragen, so spricht man von der Lineweaver-Burk Auftragung, die durch die Formel 5 beschrieben wird.

Wie schon an der Formel zu erkennen, lassen sich hier die kritischen Parameter direkt an den Schnittpunkten von Abszisse und Ordinate ablesen.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}} \quad (5)$$

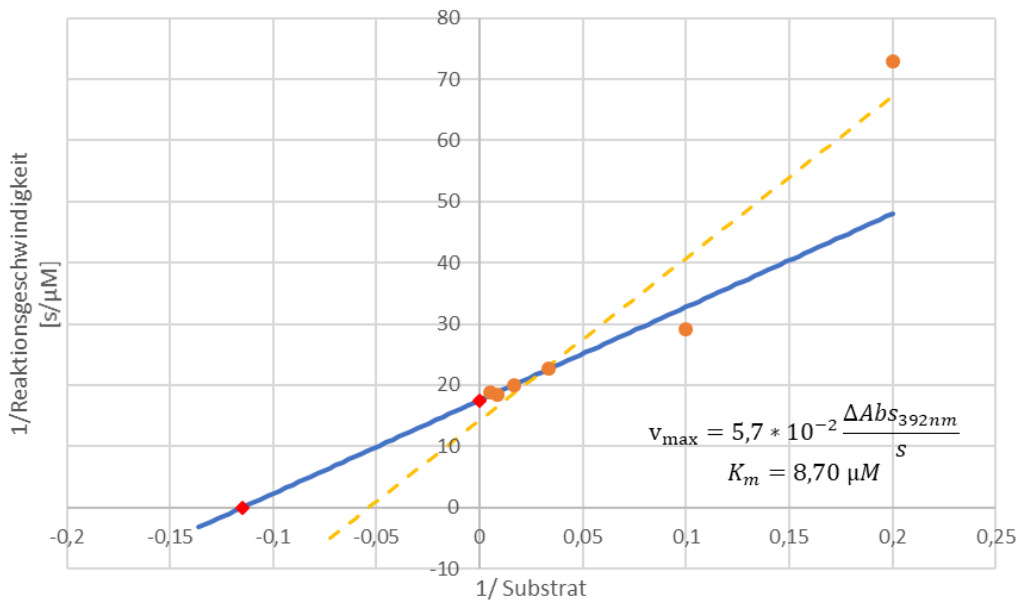


Abbildung 44

Lineweaver-Burk Auftragung der Messwerte des uninhibierten Kinetik

gelbe Linie: Berücksichtigung aller Messwerte; blaue Linie: Berücksichtigen der Messwerte bei 10 – 200 µM Substrat;

Durch doppelt reziproke Auftragung der Messwerte ergibt sie die Lineweaver-Burk Auftragung, hierbei stellen die Schnittpunkte mit Abszisse und Ordinate (rote Rauten) die Inversen der enzymkinetischen Parameter dar. $\frac{1}{v_{max}}$ wird durch den Schnittpunkt mit der

Ordinate, $\frac{-1}{K_m}$ durch den Schnittpunkt mit der Abszisse definiert

Wie aus der Auftragung zu erkennen ergibt sich aus der reziproken Auftragung eine starke Anfälligkeit für Änderungen durch Ausreißer bei geringen Substratkonzentrationen

Der Nachteil dieser Auftragung ist die Anfälligkeit gegenüber Ausreißern bei geringen Substratkonzentrationen. Wie durch die gelbe Linie in Abbildung 44 illustriert, führt die Berücksichtigung des Messwerts bei 5 μM Substrat zu deutlich anderen Schnittpunkten mit Abszisse und Ordinate, wobei der Großteil der Messwerte nicht ideal von der Funktion beschrieben wird. Vor dem Hintergrund einer gekoppelten Enzymreaktion muss die Aussagekraft geringer Substratkonzentrationen kritisch hinterfragt werden, da durch das stark limitierte Substrat der Einfluss des ersten enzymatischen Schritts auf die Kinetik des zweiten Schritts maximiert wird. Erachtet man den Messwert dieser geringsten Konzentration als Ausreißer, so lässt sich das Gros der Messwerte durch die resultierende Gerade beschreiben. Der Schnittpunkt mit der Ordinate stellt den Wert $\frac{1}{v_{max}}$ dar, der Schnittpunkt mit der Abszisse definiert $\frac{-1}{K_m}$. Somit ergeben sich folgende Parameter, die in Tabelle 12 zusammengefasst sind.

Das Bestimmtheitsmaß der Funktion beläuft sich lediglich auf ein R^2 von 0.34, da der Messwert für 5 μM Substrat bei der Ausgleichsrechnung keine Beachtung fand.

Tabelle 12
Enzymkinetische Parameter, resultierend aus Lineweaver-Burk Auftragung

PARAMETER	WERT
K_m	8,7 μM
v_{max}	$5,70 * 10^{-2} \frac{\mu\text{M}}{\text{s}}$
k_{cat}	$1,43 * 10^{-2} \frac{1}{\text{s}}$
$\frac{k_{cat}}{K_m}$	$1,64 * 10^{-3} \frac{1}{\text{s} * \mu\text{M}}$
R^2	0,34

Da die globale Ausgleichsrechnung (nicht-lineare Regressionsanalyse) insgesamt die Messwerte mit einem höheren Determinationskoeffizienten beschreibt, werden die so ermittelten Parameter für die folgenden Vergleiche verwendet.

Die beschriebene Kinetik wurde in Gegenwart von 0.2 % DMSO aufgenommen, um die Konzentration des Lösungsmittels für alle Kinetiken konstant zu halten (Inhibitor wurde in DMSO gelöst). Der Einfluss von DMSO auf die Reaktion lässt sich aus Abbildung 45 ersehen. Die Abwesenheit vom DMSO führt zu einer geringeren maximalen Geschwindigkeit

(v_{max} : $5,03 \cdot 10^{-2} \left[\frac{\mu M}{s} \right]$; graue Linie schraffiert) sowie einem erhöhten K_m -Wert (28,98 $[\mu M]$; rotes Dreieck). DMSO scheint somit die Affinität von Enzym und Substrat und die Geschwindigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit zu erhöhen.

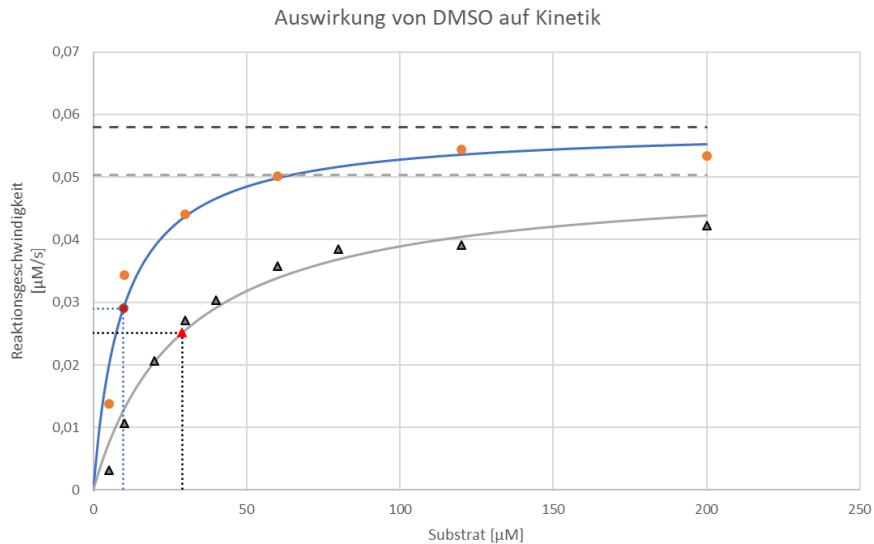


Abbildung 45

Direkt-lineare Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit zur Substratkonzentration; Grafische Darstellung der Auswirkungen von 0,2 % DMSO auf die Reaktionskinetik von DHNS

Der Vergleich, der ermittelten Kennzahlen für DHNS (mit und ohne das Lösungsmittel DMSO) mit den in der Literatur beschriebenen Parametern des Analogons EcMenB, offenbart einige Erkenntnisse (Tabelle 13).

Tabelle 13

Vergleich der enzymkinetischen Kennzahlen von DHNS (mit und ohne 0.2 % DMSO) mit EcMenB [(Li et al. 2011b)]

Parameter	DHNS (0.2 % DMSO)	DHNS	EcMenB (Li et al. 2011b)
K_m	9,77 μM	28,98 μM	25,9 \pm 3,3 μM
v_{max}	$5,79 \cdot 10^{-2} \frac{\mu M}{s}$	$5,03 \cdot 10^{-2} \frac{\mu M}{s}$	NA
k_{cat}	$1,45 \cdot 10^{-2} \frac{1}{s}$	$1,26 \cdot 10^{-2} \frac{1}{s}$	$6,2 \pm 0,2 \cdot 10^{-2} \frac{1}{s}$
$\frac{k_{cat}}{K_m}$	$1,48 \cdot 10^{-3} \frac{1}{s \mu M}$	$4,34 \cdot 10^{-4} \frac{1}{s \mu M}$	$2,4 \pm 0,03 \cdot 10^{-3} \frac{1}{s \mu M}$

EcMenB und DHNS weisen eine übereinstimmende Affinität gegenüber ihrem Substrat OSB-CoA auf (ausgedrückt durch den K_m -Wert). Durch Zusetzen von 0.2 % DMSO wird diese

Affinität drastisch erhöht (Faktor ~ 3). Bezüglich der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit (v_{\max}) bewirkt der Zusatz des Lösungsmittels nur eine geringe Änderung. Der Vergleich der molekularen Aktivität (k_{cat}) von DHNS und EcMenB zeigt, dass das *E. coli* Enzym bis zu fünfmal so viel Substrat pro Sekunde umsetzen kann wie das Analogon von *A. thaliana*. Die Quotienten von k_{cat} und K_m indes, ähneln sich, beim Vergleich von EcMenB und DHNS (0.2 % DMSO), deren katalytische Effizienz ist somit ähnlich.

VI.1.2.9. Aufnahme der Inhibitionskinetik von MOCB im System EcMenE-DHNS

Da es sich laut Literatur bei MOCB um ein sogenanntes Prodrug handelt, war es zur Aufnahme der Inhibitionskinetiken nötig den Inhibitor MOCB durch Addition von CoA an die C-C-Doppelbindung zu aktivieren (Li et al. 2011c). Das Vorgehen orientierte sich hierbei an der von Matarlo et al. beschriebenen Methodik und wurde von einem Kooperationspartner (Dr. Jared Freeman) durchgeführt (Matarlo et al. 2016).

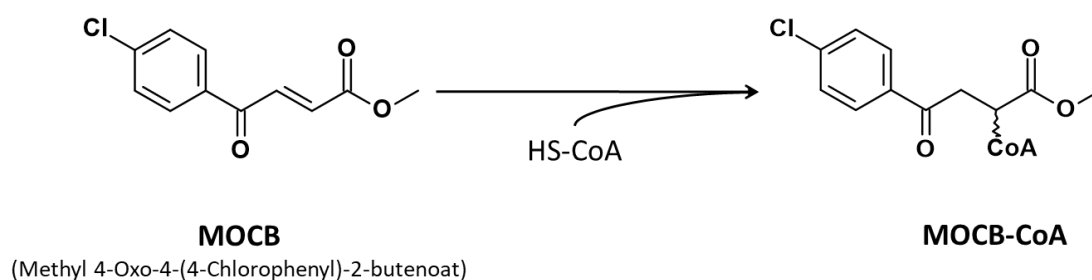


Abbildung 46

Schematische Darstellung der Aktivierung von MOCB durch CoA

Die Inhibitionskinetik von DHNS in Gegenwart aufzeigender Konzentrationen des aktivierten Inhibitors MOCB-CoA wurde über einen Zeitraum von 8 min 13 sec aufgenommen. Hierbei wurden erneut die Triplets der Substrat- und Inhibitor-Konzentrationen einzeln gesichtet, um lediglich die lineare Phase der Reaktion zu beschreiben.

Die zugrundeliegenden Messwerte sowie die daraus ermittelten Werte für die Reaktionsgeschwindigkeit finden sich im Anhang.

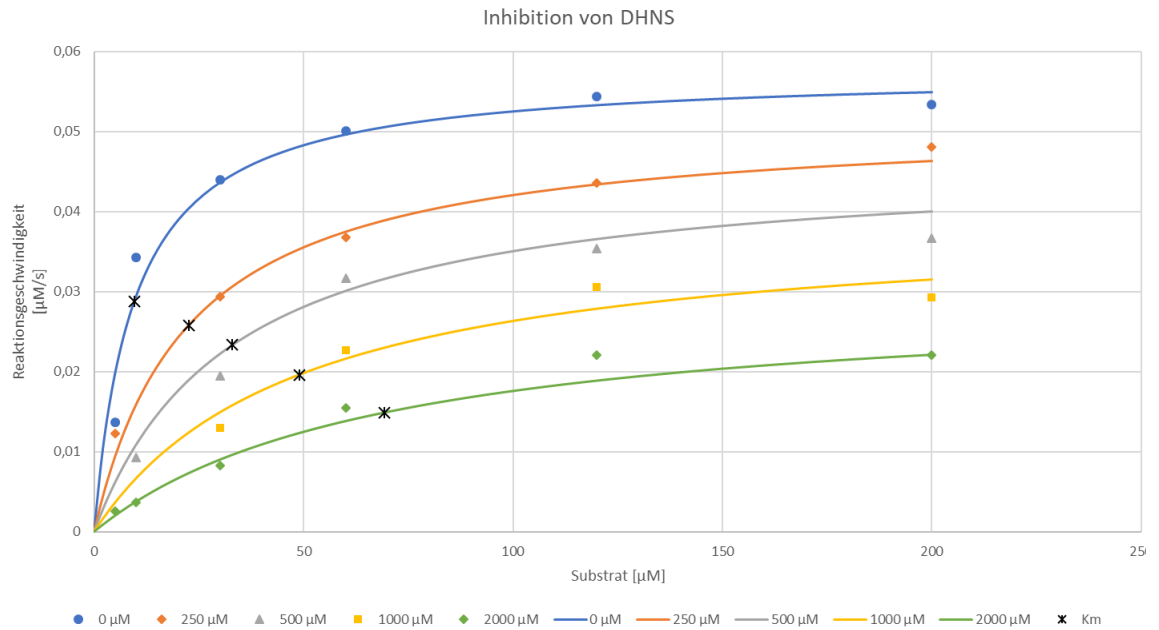


Abbildung 47

Direkte Auftragung der Messwerte der Inhibitionskinetiken sowie der jeweiligen Regressionsfunktionen

Abszisse: Substratkonzentration; Ordinate: Reaktionsgeschwindigkeit; geometrische Form: Messwert; Linie: Regressionsfunktion; Asterisk: K_m

Abbildung 47 stellt die Ergebnisse der Inhibitionsversuche da. Hierbei illustrieren die Datenpunkte die zugrundeliegenden Messwerte der Versuche, die Linien spiegeln die Ergebnisse der auf ihnen fußenden Regressionsanalyse wider. Die Berechnung der enzymkinetischen Parameter erfolgte mit Hilfe des Software-Programmes „Prism 8“ (Fa. Graphpad) durch nichtlineare Regressionsanalyse unter Berücksichtigung der gesamten Daten. Hierdurch ergaben sich leichte Änderungen in Bezug auf K_m und v_{max} für die „nicht-inhibierte“ Kinetik.

Wie der Abbildung (Abbildung 47) zu entnehmen ist, sinkt in Gegenwart des Inhibitors sowohl die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (v_{max}) als auch die Bindungsaffinität von Enzym zu Substrat (der Wert für K_m nimmt zu (Asterisk in der Graphik)). Dieses Verhalten ist atypisch für die bekannten Inhibitionsmodi (Tabelle 14).

Man unterscheidet hierbei zwischen drei reversiblen Inhibitionsmodi:

- **Kompetitiv:** Inhibitor und Substrat konkurrieren um die aktive Tasche des (freien) Enzyms; der Inhibitor blockiert die Bindungsstelle im aktiven Zentrum und kann mit steigender Substratkonzentration verdrängt werden. Da zum Erreichen der halbmaximalen Reaktionsgeschwindigkeit mehr Substrat nötig ist, steigt K_m . Demgegenüber bleibt v_{max} nicht beeinflusst, da der Inhibitor verdrängt werden kann.

- Nicht-Kompetitiv: Inhibitor und Substrat konkurrieren nicht um die Bindestelle im aktiven Zentrum. Der Inhibitor bindet das (freie) Enzym an andere Stelle und führt dadurch zu einer strukturellen Änderung, die eine Substratbindung erschwert/verhindert. Folglich verringert sich die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (v_{max}), die Affinität (ausgedrückt durch K_m) bleibt indes unbeeinflusst.
- Unkompetitiv: Der Inhibitor bindet den Enzym-Substrat-Komplex (nicht im aktiven Zentrum) und führt hierbei zu einer Konformationsänderung, die es dem Substrat beziehungsweise Produkt erschwert den Komplex zu verlassen. Somit wird die Konzentration an verfügbaren Enzym-Substrat-Komplexen global verringert. Dies führt einerseits zu einer Verminderung in v_{max} und andererseits zu einem geringeren K_m -Wert, da sich die Affinität des Enzyms zum Substrat erhöht.

Tabelle 14

Übersichtstabelle Modi der reversiblen Inhibition

Modus	K_m	v_{max}	Zur mathematischen Beschreibung dieser
Kompetitiv	Erhöht	Unverändert	Ergebnisse kann daher keine der zweckbestimmten Gleichungen verwendet werden. Stattdessen muss eine allgemeinere Gleichung gewählt werden, die durch
Nicht-Kompetitiv	Unverändert	Verringert	
Unkompetitiv	verringert	verringert	

Einführung einer weiteren Variable (α) alle Modi der reversiblen Inhibition abdeckt (Formel 6; (Copeland 2005)); man spricht hierbei von einer „Mixed-Model-Inhibition“.

$$v_0 = \frac{v_{max}^{app} * [S]}{K_m^{app} + [S]} \quad (6)$$

$$\text{mit: } v_{max}^{app} = v_{max}: \text{apparent} = \frac{v_{max}}{1 + \frac{[I]}{K_i * \alpha}}$$

$$\text{mit: } K_m^{app} = K_m: \text{apparent} = K_m * \frac{1 + \frac{[I]}{K_i}}{1 + \frac{[I]}{K_i * \alpha}}$$

α gibt hierbei Informationen über den zugrundeliegenden Mechanismus der Inhibition an; α spiegelt den Grad der durch den Inhibitor induzierten Affinitätsänderung wider. Ändert die Bindung des Inhibitors nichts an der Affinität von Enzym zu Inhibitor ($\alpha \approx 1$), handelt es sich um eine nicht-kompetitive Inhibition. Induziert die Bindung des Inhibitors eine größere Affinität von Enzym zu Inhibitor ($0 \neq \alpha \ll 1$), so handelt es sich um eine unkompetitive Inhibition. Ein großer Wert für α ($1 \ll \alpha \rightarrow \infty$) spiegelt somit eine Verringerung der

Bindungsaffinität wider; die Bindung des Inhibitors verhindert die Bindung des Substrats, es liegt eine kompetitive Inhibition vor.

Die so ermittelten enzymkinetischen Parameter sind in Tabelle 15 zu finden. Es wurde eine globale Regressionsanalyse durchgeführt, somit wurden die Messwerte jeder Inhibitor-Konzentration (0 μM – 200 μM) für die Ermittlung von K_m , v_{max} sowie α und K_i verwendet.

Tabelle 15

Enzymkinetische Parameter der Reaktion (inhibiert und nicht inhibiert) nach Auswertung durch Prism 8 unter Verwendung der Einstellung: Mixed-Model-Inhibition

PARAMETER	WERT
K_m	9,6 μM
v_{max}	$5,76 * 10^{-2} \frac{\mu\text{M}}{\text{s}}$
K_i	154,3 μM
α	13,89
R^2	0,98

Der Vergleich der enzymkinetischen Parameter (Tabelle 11, Tabelle 15) offenbart leichte Abweichungen in den Werten von K_m und v_{max} . Diese sind damit zu erklären, dass zum einen zwei unterschiedliche Programmpakete für die Analysen verwendet wurden (Tabelle 11: ‚drm‘, R; Tabelle 15: Prism8, GraphPad), zum anderen dadurch, dass in die Werte von Tabelle 15 eine größere Anzahl (26) von Datenpunkten Eingang hielten.

Die Werte für K_i und α beschreiben den Modus der Inhibition näher. K_i stellt hierbei, analog zu K_m , die Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes dar. Die Affinität des Enzyms zum Inhibitor ist somit umso größer, je kleiner der Wert von K_i ist. K_i entspricht der Inhibitor-Konzentration, bei der die apparente Michaelis-Menten-Konstante doppelt so groß ist wie die Michaelis-Menten-Konstante der ungehemmten Reaktion ($K_m^{\text{app}} = 2 K_m$), beziehungsweise der Inhibitor-Konzentration, bei der die Maximalgeschwindigkeit der gehemmten Reaktion halb so groß ist wie die der ungehemmten ($2 v_{\text{max}}^{\text{app}} = v_{\text{max}}$).

Unter Berücksichtigung von α kann bei der Inhibition durch MOCB-CoA von einer hauptsächlich kompetitiven Inhibition ausgegangen werden. α ist mit einem Wert von 13,89 deutlich größer als 1, somit tendiert der Mechanismus der Inhibition in Richtung der

kompetitiven Hemmung. Diese Annahme wird ebenfalls durch die Lineweaver-Burk-Auftragung der Inhibitionskinetik gestützt.

Die Trendlinien schneiden die Ordinate an fast übereinstimmender Stelle, somit ist v_{\max} der Reaktionen ähnlich.

Der errechnete K_i -Wert ($154,3 \mu\text{M}$) charakterisiert MOCB-CoA für DHNS als relativ schwachen Inhibitor. Weiterhin war die komplette Unterbindung der enzymatischen Reaktion durch ausreichende Gabe des Inhibitors nicht möglich. Selbst bei einer Wirkstoffkonzentration von $2.000 \mu\text{M}$ (2 mM) konnte enzymatische Aktivität festgestellt werden. Infolgedessen war es nicht möglich, den IC_{50} -Wert (halbmaximale inhibitorische Konzentration) zu ermitteln.

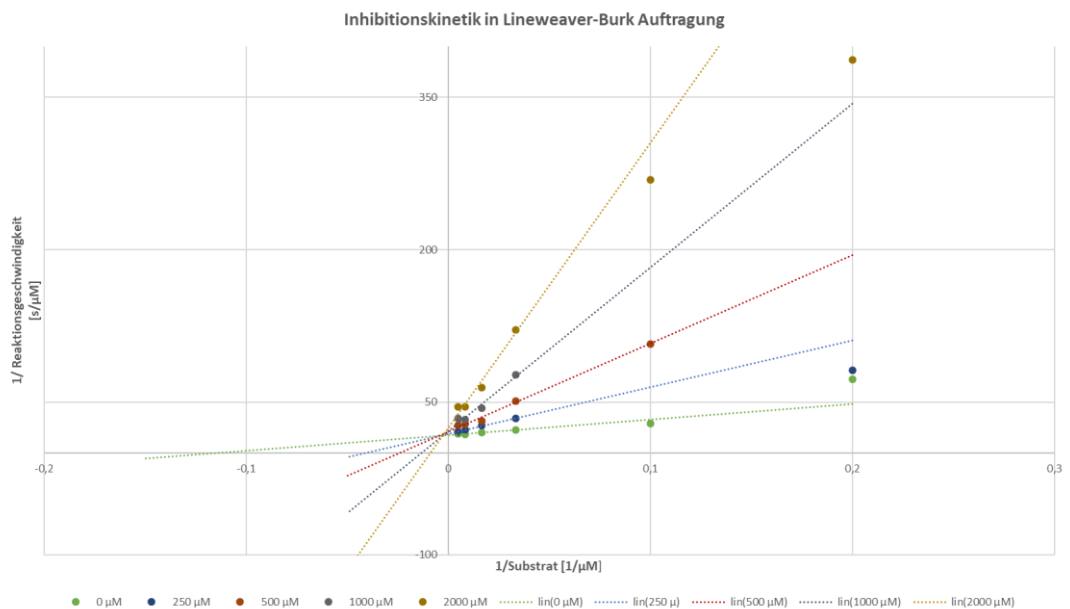


Abbildung 48

Inhibitionskinetik in Lineweaver-Burk Auftragung

Die Trendlinien der Messwerte schneiden die Ordinate bei 21 ± 3 , während die Schnittpunkte mit der Abszisse weiter gestrent sind.

Dieser Kurvenverlauf gleicht, dem für einen kompetitiven Inhibitor erwarteten Verlauf.

Für das Berechnen der Trendlinien wurden, wie schon zuvor bei der ungebemten Reaktion, die geringste Substratkonzentrationen nicht beachtet.

Als Schlussfolgerung kann, auf Grundlage dieser Ergebnisse MOCB-CoA dennoch als Inhibitor der von DHNS katalysierten Reaktion identifiziert werden. Weiterhin lieferten die mathematische Beschreibung mittels Regressionsanalyse sowie die Lineweaver-Burk Auftragung Indizien, die eine hauptsächlich kompetitive Inhibition als den wahrscheinlichsten Mechanismus nahelegen. Dieser Befund erscheint vor dem Hintergrund der strukturellen Ähnlichkeit von Substrat (OSB-CoA) und Inhibitor (MOCB-CoA) plausibel, da kompetitive

Inhibitoren oftmals strukturelle Analoga zum eigentlichen Substrat darstellen und somit als alternatives Substrat fungieren können.

VI.1.3 Genetische Validierung – Überexpression und *Knockdown*

Einen weiteren essenziellen Baustein der Validierung stellt die genetische Validierung dar. Hierbei wurden vier verschiedene Konstrukte erstellt, deren Zweck es ist, den Einfluss einer Überexpression oder eines Herunterregulierens des betreffenden Gens auf den Gesamtorganismus zu ergründen.

VI.1.3.1. Überexpressionslinie für *DHNS* (At1g60550)

In einem ersten Schritt wurde die für das Protein codierende Sequenz von *DHNS* (At1g60550) aus cDNA mittels PCR gewonnen.

Daraufhin erstellte man mittels Golden-Gate-Cloning eine Überexpressionslinie (OX), die die codierende Sequenz in Volllänge innerhalb einer Ubiquitin-10 Promoter-Kassette aufweist.

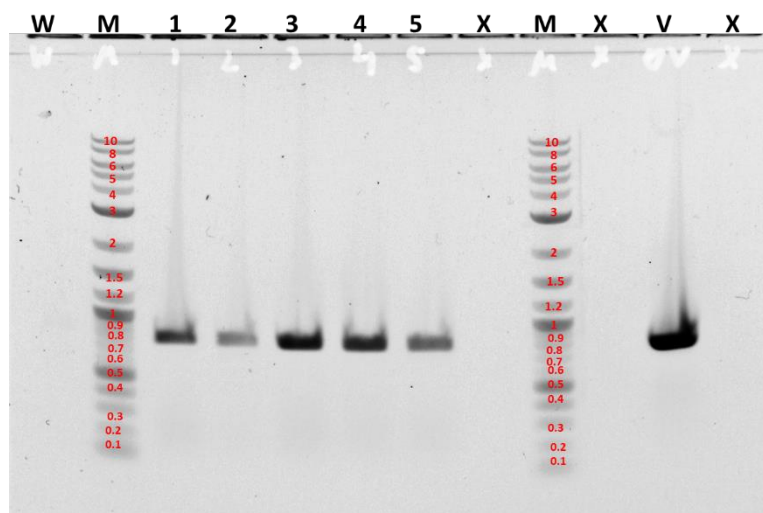


Abbildung 49

Agarose-Gel der PCR zur Selektion der Überexpressionslinie;
Größe erwartetes PCR-Fragment: 795 bp [in Kanamycin-Resistenz]; W: Wildtyp;
Nummer: Transformante; V: Vektor (Positivkontrolle); M: Marker (Banden in kbp)

Nach Transformation von Pflanzen mittels Floral-Dipping Verfahren wurden die resultierenden Samen auf zuckerfreiem $\frac{1}{2}$ MS-Medium (8 g/l Phytoblend) + 50 μ M Kanamycin ausgelegt und selektiert. Die so selektierten, resistenten Pflanzen wurden weiterhin mittels PCR auf die jeweilige gDNS (genomische DNS)

einer Überprüfung der Insertion der Expressions-Kassette in das Genom unterzogen (Abbildung 49). Wie dem Agarose-Gel zu entnehmen, konnte für jede der fünf selektierten Pflanzen die Kanamycin-Resistenz in der gDNS nachgewiesen werden.

Diese Pflanzen, die die T₁-Generation darstellen, wurden auf Erde überführt, um so die Samen für die nächste Generation [T₂-Generation] zu erhalten.

Für die folgenden Versuche wurden nur die Samen einer T₂-Pflanze verwendet. Um diese besser zu charakterisieren und die Möglichkeit multipler Insertionen des Konstrukts zu ergründen, erfolgte ein weiterer Selektionsversuch gegen Kanamycin. Das Ergebnis dieser Selektion ist in Abbildung 50 abgebildet. Pro Genotyp (Wildtyp und Überexpressionslinie) wurden 40 Samen ausgelegt. Wie der Abbildung zu entnehmen ist, lief nur eine einzige Pflanze im Bereich des Wildtyps auf (linke Hälfte). Im Gegensatz dazu sind bei der Überexpressionslinie für 25 der 40 Samen Sprösslinge zu sehen (rechte Hälfte). Dies deutet darauf hin, dass für diese Linie nur einfache Insertionen stattgefunden haben sollten, da das Verhältnis 25/15 (überlebend/tot) gegen das angenommene Spaltungsverhältnis von 3/1 tendiert. Daraus könnte – spekulativ – weiterhin abgeleitet werden, dass es sich bei der Hälfte der Samen um Heterozygote handelt und in einem Viertel der Samen die Insertion im homozygoten Genotyp vorliegen sollte (das verbleibende Viertel ist somit homozygot „Wildtyp“).

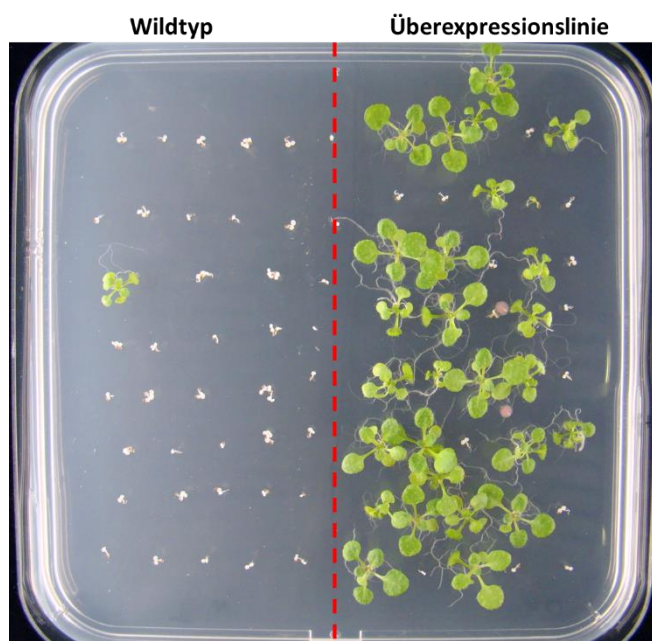


Abbildung 50
Selektionsversuch zur besseren Charakterisierung des Spaltungsverhaltens der T₂-Generation; Selektion über 50 µM Kanamycin; 40 Samen pro Genotyp

Die Samen der so charakterisierten T₂-Linie dienten daraufhin für Kultivierungsversuche in Gegenwart des Inhibitors MOCB, in verschiedenen Konzentrationen. Hierbei zeigten sich bei 20 µM MOCB erkennbare Unterschiede zwischen Wildtyp und Überexpressionslinie. Bei anderen Konzentrationen (10 µM, 30 µM, 40 µM, 50 µM) konnten keine phänotypischen Unterschiede zwischen Überexpressionslinie und Wildtyp identifiziert werden.

Die in Abbildung 51 dargestellten Pflanzen zeigen auf den Kontrollplatten (0 µM MOCB) für Wildtyp und Überexpressionslinie einen übereinstimmenden Phänotyp mit klarer Grünfärbung, einer Länge der Primärwurzeln von 5,6 cm und acht entfaltetten Blättern.

In Gegenwart des Inhibitors änderte sich der Phänotyp der Wildtyp-Pflanzen, in Übereinstimmung mit den zuvor erwähnten Ergebnissen des Versuchsteils *in-vivo* Aktivität. Die

Pflanzen weisen einen gelblicheren Farbton auf, und das Gesamtwachstum ist eingeschränkt (Wurzellänge bei ~ 4 cm; sechs entfaltete Blätter).

Auf der Platte der Überexpressionslinie weisen drei der gekeimten Pflanzen einen zum Wildtyp ähnlichen Phänotyp auf. Im Gegensatz hierzu weisen die zwei markierten Pflanzen (gelber Stern) einen deutlich grüneren Farbton und eine fortgeschrittenere Entwicklung auf. Diese Pflanzen scheinen eine erhöhte Toleranz gegenüber dem Inhibitor aufzuweisen. Wie schon im Selektionsversuch (Abbildung 50) zuvor, zeigten die Pflanzen einen segregierenden Phänotyp (Abbildung 51; 1. rechts), der mit dem erwarteten segregierenden Genotyp einer T₂-Generation übereinstimmt. Es liegt somit nahe, dass in den zwei markierten Pflanzen die Insertion im homozygoten Genotyp vorliegt.

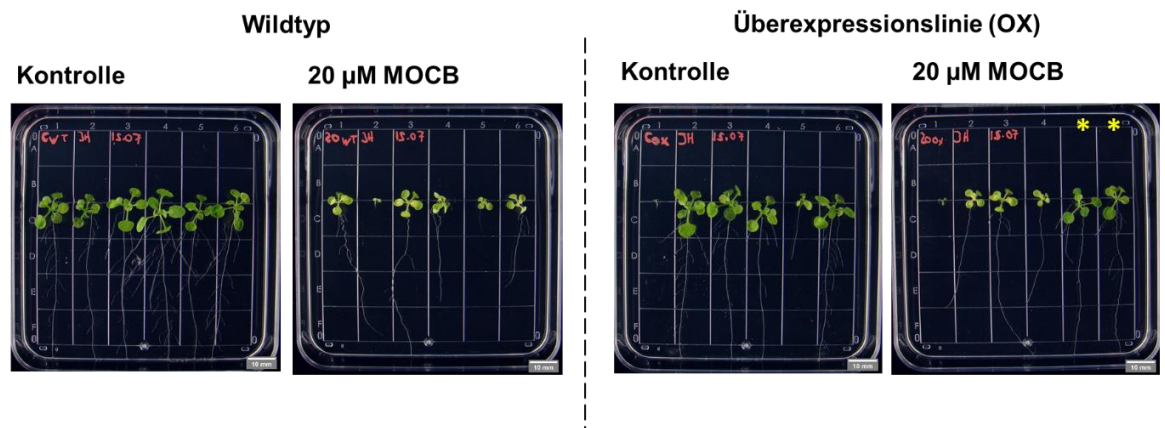


Abbildung 51

Arabidopsis-pflanzen (Wildtyp und Überexpressionslinie [Generation T₂]) in Präsenz von 20 µM MOCB
Pflanzen wurden 14 Tage auf ½ MS-Medium in Schräglatten kultiviert. Der Inhibitor wurde in DMSO gelöst; die DMSO-Konzentration wurde konstant (0,1%) gehalten

Aus diesem Ergebnis lässt sich schlussfolgern, dass eine Überexpression des Proteins DHNS die Toleranz gegenüber dem Inhibitor MOCB erhöht.

Die solchermaßen auf mehreren Platten selektierten Pflanzen (analog zu den markierten Pflanzen aus Abbildung 51) wurden nach Abschluss des Versuchs auf Erde gesetzt, um die vermutete homozygote T₃-Generation zu erhalten.

VI.1.3.2. *Knockdown* für *DHNS* (At1g60550) mittels RNSi-Effekt

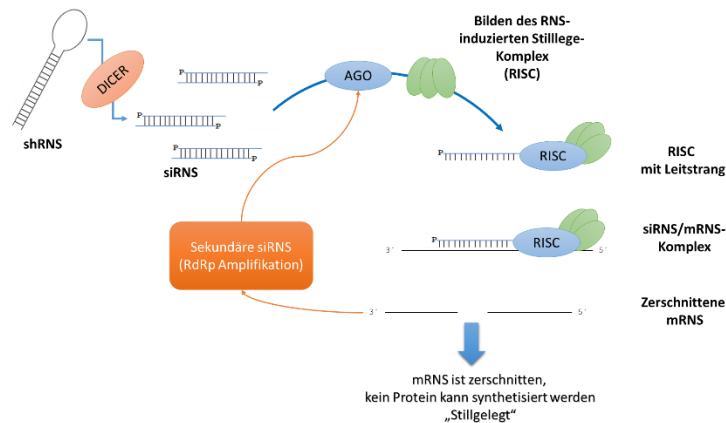


Abbildung 52

Schematischer Ablauf der durch RNS-Interferenz vermittelten Gen-Stillegung [nach (Fire et al. 1998; Majumdar, Rajasekaran & Cary 2017)]
shRNS: doppelsträngige RNS in Haarnadelstruktur; *DICER*: RNase die kurze dsRNS erzeugt; *siRNS*: kurze interferierende RNS; *AGO*: Argonautprotein;
RISC: RNS-induzierter Stilllege-Komplex (*AGO*, weitere Proteine und *siRNS*);
RdRp: RNS-abhängige RNS-Polymerase

Für das Herunterregulieren von *DHNS* (At1g60550) wurde der RNSi-Effekt genutzt, hierbei handelt es sich um eine spezifische Inaktivierung von mRNA, auch RNS-Interferenz genannt. Grundlage dieses Effekts sind kleine RNS-Fragmente mit einer Länge zwischen 20 – 28 Nukleotiden, die durch Bindung an den Riboprotein-Komplex RISC

(RNS-induzierter

Stilllege-Komplex; eng. *RNA induced silencing complex*) zum Zerschneiden von mRNA mit komplementären Sequenzen führen. Man spricht hierbei von siRNS (eng. *short interfering*, kurze interferierende RNS) die als Leitstrang des Prozesses dienen. Zum Erreichen der Interferenz werden für die betreffende mRNA in der Zelle passgenaue doppelsträngige RNS (dsRNS) erzeugt. Diese dsRNS können hierbei in verschiedenen Strukturformen vorliegen, eine der häufigsten Varianten ist die sogenannte Haarnadelstruktur (shRNS; *short hairpin*), bei der der Vorläufer der siRNS Sequenz (*sense* und *antisense*) innerhalb eines Transkripts, durch ein Intron getrennt, vorliegt. Bei der Transkription lagern sich *sense* und *antisense* aneinander und formen so die namensgebende Struktur. Die RNase Dicer erkennt diese dsRNS und zerschneidet sie, wobei die siRNS entstehen. Der schematische Ablauf der Gen-Stillegung durch den RNSi-Effekt ist in Abbildung 52 dargestellt. Im Zuge der Stilllegung kommt es zu einem weiteren Effekt, dem Auftreten sogenannter sekundärer siRNS, die aus den zerschnittenen Fragmenten der mRNA durch RNS-abhängige RNS-Polymerasen (RdRp; eng. *RNA-dependent RNA polymerase*) amplifiziert werden und somit den Effekt weitergehend steigern.

Da das Ausmaß des induzierten Effekts stark von der verwendeten Sequenz für die shRNS abhängig ist, wurden drei Konstrukte erstellt, deren Sequenzen (je ~300 bp) das Gros der resultierenden mRNA für *dhns* (At1g60550) abdecken.

Transformation und Selektion erfolgten nach demselben Prinzip und Ablauf, wie zuvor für die Überexpressionslinie beschrieben. So wurden für jede der drei RNSi-Linien Pflanzen der T₁-Generation kultiviert um so Samen für eine T₂-Generation zu erhalten.

Die Samen der T₂-Generationen (die laut Spaltungsregel zur Hälfte heterozygot und zu je einem Viertel homozygot transgen bzw. nicht-transgen vorliegen müssten) wurden für Selektionsversuche in Gegenwart des Inhibitors MOCB verwendet. Laut Literatur sollte der RNSi-Effekt nicht nur im homozygot transgenen, sondern auch im heterozygoten Genotyp zum Tragen kommen (somit $\frac{3}{4}$ der Samen betreffen).

Die Arbeitshypothese dieses Versuchs besagte, dass der RNSi-Effekt die transgenen Pflanzen anfälliger/empfindlicher gegenüber dem Inhibitor macht, und sich somit phänotypische Effekte schon bei geringeren Wirkstoffdosen einstellen.

Diese Selektionsversuche in Gegenwart von MOCB konnten jedoch keine klaren Effekte oder Tendenzen im Sinne dieser Vermutung aufzeigen, denn RNSi-Linie und Wildtyp wiesen einen übereinstimmenden Phänotyp auf.

Möglicherweise entsprach die Zusammensetzung der Samen nicht der erwarteten Verteilung ($\frac{1}{2}$ heterozygot : $\frac{1}{4}$ homozygot transgen : $\frac{1}{4}$ homozygot nicht-transgen), denn ein starker RNSi-Effekt könnte bereits auf die Samenbildung Auswirkungen gehabt haben.

Um dies zu überprüfen, wurde die Produktion des Samenpools wiederholt. Zur Analyse der Samenverteilung innerhalb der Schoten wurden für jede Pflanze Schoten vor der Abreife geerntet und für eine mikroskopische Analyse entfärbt und durchsichtig gemacht.

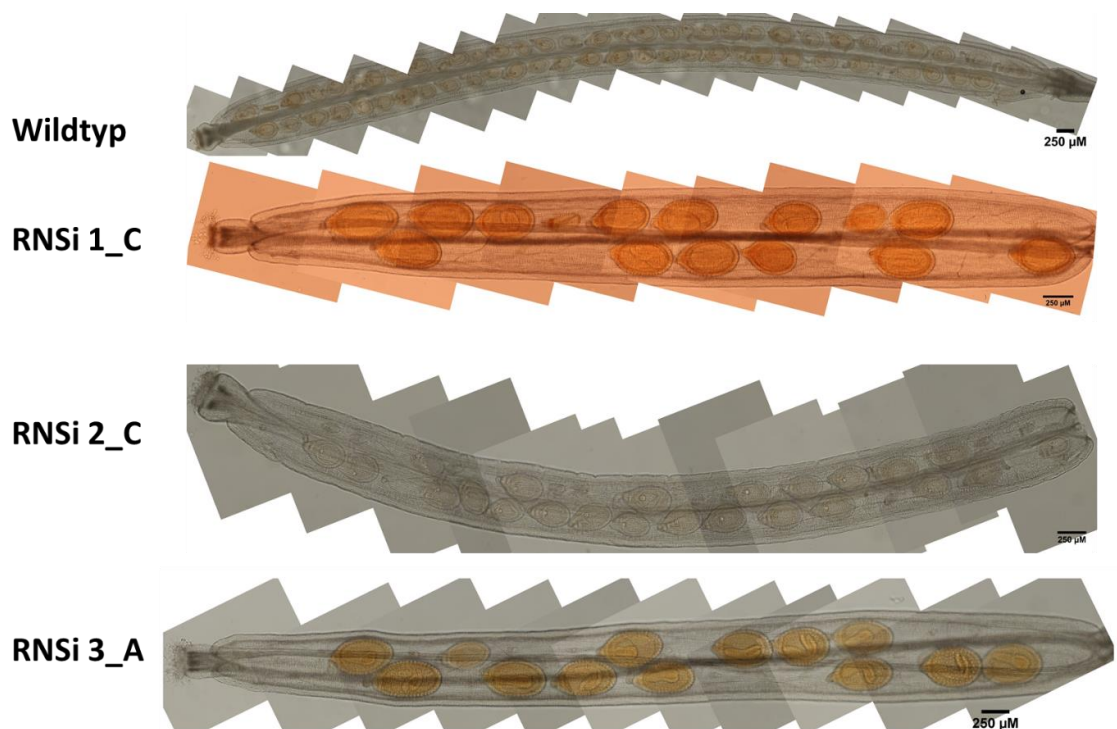


Abbildung 53

*Samenverteilung in Schoten von Arabidopsis thaliana, Wildtyp und RNSi-Linien
10X Vergrößerung an Durchlichtmikroskop; schwarzer Balken: 250 µm*

Wie in Abbildung 53 zu erkennen, liegen die Samen innerhalb der Schote paarig in zwei Reihen vor. Die beispielhafte Schote des Wildtyps zeigt hierbei den Normalzustand, jede mögliche Position wird von einem Samenkorn besetzt. Im Gegensatz hierzu sind innerhalb der Schoten der Transformanten (RNSi-Linien) Leerstellen zu erkennen. Ausgehend von einer gleichmäßigen Verteilung der Samen innerhalb der Schote (mit gleicher Größe der Samen) kann für die Schoten der Linien RNSi 1 und RNSi 3 von jeweils 24 potentiellen Samen, bei Linie RNSi 2 von 38 Samen ausgegangen werden. Demgegenüber stehen acht (RNSi 1), zehn (RNSi 3) beziehungsweise neun (RNSi 2) Leerstellen innerhalb der Schoten. Die Transformation der Pflanzen mit den RNSi-Konstrukten scheint daher die Samenbildung zu beeinflussen.

Tabelle 16 listet die Anzahl an Leerstellen sowie die potenzielle Samenanzahl auf und gibt ein Verhältnis von Leerstellen zur Gesamtanzahl an. Dieses Verhältnis bewegt sich im Mittel zwischen 21 und 34 %. In Anbetracht der Arbeitshypothese, dass der Präsenz eines RNSi-Konstrukts die Bildung der Samen beziehungsweise deren Vitalität beeinflussen kann, deutet dieses Verhältnis (ca. $\frac{1}{4}$) darauf hin, dass eine homozygote Insertion eventuell zum Abort des Embryos führt und die Samenbildung somit ausbleibt.

Tabelle 16

Auswertung Leerstellen in Schoten der RNSi-Linien

RNSi	Samenanzahl			
Linie	Pflanze	Leerstellen	(potenziell)	Verhältnis
1	A	13	30	43.33%
	B	5	30	16.67%
	C	8	24	33.33%
2	A	5	30	16.67%
	B	10	34	29.41%
	C	9	38	23.68%
3	A	10	24	41.67%
	B	4	34	11.76%
	C	4	40	10.00%

VI.1.4 In-silico Studie – Computergestütztes Einfügen des Wirkstoffs (MOCB-CoA) in das Homologie-Modell der DHNS

Neben den zuvor beschriebenen Schlüsselementen zur Validierung (*in-vivo*, *in-vitro* und genetisch) des Enzyms als potenzielles Ziel für zukünftige Herbizide, können weitere Untersuchungen diese Validierung ergänzen.

Bei dem hier verwendeten *in-silico*-Ansatz wird in eine modellierte dreidimensionale Struktur des Ziel-Enzyms der vermutete Inhibitor computergestützt eingefügt. Hierdurch kann ermittelt werden, ob der Inhibitor auf Grund seiner räumlichen Anordnung mit dem Wirkort kompatibel ist und ob dieser vom potenziellen Wirkort stabilisiert wird.

Die dreidimensionale Struktur des Enzyms wurde auf Grundlage einer Homologie-Modellierung mittels robbetta, einer sequenzbasierten Proteinstruktur-Vorhersage erstellt (Raman et al. 2009; Song et al. 2013). Hierfür wurde die Aminosäuresequenz der DHNS in das Programm eingelesen, das daraufhin nach bekannten Strukturmotiven innerhalb der Proteindatenbank suchte. Durch Sequenzhomologie wurde die bekannte Kristallstruktur von EcMenB von robbetta eigenständig ausgewählt und als Grundlage der Modellierung verwendet. Das so erzeugte Modell erreicht einen GDT-Wert von 0,82 (Abbildung 54, Abbildung 55, Globaler Distanz Test; Übereinstimmungsgrad zweier Proteinstrukturen; „Güte“ des Modells, 1: totale Übereinstimmung, 0: keine Übereinstimmung). Dieser Wert basiert auf der Übereinstimmung (total und partiell) der Aminosäuresequenzen von DHNS und EcMenB.

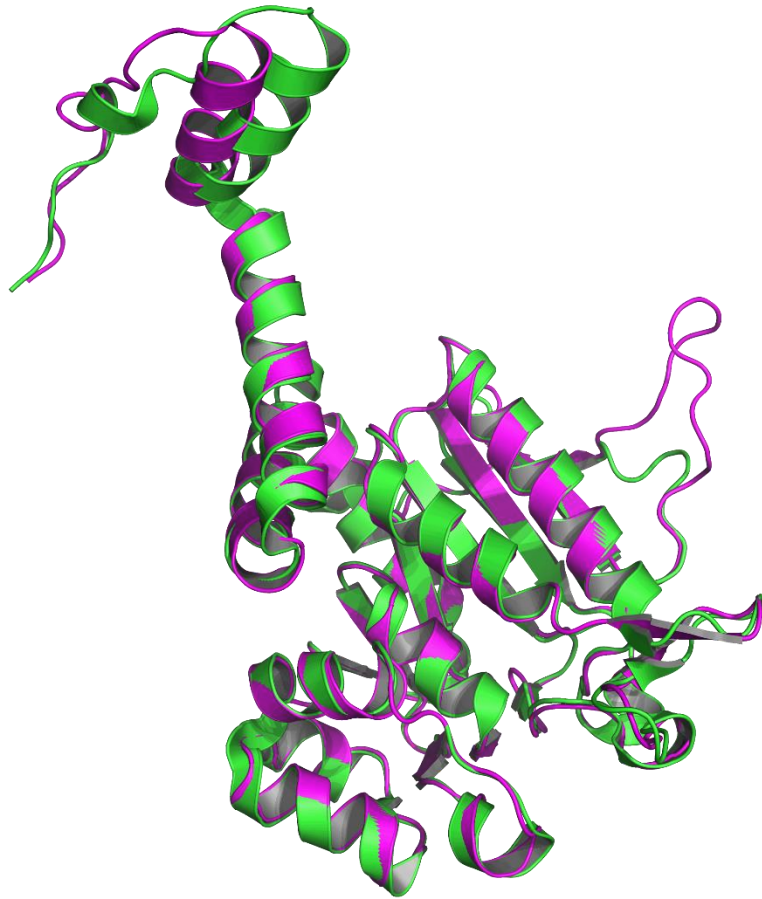


Abbildung 54

*Darstellung einer einzelnen Untereinheit des Homologie-Modells von DHNS (AS 53 - 337) basierend auf EcMenB (AS 5-285) (in Fluchtung mit EcMenB)
grün: EcMenB (3t88.pdb); magenta: DHNS*

Dieser hohe Übereinstimmungsgrad ist auch visuell in Abbildung 54, der Darstellung je eines Monomers von DHNS und EcMenB (in Fluchtung), zu erkennen. So lassen sich die Sekundärstrukturmotive (α -Helix und β -Faltblatt) nahezu gänzlich überlagern und formen somit insgesamt eine sehr ähnliche Tertiärstruktur. In Anbetracht dieser Ergebnisse lassen sich weitere Vorhersagen auf die Homologie der Quartärstruktur von DHNS und EcMenB treffen (Abbildung 55).

Wie schon zuvor durch die Aufreinigung von DHNS gezeigt (siehe Abbildung 33), liegt das Protein als Homohexamer vor. Zu diesem Ergebnis kommt auch dieses computergenerierte Modell.

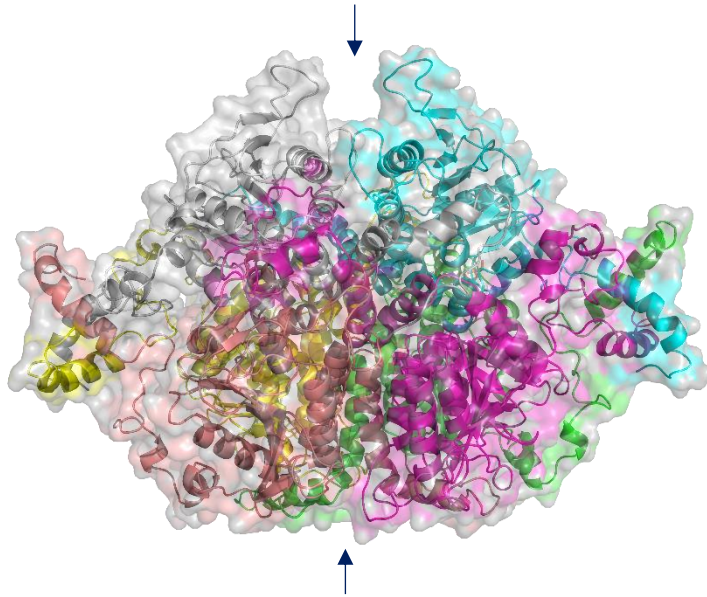


Abbildung 55

*Modelliertes Hexamer der DHNS, basierend auf Sequenzhomologie zwischen EcMenB (3t88) und DHNS
Untereinheiten farblich unterscheidbar; graue Korona: modellierte Proteinoberfläche; Pfeile: vertikale Symmetrieachse
(Li et al. 2011a)*

Abbildung 55 zeigt das modellierte Homohexamer der DHNS sowie seine Oberfläche (gräulich-transparenter Hof). Wie aus der Abbildung ersichtlich, handelt es sich hierbei um ein annähernd spiegelbildliches Dimer aus Trimeren (vertikale Symmetrieachse durch Pfeile markiert), wobei die C-Termini der einzelnen Untereinheiten die Trimer-Trimer-Oberfläche kreuzen, um als flexibler Teil im aktiven Zentrum des gegenüberliegenden Trimers zu fungieren.

In dem folgenden Schritt wurde geprüft, ob sich der Inhibitor (MOCB-CoA) in eine der aktiven Taschen des Enzyms einfügen lässt, um so die Wirkstoff-Wirkort-Beziehung weitergehend zu festigen.

Hierfür fanden neben der Darstellungssoftware „Pymol“ ebenfalls die Programme „SeeSar“ und „Maestro“ Anwendung, mit denen es möglich war, den Wirkstoff, basierend auf einem in der zuvor schon verwendeten Referenzstruktur (3t88; EcMenB) gebundenen Substrat, in die aktive Tasche der DHNS einzufügen und die Stabilisierung beziehungsweise Bindung zahlenmäßig greifbar zu machen.

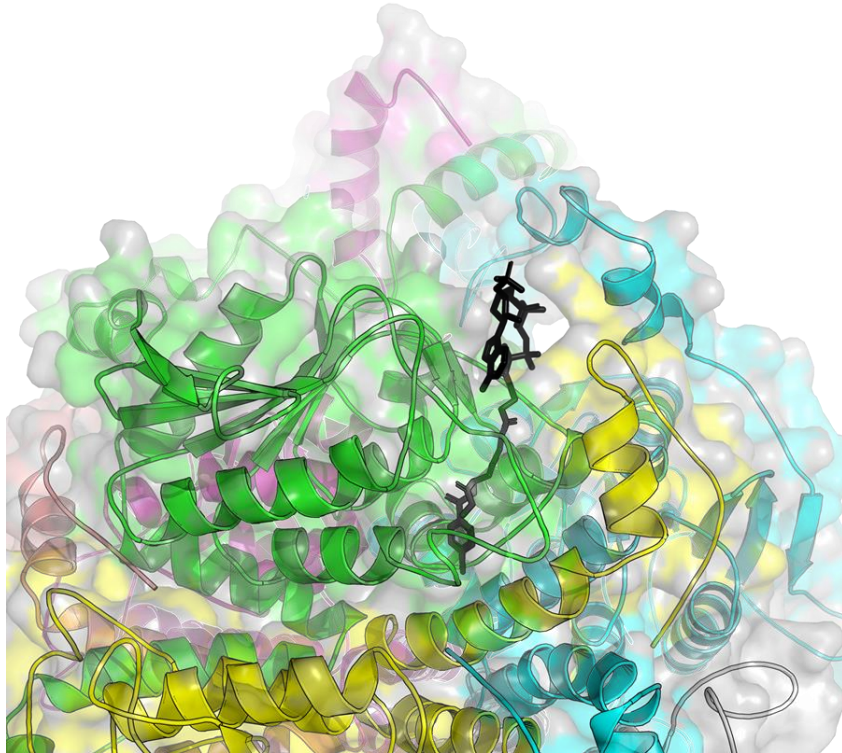


Abbildung 56

Ausschnitt aus modellierter Hexamer-Struktur der DHNS mit gebundenem Inhibitor MOCB-CoA (schwarz)
 Untereinheiten farblich unterscheidbar; graue Korona: modellierte Proteinoberfläche

Die Abbildung 56 zeigt eine Nahaufnahme des DHNS-Hexamers mit gebundenem Inhibitor MOCB-CoA. Die Ketten der A-Untereinheit (grün) und D-Untereinheit (gelb) formen hierbei die aktive Tasche, in der der Inhibitor (schwarz) gebunden ist. Wie durch die transparent-graue Oberfläche illustriert, ragt der Inhibitor mit dem MOCB-Anteil des Moleküls ins Innere des Proteins, während das Adenosin-3'phosphat an der Oberfläche des Proteins verbleibt.

Die Stabilisierung des Liganden in der aktiven Tasche erfolgt einerseits durch Wechselwirkungen mit Aminosäuren der Untereinheiten sowie durch hydrophobe Interaktion mit dem Inneren des Proteins. Abbildung 57 illustriert die Stabilisierung von MOCB-CoA. Wie der Abbildung zu entnehmen wechselwirken drei Tyrosin-Reste (180[A], 322 [D], 310 [D]) mit dem Molekül. Von diesen sind zwei Teil des C-Terminus der D-Untereinheit, während der verbleibende Rest zur A-Untereinheit gehört.

Insgesamt ergibt sich für das Docken des Inhibitors mittels der Glide-Methodik ein Wert von -5,2 , hierbei wurden für den einzufügenden Liganden alle möglichen Orientierungen, räumlichen Ausrichtungen sowie Positionierungen abgeprüft (Friesner et al. 2004). Dieser sogenannte „Glide-Score“ kann als Maßzahl für die errechnete Stärke der Stabilisierung angesehen werden und dient somit zur Beurteilung der Güte der Bindung. Die Entwickler des hierfür

verwendeten Programms („Maestro“; Fa. Schrödinger Inc) bezeichnen einen Wert von kleiner -8 als Indikator für eine gute Bindung.

Wie schon zuvor durch den in-vitro-Test aufgezeigt, handelt es sich bei MOCB-CoA um einen schwachen Inhibitor. Dieses Ergebnis wird durch den hier ermittelten Wert von -5,2 weiterhin gestützt.

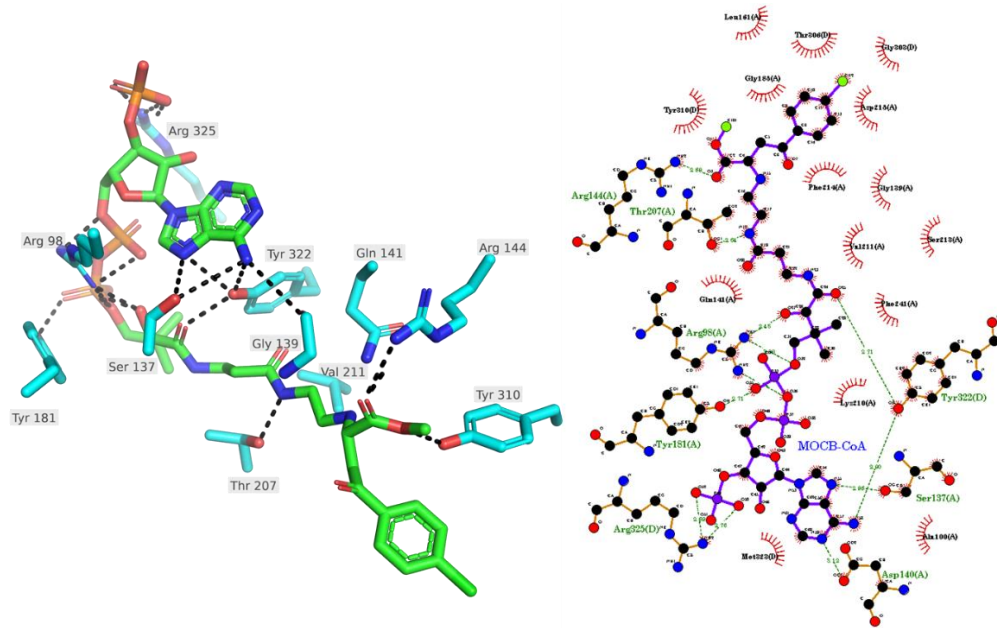


Abbildung 57

Lokalisierung und Stabilisierung von MOCB-CoA in aktivem Zentrum der DHNS (Pymol und Ligplot)

Aminosäuren mit Position (Nummer sowie Untereinheit); Hydrophile Wechselwirkungen gekennzeichnet durch gestrichelte Linie; hydrophobe Wechselwirkungen als rote Korona

VII. Teil II: Identifikation des Wirkorts von Psoromsäure

Wie schon im Bereich IV. Zielsetzung beschrieben, galt es den Wirkort der Psoromsäure, basierend auf einer Arbeitshypothese, einzugrenzen.

Zuerst wurde die Wirksamkeit *in-vivo*, anhand von Änderungen des Phänotyps überprüft. Anschließend sollten etwaige Effekte auf den Prozess des Spleißens mittels Transkriptom-Analyse bestimmt und abschließend durch RT-PCR validiert werden.

VII.1.1 Nachweis der pflanzlichen *in-vivo* Aktivität von Psoromsäure

Zur Überprüfung der Wirksamkeit von Psoromsäure im pflanzlichen System wurden *A. thaliana* Pflanzen auf wirkstoffhaltigen 1/2 MS Schrägagar-Platten kultiviert.

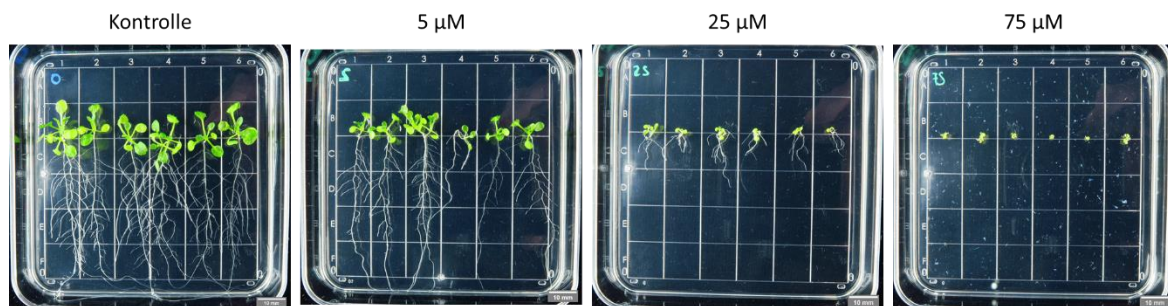


Abbildung 58

Arabidopsis-pflanzen in Präsenz von Psoromsäure in verschiedenen Konzentrationen
Pflanzen wurden für 14 Tag auf 1/2 MS-Medium in Schrägplatten kultiviert. Der Inhibitor war in DMSO gelöst, die DMSO-Konzentration (0.1 %) wurde konstant gehalten.

Die Pflanzen der Kontrollplatte weisen sechs entfaltete Blätter auf, die Wurzeln erreichen den unteren Rand der Platte und wachsen an diesem Rand entlang (Länge ~ 7,5 cm) . Die Wurzeln weisen zudem eine Vielzahl an Seitenwurzeln auf.

Mit steigender Wirkstoffkonzentration ergeben sich Änderungen im Phänotyp der Pflanzen. So kommt es bei einer Konzentration von 5 µM Psoromsäure zu einer Verzögerung in der Entwicklung betreffend das Wurzelwachstum (~ 5,5 cm , weniger Seitenwurzeln) sowie die Blätter (lediglich vier voll entfaltet). Durch Steigerung der Konzentration auf 25 µM Psoromsäure werden Wurzelwachstum und Entwicklung der Blätter weitergehend eingeschränkt. Der Phänotyp des Wurzelwachstums tendiert hierbei mehr zu einem Wachstum in die Breite anstatt in die Länge (~ 1,4 cm).

Bei einer Konzentration von 75 μM kommt es nach 14 Tagen lediglich zu einer Keimung der Pflanzen, ohne weitere Entwicklung.

Die Konzentration des Inhibitors scheint bei 75 μM oberhalb der Löslichkeitsgrenze zu liegen, da weiße Flocken innerhalb des Mediums zu erkennen sind. Diese ähneln stark dem ungelösten Reinstoff. Folglich kann keine genaue Aussage über die Konzentration des Wirkstoffs, der den Pflanzen innerhalb des Mediums tatsächlich zur Verfügung steht, getroffen werden.

Die phänotypischen Effekte des Inhibitors lassen sich allgemein mit einer verlangsamen beziehungsweise unterbundenen Entwicklung beschreiben. Hierbei weisen die Pflanzen bei 5 μM Psoromsäure weniger Seitenwurzeln auf, bei 25 μM Psoromsäure hingegen scheinen nur Seitenwurzeln vorzuliegen. Es ist keine Farbänderung im Spross zu beobachten.

Zur bestmöglichen Detektion eines Wirkungseffekts auf den Spleißvorgang wurden die Pflanzen in Flüssigkultur angezogen. Dies garantierte eine hohe Individuenzahl (Bildung von Pflanzenballen; Abbildung 59), gleiche Wachstumsbedingungen sowie Kontrollierbarkeit der Wirkstoff-Konzentration.

Im ersten Kultivierungsversuch (Pilotphase zur Überprüfung der Durchführbarkeit) zog man Pflanzen eine Woche in Gegenwart von 0.2% DMSO unter stetigem Schütteln (30 rpm) an. Daraufhin wurde das Nährmedium gewechselt, mit 10, 25, 50 und 100 μM Psoromsäure versetzt, um für weitere 24 h kultiviert zu werden. Durch die Kultivierung in Schüttelkultur konnte die Löslichkeit des Inhibitors erhöht werden; nach 10 min waren selbst bei 100 μM Psoromsäure keine Flocken mehr sichtbar.



Abbildung 59

*Pflanzenballen *A.thaliana* eine Woche in $\frac{1}{2}$ MS-Flüssigmedium (10 g/l Saccharose)*

induzieren.

Nach Ablauf der 24 h zeigte keine der Proben eine Änderung im Phänotyp. 100 μM Psoromsäure wurde als Wirkstoffkonzentration für die folgenden Versuche festgelegt (höhere Dosen aufgrund von Löslichkeit nicht möglich), um somit möglichst starke Effekte innerhalb der Pflanzen zu

VII.1.2 Transkriptom-Analyse – Identifikation von fehlgespleißten Transkripten

Das Versuchsdesign umfasste drei Zeitspannen nach Zugabe des Wirkstoffes (1 h, 6 h und 12 h). Die Proben lagen jeweils in drei biologischen Replikaten vor, weiterhin wurden zwei Kontrollgruppen inkludiert, die jeweils ebenfalls drei biologische Replikate pro Zeitpunkt darstellten. Einerseits eine Negativkontrolle (0.2 % DMSO), bei der es zu keinem Fehlspleißen kommen sollte sowie eine Positivkontrolle (5 µM Herboxidien, (AlShareef et al. 2017)), die zur Überprüfung der Auswertung sowie als Vergleich zu detektierten Effekten verwendet werden kann. Insgesamt wurden somit 27 Proben generiert.

Die Kultivierung der Pflanzen erfolgte wie im Vorversuch. Im Zuge der ersten ungehemmten Wachstumsphase wurden zur Vermeidung möglicher Standorteffekte die Kolben täglich randomisiert.

Nach einer Woche erfolgte der Wechsel des Nährmediums, später die Ernte der Pflanzenballen zu den definierten Zeitpunkten (1 h, 6 h, 12 h) innerhalb eines Tages (1 h, 07:00; 6 h, 12:00; 12 h, 18:00).

Zur Aufbewahrung wurden die geernteten Proben (Ballen) in Flüssigstickstoff eingefroren und bis zu ihrer Verwendung (Herstellung der Sequenzier-Bibliothek) bei -80 °C gelagert.

Die Herstellung der Sequenzier-Bibliothek (Extrahieren der RNS aus Pflanzenballen sowie Umschreiben in cDNS) erfolgte mittels RNeasy Midi Kit (Qiagen) sowie TruSeq Stranded mRNA LT Kit (Illumina), unter Befolgung der Herstellerangaben.

Die resultierende cDNS-Bibliothek basiert auf Sequenzen, die über ein Verfahren namens Poly-A-Fischen erhalten wurden. Hierbei wird der Poly-A-Schwanz der „reifen“ mRNS durch ein Granulat gebunden, was eine gezielte Isolierung der mRNS ermöglicht.

Zur Überprüfung der Güte der RNS sowie der Qualität und Quantität der resultierenden cDNS erfolgten Analysen mittels BioAnalyzer sowie Nanodrop (Daten siehe Anhang).

Die isolierte RNS wies (über alle 27 Proben) einen durchschnittlichen RIN-Wert (RNS Integritätsnummer) von 8,1 von 10 auf (Maximum: 9,3; Minimum: 7,2). Dieser Wert kann als Indiz für die Güte der RNS gewertet werden, da eine hohe RNS-Integrität zu besseren Sequenzierergebnissen führt (Schroeder et al. 2006). Hintergrund ist hierbei, dass dieser Wert aufzeigt, inwieweit die Probe einem Abbau der RNS durch RNasen unterliegt.

Nach Fertigstellung der cDNS-Bibliothek wurden die Proben mit je $\sim 40 \cdot 10^6$ reads pro Probe sequenziert. Zur Analyse der Zeitabhängigkeit des wirkstoffinduzierten Fehlspleißens wurden

die Zeitpunkte 1 h und 6 h der Sequenzierung unterzogen, die Proben des Zeitpunkts 12 h wurden für die spätere RT-PCR basierte Validierung verwendet.

Die einzelnen cDNS-Fragmente wurden sowohl vom 3' als auch vom 5' Ende sequenziert, somit konnten die beiden Fragmentenden gekoppelt und eine umfassendere Information über die Sequenzen der einzelnen Fragmente ausgelesen werden, weiterhin erleichterte dieses Verfahren die Zuordnung der *reads* zu den jeweiligen Genorten.

Die so erhaltenen Daten wurden daraufhin getrimmt (Bereinigen von *reads*, die die Mindestanforderungen nicht erfüllen) sowie den jeweiligen Genen des Arabidopsis-Genoms zugeordnet (siehe Material und Methoden; HISAT2). Innerhalb der Proben bestanden durchschnittlich 99,2 % der *reads* die erste Qualitätskontrolle, von diesen konnten 96,3 % dem Genom eindeutig zugeordnet werden.

Die gewonnenen Daten ermöglichten eine weitere Unterteilung in Sequenzen, die auf Exons entfallen und solche, die Introns zugeordnet werden können. Letztere sollten im Normalfall nicht auffindbar sein, da „reife“ polyadenylierte mRNS keine Introns aufweisen sollte (abgesehen von solchen Introns, die im Kontext des Alternativen Spleißens ebenfalls als Exons fungieren können; diese wurden daher als Exons angesehen).

Mittels des R-Programmpakets eisaR (Michael Stadler, Dimos Gaidatzis, Lukas Burger, Charlotte Sonesson 2020) ließen sich diese Daten so weit auswerten, dass nur „intronhaltige“ Sequenzen oberhalb eines kritischen Signifikanzniveaus (Falscherkennungsrate $\leq 5\%$; FDR: *false discovery rate*) weitergehend berücksichtigt wurden. Die Analyse erfolgte, basierend auf der Herangehensweise der Entwickler des Programmpakets, mit den von Gaidatzis et al. definierten Parametern (Gaidatzis, Burger, Florescu & Stadler 2015).

Für eine erste Eingrenzung der zu analysierenden Transkripte wurden die Sequenzierdaten nach solchen Genorten gefiltert, bei denen sowohl auf Exons als auch Introns eine Mindestanzahl an *reads* entfiel. Zur Vergleichbarkeit der Proben untereinander wurden diese *read-counts* zuvor normalisiert und logarithmiert (Basis 2). Die Transkripte, die diesen Auswahlprozess überstanden, bildeten die Gruppe der wahrscheinlich fehlgespleißten Transkripte.

Genorte mit unzureichendem *read-count* in Exon oder Intron (über die Proben hinweg gemittelter Wert < 5) hätten die Aussagekraft der folgenden Analyse verzerren können und wurden daher nicht analysiert.

Für die Proben der Psoromsäure konnten für 6,5 % (t = 1 h) sowie 5,7 % (t = 6 h) der Gene von *Arabidopsis* fehlgespleißte Transkripte nachgewiesen werden, die diese Grundvoraussetzung erfüllten.

Im Vergleich hierzu lag bei Herboxidien der Anteil an Genen mit fehlgespleißten Transkripten mit 30,9 % (t = 1 h) und 38,7 % (t = 6 h) deutlich höher.

Diese erste Analyse führte somit, jeweils pro Zeitspanne und Wirkstoff, zu einer Liste an Genen, für die intronhaltige Transkripte vorlagen.

Diese Liste diente als Grundlage zur weiteren Analyse der *read-counts* der fehlgespleißten Transkripte mittels eisaR.

Die hierbei verwendete Detektionslogik beruht auf dem Vergleich zweier Gruppen (behandelt vs. unbehandelt).

In einem ersten Schritt wurden zwischen den Gruppen (Psoromsäure versus DMSO, bzw. Herboxidien versus DMSO) die dem einzelnen Gen zugeordneten *reads* für Exon und Intron zahlenmäßig mittels Subtraktion verglichen.

Vereinfacht lässt sich dies durch folgende Formeln illustrieren:

$$\begin{aligned} reads_{\text{behandelt}}^{\text{Exons:GenX}} - reads_{\text{unbehandelt}}^{\text{Exons:GenX}} &= \Delta\text{Exons: GenX} \\ reads_{\text{behandelt}}^{\text{Introns:GenX}} - reads_{\text{unbehandelt}}^{\text{Introns:GenX}} &= \Delta\text{Introns: GenX} \end{aligned} \quad (7)$$

Das Zahlenverhältnis von ΔExons und $\Delta\text{Introns}$ (dargestellt als Bruch) kann zur Abschätzung des wirkstoffinduzierten Effekts mittels des „Fehlspleiß-Verhältnisses“ verwendet werden. Durch den „Zähler“ ΔExon wird die Änderung im Expressionsniveau des Gens ausgedrückt. Entfallen in der behandelten Gruppe mehr Sequenzen auf Introns als in der Kontrollgruppe (unbehandelt), so vergrößert sich ΔIntron und somit der Nenner des Bruchs.

Ein hohes ΔIntron belegt prinzipiell einen hohen Verbleib von Introns in der finalen mRNS und könnte zur Fehlannahme einer hohen Wirksamkeit des Stoffes verleiten. Die Aussagekraft dieser Absolutzahl ist jedoch begrenzt, da sie nicht das totale Expressionsniveau des Gens berücksichtigt (Anzahl der Transkripte des Gens). Dem trägt der Quotient aus ΔExon und ΔIntron Rechnung.

Erst ein niedriger Quotient gibt somit an, dass es durch den Wirkstoff zu einem vermehrten Verbleib von Introns in der „reifen“ mRNA kommt, denn er setzt dies mit dem Expressionsniveau des Gens in Relation.

In Abbildung 60 wird das logarithmische Fehlspleiß-Verhältnis $\left(\log_2 \frac{\Delta \text{Exon}}{\Delta \text{Intron}}\right)$ durch die x-Achse ausgedrückt, Punkt $x = 0$ bedeutet hier Quotient 1.

Die y-Achse stellt das Ausmaß der Signifikanz des Funds ($-\log_{10} \text{FDR}$) in negativ-dekadischem Logarithmus der Falscherkennungsrate (FDR) dar. Farbige Punkte oberhalb der gestrichelten Linie sind signifikante Ereignisse von Wahrscheinlichkeit 5 % oder niedriger ($\text{FDR} \leq 0.05$).

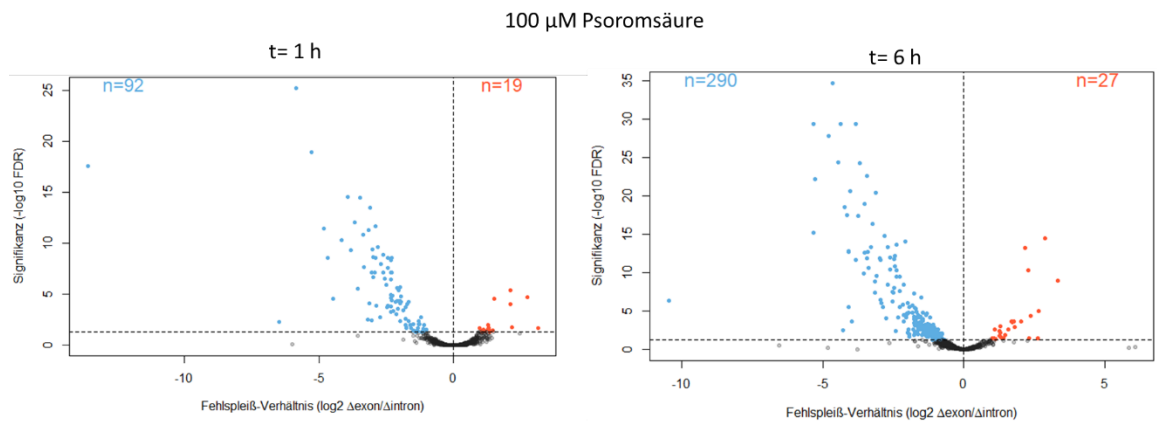


Abbildung 60

*Vulkan-Auftragung des Fehlspleiß-Verhältnisses gegen die Signifikanz des Ereignisses induziert durch 100 μM Psoromsäure nach 1h und 6h
 blau: Gene mit signifikanten Funden von retinierten Introns; rot: Signifikante Funde von hochregulierten Genen;
 gestrichelte Linie (horizontal): Signifikanz von 5 %*

Wie aus den Abbildungen zu entnehmen ist, kommt es in Gegenwart von 100 μM **Psoromsäure** bei 92 ($t = 1 \text{ h}$) beziehungsweise 290 ($t = 6 \text{ h}$) Genorten zum Auftreten von Transkripten mit retinierten Introns, die das nötige Signifikanzniveau ($\text{FDR} < 5 \%$) erreichen (Transkripte dargestellt als blaue Punkte).

Darüber hinaus konnten 19 ($t = 1 \text{ h}$) sowie 27 ($t = 6 \text{ h}$) Genorte gefunden werden, die auf Grundlage ihres Quotienten als signifikant hochreguliert gelten können (dargestellt als rote Punkte). Wahrscheinlich spiegeln diese Werte nur einen Bruchteil der tatsächlich hochregulierten Transkripte wider, da der Rest durch den Fokus der Analyse (Erfassung von intronhaltigen Transkripten) ausgegrenzt wurde (Bestandteil der Detektionslogik von eisaR; Durchschnittlicher *read-count* von Intron und Exon ≥ 5).

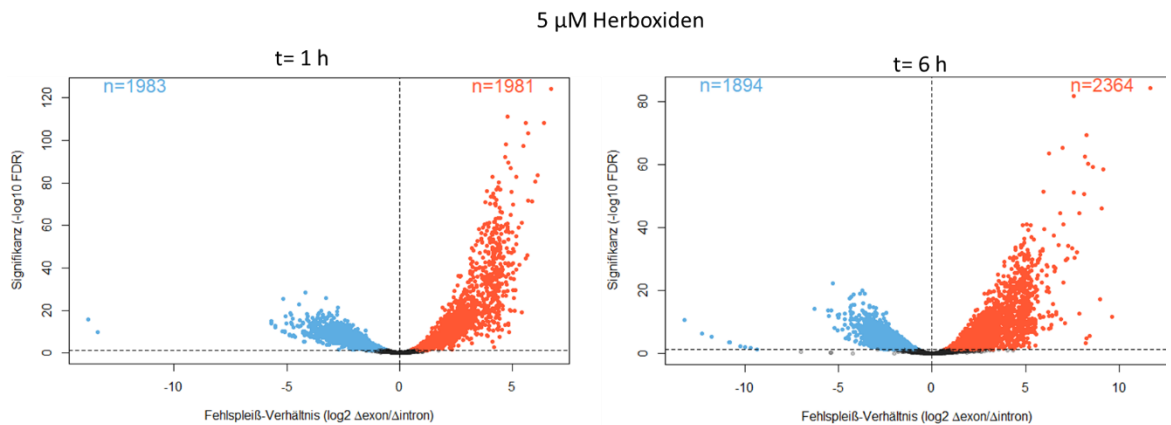


Abbildung 61

Vulkan-Auftragung des Fehlspleiß-Verhältnisses gegen die Signifikanz des Ereignisses induziert durch 5 μ M Herboxiden nach 1h und 6h
 blau: Gene mit signifikanten Funden von retinierten Introns; rot: Signifikante Funde von hochregulierten Genen;
 gestrichelte Linie (horizontal): Signifikanz von 5 %

Zum Vergleich die Ergebnisse der eisaR-Analyse für **Herboxidien** (Positivkontrolle des Versuchs; seine inhibitorische Wirkung auf Spleißosom von Arabidopsis ist literaturbekannt) (Abbildung 61).

Wie aus den Vulkan-Auftragungen ersichtlich, konnten 1983 (1 h) beziehungsweise 1894 (6 h) Transkripte mit retinierten Introns in ausreichender Signifikanz identifiziert werden (blau in Auftragung).

Weiterhin konnte eine, verglichen mit der Anzahl der fehlgespleißten Transkripte, etwa ebenso große Zahl an hochregulierten Transkripten mittels eisaR detektiert werden (rot in Auftragung). Dies legt die Vermutung nahe, dass **Herboxidien** insgesamt einen größeren Effekt auf die Pflanzen ausübt, da die Anzahl an fehlgespleißten Transkripten deutlich erhöht ist, und dies bei einer 20-fach niedrigeren Konzentration als **Psoromsäure**.

Unter Verwendung von Formel 8 ließ sich, getrennt für jeden Genort, der Anteil an retinierten Introns pro Transkript errechnen.

$$PRI = \% \text{ retinierte Introns} = \frac{TPM_{Intron}^{Gen:X}}{TPM_{Intron}^{Gen:X} + TPM_{Exon}^{Gen:X}} \quad (8)$$

Mit: TPM (Transkripte Pro Millionen; auf Probe normalisierter Wert)

Tabelle 17

Übersichtstabelle Prozent retinierte Introns durch 100 µM Psoromsäure (innerhalb der Transkripte mit FDR < 5%)

PROBE	PRI < 5 %	PRI > 50%	MEDIAN PRI	MAXIMUM PRI (PRI DMSO DIESES TRANSKRIPTS)
1 H	74 / 92	1 / 92	2,6 %	74,5 % (48,8 %)
6 H	224 / 290	7 / 290	1,6 %	79,3 % (23,6 %)

Tabelle 17 zeigt die prozentuale Verteilung retinierter Introns innerhalb der detektierten fehlgespleißten Transkripte für **Psoromsäure** (blaue Punkte; in Abbildung 60). Von den detektierten Transkripten macht (sowohl für 1 h und 6 h) der Anteil, der weniger als 5 % fehlgespleißt ist, circa 80 % aus. Dies findet ebenfalls Ausdruck im Median (2,6 % bzw. 1,6 %). Es wird ein maximaler PRI von 74,5 % (1 h) beziehungsweise 79,3 % (6 h) für die Transkripte des Genorts At1g13330 detektiert. Die DMSO-Proben weisen für diese Transkripte Werte von 48,8 % sowie 23,6 % auf.

Tabelle 18

Übersichtstabelle Prozent retinierte Introns durch 5 µM Herboxidien (innerhalb der Transkripte mit FDR < 5%)

PROBE	PRI < 5 %	PRI > 50%	MEDIAN PRI	MAXIMUM PRI (PRI DMSO DIESES TRANSKRIPTS)
1 H	357 / 1983	1 / 1983	9,3 %	57,3 % (3 %)
6 H	77 / 1894	4 / 1894	17,8 %	78,7 % (3,8 %)

Die dem entsprechende prozentuale Verteilung retinierter Introns bei Behandlung mit **Herboxidien** (blaue Punkte; in Abbildung 61) stellt, wie schon die Absolutzahlen der Vulkan-Auftragung, dessen stärkere Wirksamkeit unter Beweis (PRI Median ist nach 1 h um das 3,5-fache, nach 6 h um das 11,3-fache höher).

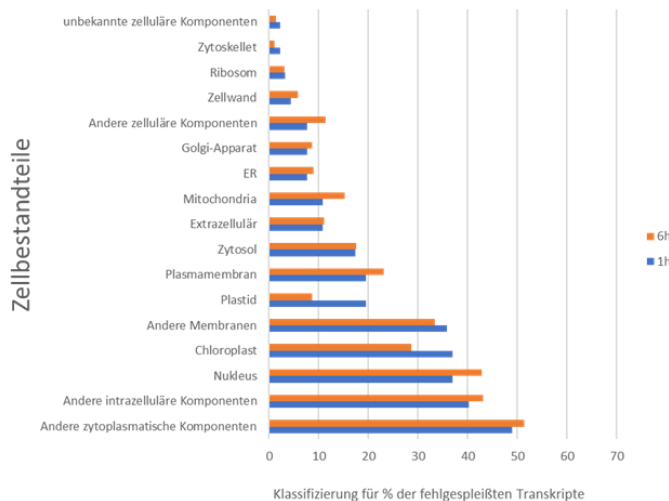
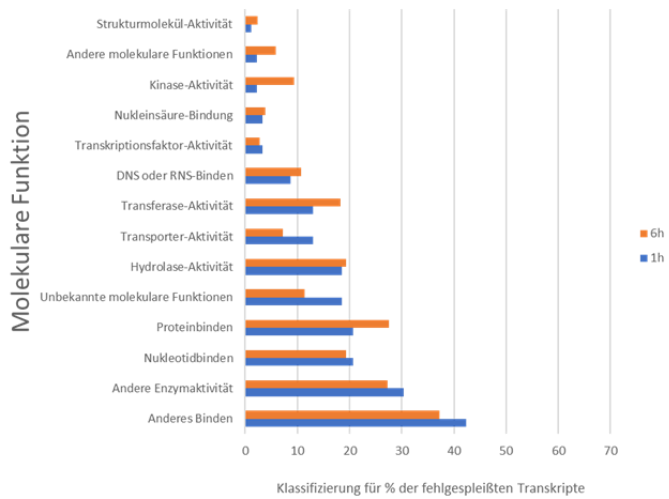
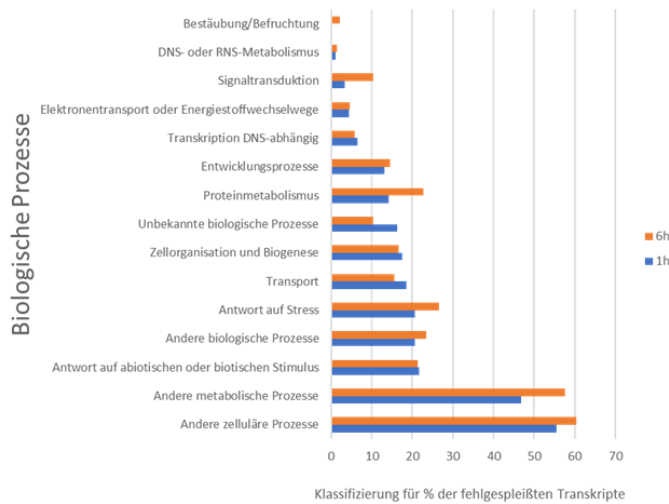


Abbildung 62
 Klassifizierung der fehlgespleißten Transkripte mittels Classification SuperViewer ((Nicholas Provart 2003) Abszisse: Klassifizierung für % der fehlgespleißten Transkripte; Ordinate: Gruppen der Klassifizierung blau: Zeitspanne 1 h; orange: Zeitspanne 6

Der nächste Schritt befasste sich mit der biologischen Bedeutung der durch Behandlung mit **Psoromsäure** fehlgespleißten Transkripte (92 bei $t = 1$ h; 290 bei $t = 6$ h; blaue Punkte in Abbildung 60).

Hierfür wurden die betreffenden Genorte mittels Classification SuperViewer (Nicholas Provart 2003) eingeteilt, basierend auf den assoziierten biologischen Prozessen, molekularen Funktionen sowie Zellbestandteilen (dargestellt durch Abbildung 62).

Innerhalb der fehlgespleißten Transkripte beider Zeitspannen (1 h, 6 h) erfolgte im Bereich der betroffenen *biologischen Prozesse* die Klassifikation „Antwort auf Stress“ besonders häufig. Weitere betroffene Prozesse umfassten „Transport“, „Antwort auf abiotische oder biotische Stimuli“ sowie „Zellorganisation und Biogenese“.

Im Bereich der *molekularen Funktion* erfolgte innerhalb

beider Proben­gruppen die Einordnung „Nukleotidbinden“ sowie „Proteinbinden“ besonders häufig.

Im Bereich der *betroffenen Zellbestandteile* traten die Klassifikationen „Nukleus“ sowie „Chloroplast“ am häufigsten auf.

Die Klassifizierung zeigt insgesamt, dass multiple Bereiche der Zelle sowie deren Prozesse und Funktionen betroffen sind. Eine klare Tendenz ist auf Grundlage dieser Daten somit nicht erkennbar.

Der Vergleich der fehlgespleißten Transkripte beider Zeitpunkte untereinander offenbart lediglich bei 15 Genen eine Übereinstimmung. Diese Gene lassen sich weder einem gemeinsamen Prozess, Zellbestandteil noch einer Funktion zuordnen.

Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass die fehlgespleißten Transkripte nicht auf eine Inhibition des Spleißens bestimmter Sequenzen oder Gene zurückzuführen sind, sondern aus einer unspezifischen Inhibition des Prozesses entstehen. Um diese Vermutung weitergehend zu überprüfen, wurden die fehlgespleißten Transkripte mit der Auftrittshäufigkeit der Transkripte in der Kontrollgruppe in Relation gesetzt.

Hierzu wurde für jedes Transkript der Kontrollgruppe (stellt Normalzustand dar) der TPM-Wert gebildet (Transkripte pro Millionen RNS-Moleküle; auf Transkriptlänge sowie Gesamtumfang der Sequenzierbibliothek normalisierter Wert). Auf Grundlage dieses Werts konnte eine „Rangliste“ der Transkripthäufigkeiten (Rang 1: am häufigsten, Rang 20537: am seltensten) erstellt werden.

Die fehlgespleißten Transkripte wurden daraufhin in diese Liste eingeordnet, wie in Abbildung 63 dargestellt. Wie aus den Diagramm-Balken ersichtlich, findet sich das Gros (~70 %) der fehlgespleißten Transkripte innerhalb der 6000 häufigsten Transkripte.

Dieser Fund deutet darauf hin, dass das Ziel der Spleiß-Hemmung weder bei **Psoromsäure** noch bei **Herboxidien** ein spezifisches Sequenzmuster oder eine bestimmte Transkript-Identität ist. Es handelt sich vielmehr um einen ungezielten, stochastischen Vorgang. Bei Transkripten mit hoher Stückzahl ist die statistische Wahrscheinlichkeit von Fehlspleißen höher als bei solchen mit geringer Stückzahl.

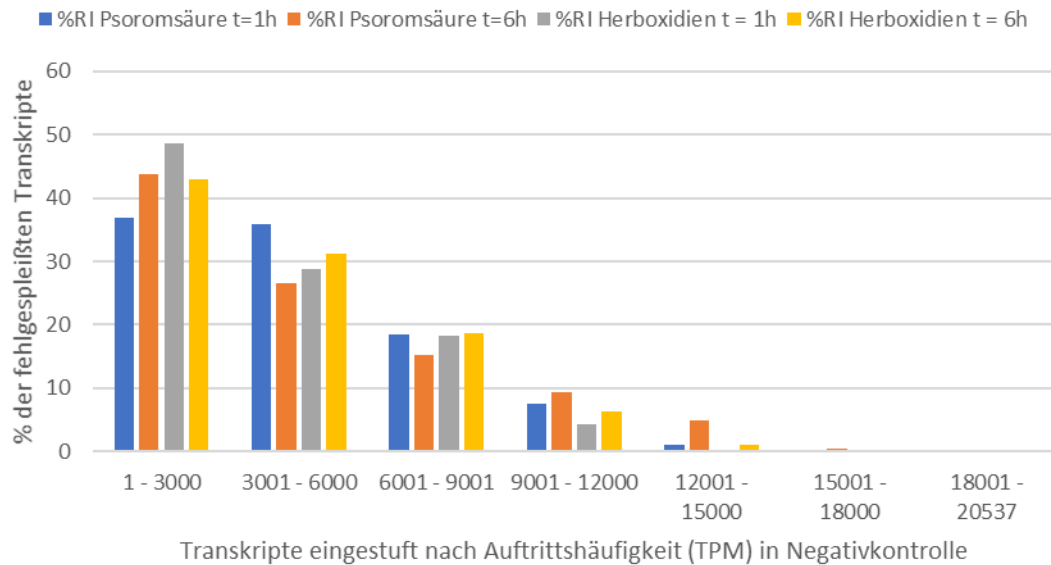


Abbildung 63

Einstufung der Transkripte aufgrund ihrer Auftrittshäufigkeit innerhalb der Kontrollgruppe;
 Abszisse: Gruppierung nach Auftrittshäufigkeit der Transkripte (1: am häufigsten; 20537: am seltensten)
 Ordinate: % der fehlgespleißten Transkripte dieser Gruppe und Zeitspanne (blaue Punkte in Abb. 60/61)
 blau: Psoromsäure 1 h; orange: Psoromsäure 6 h; grau: Herboxidien 1 h; gelb: Herboxidien 6 h

Als eine letzte Analyse wurden die Identitäten der fehlgespleißten Transkripte mit einer Liste von literaturbekannten essenziellen Genen abgeglichen (Lloyd et al. 2015; Meinke 2020), um mögliche Anhaltspunkt für den im *in-vivo*-Test beobachteten letalen Effekt der **Psoromsäure** zu finden.

Hierbei konnten innerhalb der fehlgespleißten Transkripte (92 für t = 1 h; 290 für t = 6 h; blaue Punkte in Abbildung 60) insgesamt 11 dieser bekannten essenziellen Genorte identifiziert werden (Tabelle 19).

Bis aus zwei Ausnahmen (AT5G12840 und AT4G02510) machen die fehlgespleißten Transkripte jeweils nur einen geringen Anteil der gesamten Transkripte aus, so dass der letale Effekt nicht auf das „Ausschalten“ der Expression dieser essenziellen Gene zurückzuführen ist. Beispielsweise entfallen beim essenziellen Gen AT4G15560 (DXS) 99.79% der detektierten *reads* auf Exons. Fehlgespleißte Transkripte liegen nur in einem geringen Bruchteil vor.

Bei den Transkripten der Gene AT5G12840 und AT4G02510 entfallen 5,02 % und 14,93 % der gesamten *reads* auf Introns. Vergleicht man diesen Prozentsatz jedoch mit dem der *reads* der DMSO-Proben (Negativ-Kontrolle), so relativiert sich der Effekt, da der Anteil an intronischen *reads* ebenfalls 4,50 % und 8,04 % ausmacht.

Tabelle 19

Auflistung essenzieller Gene mit fehlgespleißten Transkripten in 1h und 6h Probe

Gen-ID	Fehlgespleißtes Transkript in Probe	PRI [%]	Kurzbeschreibung
AT2G21170	1 h	0,57	Kodiert eine plastidäre Triosephosphatisomerase. Notwendig für Übergang von heterotrophen zu autotrophem Wachstum.
AT3G17650	1 h	1,18	Kodiert den Metal-Nicotinaminetransporter YSL5; Doppel-KO <i>ysl5ysl7</i> führt zu sterilem Pollen
AT4G23100	1 h / 6 h	0,43/0,6	Kodiert die Glutamat-Zystein-Ligase; essentieller Bestandteil der Glutathion-Synthese.
AT1G78630	6 h	0,07	Kodiert ein ribosomales Protein; essenziell für Embryonalentwicklung, EMB1437 (<i>Embryo DEFECTIVE 1437</i>)
AT2G36850	6 h	0,64	Kodiert ein Glucansynthase-Like (GSL) Protein, vermutlich involviert in Zellwandsynthese (Callose)
AT2G47510	6 h	0,30	Kodiert Fumerase 1, mitochondriales Protein, spielt vermutlich essentielle Rolle in Citratzyklus
AT3G10380	6 h	1,37	Kodiert Untereinheit des Exocyst-Komplexes (involviert in Vesikelaustausch)
AT3G55620	6 h	1,10	Kodiert für Translationsinitiations Faktor 6; EMB1624
AT4G02510	6 h	14,93	Kodiert Membran GTPase bei Chloroplasten; Rezeptor für Transitsequenzen; notwendig für Proteinimport (Chloroplastenentwicklung)
AT4G15560	6 h	0,21	Kodiert 1-Deoxyxylulose-5-phosphat-Synthase (DXS); Bestandteil des Methylerythritolphosphatwegs. Essenziell für Isoprensynthese und Entwicklung der Chloroplasten
AT5G12840	6 h	5,02	Kodiert eine Untereinheit des CCAAT-Bindekomplexes, Erkennung von Promotorensequenz

Psoromsäure hat auf Grundlage der vorliegenden Daten eine inhibitorische Wirkung auf den Prozess des Spleißens; fehlgespleißte Transkripte konnten identifiziert werden. Dieser Effekt scheint im Vergleich zu dem von **Herboxidien** deutlich geringer zu sein. Dies findet in der Menge der fehlgespleißten Transkripte sowie der Ereignisse mit signifikantem Fehlspleiß-Verhältnis Ausdruck.

VII.1.3 Biochemische Validierung des tatsächlichen Vorliegens von fehlgespleißten Transkripten

Die vorherigen Auswertungen basierten ausschließlich auf der Analyse der Sequenzdaten mittels computergestützter Berechnungen. Die so gewonnenen Ergebnisse (Nachweis von Introns in „reifen“ Transkripten) erfordern zur Validierung eine biochemische Bestätigung.

Aus der Menge der durch eisaR als (durch **Psoromsäure**) fehlgespleißt indentifizierten Transkripte (blaue Punkte; in Abbildung 60, Seite 109) wurden 10 ausgewählt. Als erstes Auswahlkriterium diente eine errechnete hohe Anzahl an Fehlspleißungen (somit kleines Fehlspleiß-Verhältnis $\left(\frac{\Delta Exon}{\Delta Intron}\right)$). Das zweite Auswahlkriterium berücksichtigte die zeitliche Verteilung. Von den Ereignissen (1 h, 92 bzw. 6 h, 290) waren nur 15 zu beiden Zeitpunkten aufzufinden, die restlichen nur zu einem der beiden Zeitpunkte. Von ersterer Gruppe wurden 2, aus letzterer 8 ausgewählt (je 4 für die einzelnen Zeitpunkte).

Von diesen 10 selektierten Transkripten wurden im nächsten Schritt die Sequenzierdaten mittels des IGV-Viewers visuell dargestellt, zur Detektion von Abschnitten, die ein Intron enthalten und sich mittels RT-PCR amplifizieren lassen. Es sollten nur solche Abschnitte verwendet werden, deren Intron nicht an alternativen Spleißvorgängen beteiligt ist und somit auch nicht in natürlich vorkommenden Isoformen gefunden werden kann.

Die Produkte dieser RT-PCR konnten daraufhin mittels eines Agarosegels aufgetrennt werden, um zu ergründen, ob zweierlei Fragmente vorliegen: Solche mit retiniertem Intron (länger) und solche in korrekt gespleißter Form.

Im Folgenden sind die Transkripte der beiden Genorte dargestellt, bei denen laut eisaR durch Psoromsäure für die Zeitspannen 1 h und 6 h gleichermaßen Fehlspleiß-Ereignisse induziert wurden (entsprechend dem zweiten Auswahlkriterium).

VII.1.3.1. Exemplarisch: Genort At4g15545

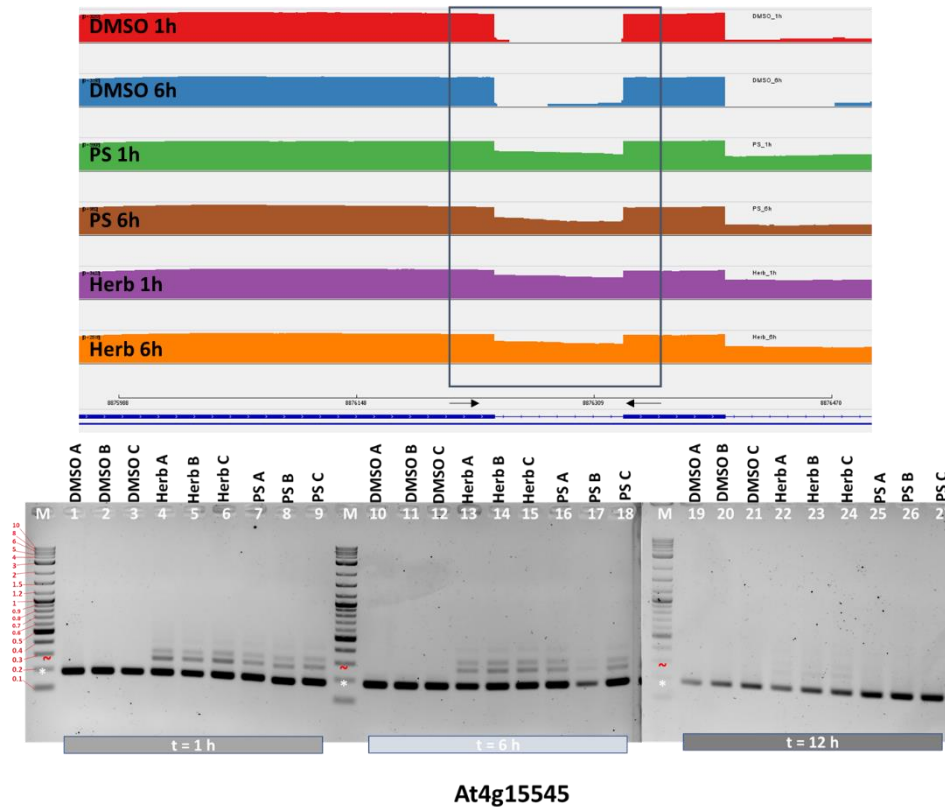


Abbildung 64
 Sequenzansicht IGV-Viewer und Agarosegel (2%) für At4g15545
 1-9: t = 1h; 10-18: t = 6 h; 19-27: t = 12h; M: Marker; 1-3,10-12,19-21: DMSO; 4-6,13-15,22-24: Herboxiden;
 7-9,16-18,25-27: Psoromsäure
 weißer Stern: Bande der korrekt gespleißten Form; rote Tilde: Bande mit retiniertem Intron

Abbildung 64 zeigt exemplarisch die Sequenzansicht sowie das Agarosegel für die Analyse der Transkripte des Gens At4g15545. Die Primer für das zu amplifizierende Fragment wurden im ersten und zweiten Exon des Gens platziert. Aus der PCR sollte, bei korrekt gespleißten Transkripten, ein 185 Basenpaare messendes Fragment resultieren. Bei Verbleib des Introns im Transkript (fehlgespleißt) misst das entstehende Fragment 272 Basenpaare. Wie auf Grundlage der Gele zu erkennen, stellt das korrekt gespleißte Transkript (zu erwarten 185 bp) die vorherrschende Form dar (intensive Banden im Bereich < 200 bp; weißer Stern). In den Proben der Negativkontrolle (0,2 % DMSO) erscheinen keine zusätzlichen Banden (jeweils erste drei Spalten der drei Zeitintervalle), somit kommt es dort zu keinem Fehlspleißen. In den mit Herboxiden oder Psoromsäure behandelten Proben der Zeitpunkte 1 h [4-9] und 6 h [13-18] sind zusätzliche Banden in der für das fehlgespleißte Produkt erwarteten Größe

(272 bp) sichtbar (< 300 bp; rote Tilde). Innerhalb der Proben, die 12 h Herboxiden oder Psoromsäure ausgesetzt wurden, finden sich lediglich in den Herboxiden-Fractionen leichte Anzeichen für zusätzliche Banden neben der des korrekt gespleißten Produkts. Der Effekt von Herboxiden und Psoromsäure erscheint somit (für dieses Transkript) in den Zeitintervallen 1 h und 6 h ausgeprägter zu sein.

Zusätzlich zu den erwarteten Banden treten weitere Banden bei ~ 300 bp sowie ~ 400 bp auf. Diese erscheinen innerhalb der Proben zu 1h am intensivsten und sind in den Fraktionen 22-27 (12 h) nicht mehr zu erkennen.

Jede der Gruppen (DMSO, Herboxiden, Psoromsäure) hatte 3 Proben pro Zeitspanne. Innerhalb derselben sah man keine Abweichungen. Somit wurde für die folgenden Validierungen nur noch jeweils eine Probe pro Gruppe und Zeitspanne verwendet.

VII.1.3.2. Exemplarisch: Genort At5g64240

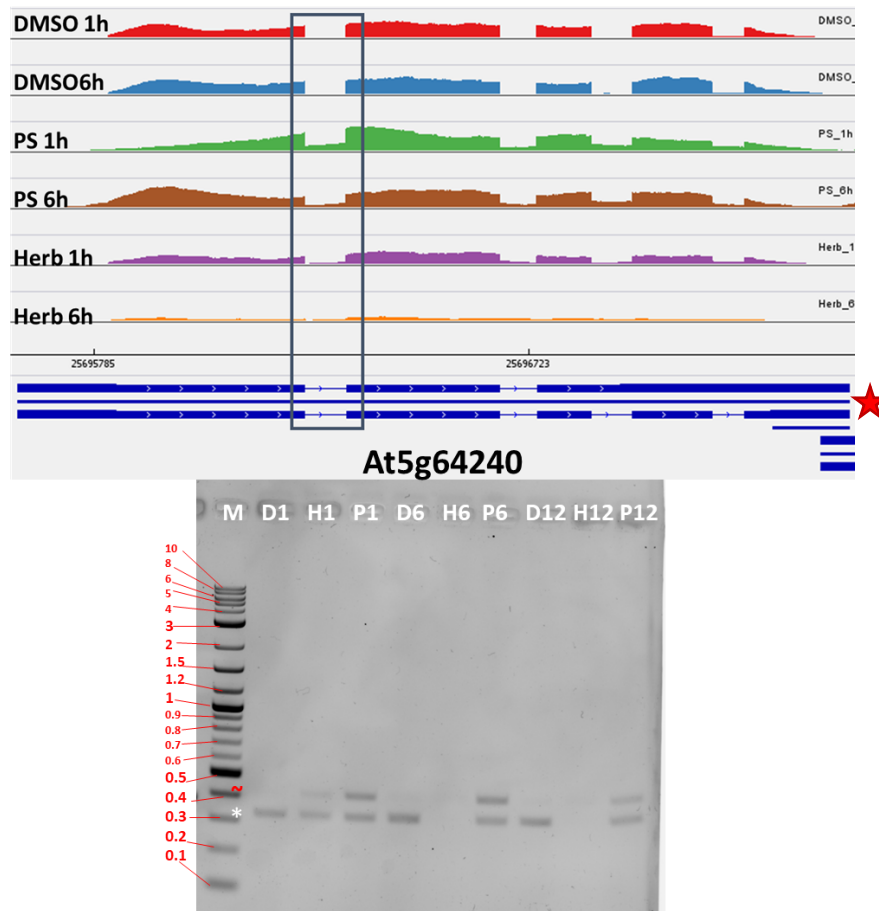


Abbildung 65
 Sequenzübersicht im IGV-Viewer für At5g64240 sowie 2% Agarosegel der PCR zum Nachweis fehlgespleißter Transkripte
 D1: DMSO 1h; H6: Herboxiden 6h; P12: Psoromsäure 12 h; M: Marker; Stern (weiß): erwartete Höhe Bande korrekt gespleißt; Tilde (rot): erwartete Höhe Bande mit Intron (fehlgespleißt)

Die Darstellung in Abbildung 65 illustriert, als weiteres Beispiel, die Sequenzdaten von At5g64240 sowie das Ergebnis der PCR auf die Exons, die das erste Intron flankieren (Kasten in Sequenzdarstellung; Agarosegel). Die mittels Agarose-Gel auftrennten Fragmente der einzelnen Proben zeigen das Vorliegen von sowohl der korrekten (weißer Stern; 331 bp) als auch der fehlgespleißten Form (rote Tilde; 420 bp). Innerhalb der DMSO-Kontrolle kommt es ausschließlich zum Auftreten des Fragments der korrekt gespleißten Form. Im Gegensatz hierzu weisen die mit Herboxiden behandelten Proben lediglich nach 1h Banden auf, danach nicht mehr. Wie aus den Sequenzierdaten ersichtlich, scheint die Expression dieses Gens in den mit Herboxiden behandelten Proben nur in einem geringen Ausmaß stattzufinden. Die mit Psoromsäure behandelten Proben indes weisen für alle Zeitspannen sowohl die Bande des natürlichen Transkripts als auch die der fehlgespleißten Variante in vergleichbarer Intensität auf.

Wie aus der Annotationsspur zu ersehen (roter Stern), liegen bei At5g64240 Transkripte in zwei Isoformen vor, hierbei beinhaltet die Sequenz einer der Isoformen die Introns drei und vier. Durch eine PCR auf eines dieser Introns könnte folglich nicht zwischen fehlgespleißten Transkripten und alternativem Spleißen unterschieden werden (wie schon einleitend beschrieben).

VII.1.3.3. Übersicht der verbleibenden 8 ausgewählten Genorte, zur Validierung des Nachweises von fehlgespleißten Transkripten

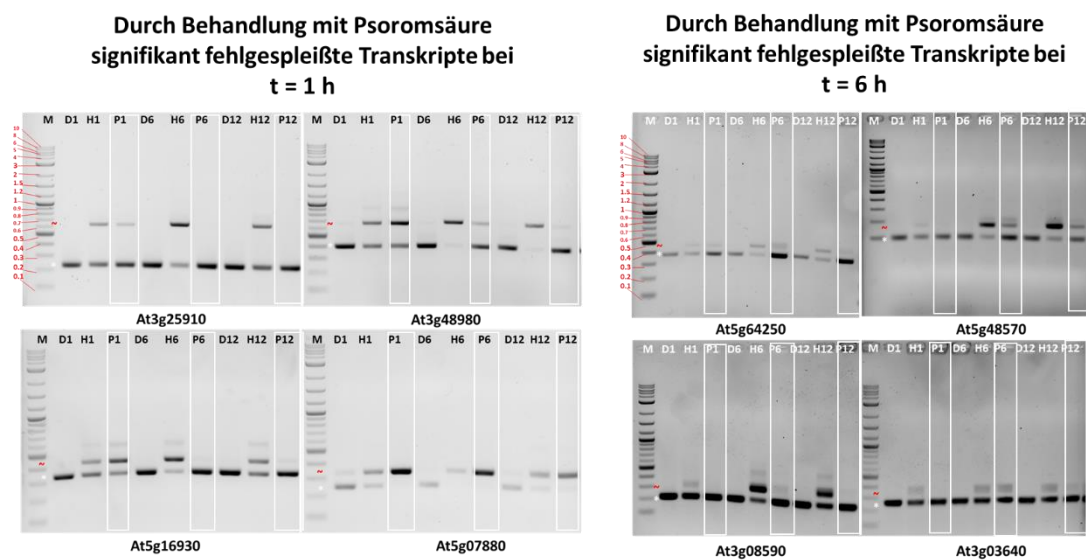


Abbildung 66

Übersicht über Agarose-Gele der verbleibenden acht Genorte, zur Validierung der fehlgespleißten Transkripte

Proben der Psoromsäure eingerahmt in weißem Kasten; M: Marker; D: DMSO; H: Herboxiden; P: Psoromsäure; 1: 1 h; 6: 6 h; 12: 12 h
weißer Stern: korrekt gespleißte Form; rote Tilde: retiniertes Intron

Die Analyse mittels eisaR hatte für die Zeitspannen 1 h und 6 h jeweils eine Anzahl an Genorten mit signifikant fehlgespleißten Transkripten ergeben (92 für t = 1 h; 290 für t = 6h; blaue Punkte in Abbildung 60). Aus dieser Vielzahl waren zehn Gene ausgewählt worden. Insgesamt konnte für alle der zehn Gene das Vorhandensein von fehlgespleißten Transkripten mittels PCR validiert werden (Darstellung der Übersicht der restlichen acht Genorte in Abbildung 66; Spuren der Proben der Psoromsäure durch weiße Umrandung markiert).

Da bei allen Genen dieser Auswahl ein positives Ergebnis gefunden werden konnte (Vorliegen von fehlgespleißten Transkripten), ist davon auszugehen, dass dies auch auf alle anderen mittels eisaR identifizierten Genorte zutrifft.

Ebenfalls konnte die Bedeutung einer Zeitkomponente aufgezeigt werden. So lagen bei den fehlgespleißten Transkripten, die ausschließlich bei den 6 h-Proben mittels eisaR gefunden worden waren, erwartungsgemäß nur sehr blasse Banden für fehlgespleißte Transkripte für die Zeitspanne 1h vor (rechte Hälfte der Darstellung). Ein ähnliches Ergebnis lieferten die Gene At3g25910 und At5g16930, für die nur innerhalb der 1 h-Proben signifikant missgespleißte Transkripte mit eisaR detektiert wurden. Demgemäß lieferten die Proben der Psoromsäure zu späteren Zeitpunkten keine Banden für größere Fragmente als die der natürlichen Form. Im Gegensatz hierzu konnten mittels RT-PCR für die Gene At3g48980 und At5g07880 auch für die Zeitpunkte 6h und 12h fehlgespleißte Transkripte gefunden werden. Die vorausgegangene Sequenzanalyse mittels eisaR hatte indes für diese beiden Genorte keine signifikanten Ereignisse für eine Zeitspanne größer 1 h identifiziert (Diskrepanz zwischen eisaR und RT-PCR).

Insbesondere im Fall von At5g07880 weicht die computergestützte Identifizierung (Nachweis von signifikant fehlgespleißten Transkripten nur bei $t = 1$ h) vom Befund des Agarosegels ab, da die Bande des fehlgespleißten Transkripts klar erkennbar die vorherrschende Form für alle Zeitspannen (1 h, 6 h, 12 h) darstellt. Es ist unerwartet, dass eisaR dieses Gen nicht auch innerhalb der fehlgespleißten Transkripte der Zeitspanne 6 h identifizieren konnte.

Insgesamt war es möglich, durch Gabe von Psoromsäure Fehlspleißungen auszulösen wie die Transkriptom-Analyse ergab. Dass es sich dabei tatsächlich um fehlgespleißte Transkripte handelte, konnte mittels RT-PCR stichprobenartig validiert werden.

VIII. Diskussion

Das Forschungsvorhaben hatte zum Ziel, einen Beitrag zur Identifizierung und Validierung potenzieller neuer Wirkstoffziele zu leisten.

Hierfür konnten zwei Themenschwerpunkte gebildet werden.

Der erste Teil befasst sich mit der Frage, ob der Inhibitor MOCB, dessen Wirksamkeit auf die Menaquinon-Synthese im Bakterium bewiesen werden konnte (durch Hemmung des Enzyms MenB), in der Pflanze analog wirkt. Des Weiteren, ob die Inhibition der Phylloquinon-Synthese im vom Enzym DHNS katalysierten Schritt letale Konsequenzen nach sich zieht (Phylloquinon ist das pflanzliche Analogon zum Menaquinon; DHNS ist das pflanzliche Analogon zu MenB).

Der zweite Schwerpunkt befasst sich mit der Beeinflussbarkeit des Prozesses des Spleißens in *A. thaliana* durch Psoromsäure, einem aromatischen Flechtenstoff, dessen Wirksamkeit schon am humanen Spleißosom beschrieben wurde.

IX. Teil I: Validierung von DHNS (*At1g60550*) als Wirkstoffziel

IX.1.1 Phänotypische Validierung – *in-vivo* Aktivität des Inhibitors und Komplementation

Das erste Validierungskriterium war der Nachweis der *in-vivo* Aktivität des Inhibitors MOCB. Hierfür wurden Arabidopsis-Pflanzen auf wirkstoffhaltigen ½ MS-Platten kultiviert, nach 14 Tagen erfolgte eine visuelle Begutachtung des Phänotyps.

Mit steigender Wirkstoffkonzentration (10 µM, 25 µM, 50 µM) stellten sich klare Änderungen im Phänotyp der Pflanzen ein. So kam es zu einer Verzögerung der morphologischen Entwicklung (Anzahl der entfalteten Blätter, Größe des Sprosses, Länge der Wurzeln) sowie zu einem helleren bis gelblichen Farbton der Blätter. Letzteres kann als Indiz für eine Störung innerhalb des Prozesses der Photosynthese gewertet werden.

Dieser Phänotyp (gelbliche bis weißliche Färbung der Pflanze) wird übergreifend mit Chlorose oder Bleichsucht umschrieben und lässt sich auf einen Chlorophyllmangel beziehungsweise Störungen im Elektronentransport innerhalb von Photosystem I oder II zurückführen.

Phylloquinon dient innerhalb des Photosystem I als essenzieller Elektronentransporter, der Phänotyp bestärkt somit die Arbeitshypothese, dass es zu einer Beeinflussung der Phylloquinon-Synthese kommt.

In der Literatur wurde der Phylloquinon-Syntheseweg an verschiedenen Stellen mittels Knockouts der betreffenden Gene unterbrochen. Der daraus resultierende Phänotyp (fahl-grünliche, wachstumsgehemmte Pflanzen, bei Kultivierung auf zuckerhaltigem Medium) ähnelt dem unserer MOCB-exponierten Pflanzen (Shimada et al. 2005; Gross et al. 2006; Gross, Meurer & Bhattacharya 2008; Garcion et al. 2008; Kim, van Oostende, Basset & Browse 2008).

Durch die Unterbrechung der Phylloquinon-Synthese kommt es global zu einer verringerten Aktivität des Photosystem I (50 – 60 % des Niveaus des Wildtyps, (Gross et al. 2006)), hieraus ergibt sich eine Akkumulation von an Photosystem II generierten Ladungsträgern (Johnson et al. 2000). Diese Anhäufung von Reduktionsmitteln fördert die Bildung sogenannter „reaktiver Sauerstoffspezies“ (ROS). Übersteigt die Konzentration an ROS die Kapazität der Zelle, diese zu prozessieren, kommt es zur vermehrten Oxidation von Zellbestandteilen, insbesondere der Photosysteme, was sich in einem Ausbleichen der Pflanze sowie dem Einleiten des programmierten Zelltods manifestiert (Foyer 2018).

Der durch uns induzierte Phänotyp entspricht somit der auf Grundlage der Literatur formulierten Erwartung. MOCB kann ein Inhibitor der Photosynthese sein, der zu einem Abriss der Elektronentransportkette führt. Die stärkere Ausprägung des Ausbleicheffekts bei den in der Literatur beschriebenen KO-Linien im Vergleich mit den durch den Inhibitor (MOCB) hier beaufschlagten Pflanzen lässt sich damit erklären, dass den KO-Linien von vornherein ein enzymatischer Schritt fehlt, während bei den Pflanzen der Inhibitionsstudie ein vorhandenes Enzym, durch Aufnahme des Wirkstoffs, lediglich reversibel gehemmt wird.

Im Zuge der **Komplementationsstudie** konnte gezeigt werden, dass sich das Ausbleichen der Pflanzen sowie deren Wachstumsverzögerung durch Zugabe des Intermediats DHNA (100 μ M) teilweise aufheben ließ. Die Pflanzen, die in Gegenwart von 20 μ M MOCB sowie dem Supplement kultiviert wurden, glichen der unbehandelten Kontrollgruppe (kein Inhibitor, kein Supplement) (siehe Abbildung 20, untere Reihe, 2. links, Seite 52). Diese kompensatorische Wirksamkeit untermauert die Hypothese, dass MOCB die Phylloquinon-Synthese in einem der DHNA-Entstehung vorgelagerten Schritt inhibiert (DHNA ist ein mittelbares Folgeprodukt des Enzyms DHNS, dem vermutlichen Angriffspunkt des Inhibitors; siehe Abbildung 6, Seite 23).

Ein allgemein kurativer Effekt der Zugabe des Supplements kann hingegen ausgeschlossen werden, da DHNA selbst einen phytotoxischen Effekt zeigt (siehe Abbildung 20, untere Reihe, 1. links, Seite 52). DHNA wird heute weithin als Verzweigungsstelle der Phylloquinon-Synthese mit der Produktion weiterer spezialisierter 1,4-Naphthoquinon-Derivate (1,4-NQs) angesehen (Widhalm & Rhodes 2016). Aus DHNA muss somit nicht zwangsläufig Phylloquinon entstehen, sondern potenziell auch eine Reihe an weiteren Pflanzenstoffen. Diese dienen der Pflanze zur Interaktion mit anderen Pflanzen (Allelopathie) sowie mit Mikroorganismen und Insekten. Effekte dieser Wechselwirkungen umfassen unter anderem die Hemmung der Keimung weiterer Pflanzen der eigenen oder einer anderen Art (Bspw. Juglon, Echter Walnussbaum (Widhalm & Rhodes 2016; Kato et al. 2019; McCoy et al. 2018)). Beispielsweise induzieren die 1,4-NQs oxidativen Stress durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS; eng. *Reactive oxygen species*), der final in einer größeren Stress-Antwort-Reaktion gipfelt und den programmierten Zelltod nach sich zieht (Chi et al. 2011; Babula et al. 2014).

Die künstliche Überhöhung des DHNA-Spiegels durch Supplementierung kann damit zur vermehrten Synthese dieser wachstumshemmenden „Interaktionsstoffe“ führen.

Durch Hemmung der Phylloquinon-Synthese durch MOCB (beziehungsweise des aktivierten Wirkstoffs MOCB-CoA) vor dem Entstehen von DHNA resultiert ein geminderter endogener DHNA-Pool. Die Supplementierung von DHNA führt in dieser Ausgangslage nicht zu einer Erhöhung des Spiegels über den Normalwert, die zuvor beschriebenen (durch DHNA bedingten) negativen Konsequenzen bleiben somit aus (siehe Abbildung 20, untere Reihe, 2. und 3. links, Seite 52).

Bei höheren Inhibitorkonzentrationen ergibt sich wiederum eine Wachstumshemmung, die kompensierende Wirkung von 100 μM DHNA scheint hierfür unzureichend zu sein (siehe Abbildung 20, untere Reihe, 4. und 5., Seite 52).

IX.1.2 Chemische Validierung – *In-vitro* Enzym-Assay und Inhibitionskinetik

Die Testung *in-vitro* ermöglichte die Betrachtung des Effekts von MOCB auf das vermutete Wirkstoffziel, die DHNS, losgelöst vom Organismus.

Wegen der Instabilität des Substrats der DHNS (OSB-CoA) musste dieses durch eine vorgeschaltete Reaktion *in-situ* erzeugt werden. Hierfür erfolgte zuerst die rekombinante

Produktion der Enzyme des gekoppelten Tests in je drei Varianten (native Form, His₆-Tag N- oder C-terminal).

Hierbei zeigte sich, dass sowohl DHNS als auch sein Analogon aus *E. coli* (EcMenB) nur in der nativen Form zu produzieren und als aktives Protein zu isolieren sind. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen ebenfalls *Song & Guo* sowie *Li et al.*, die die DHNS-Analoga aus *Synechocystis sp. PCC 6803* (ScMenB) sowie *Escherichia coli* (EcMenB) charakterisierten und ebenfalls nur in der nativen Form reinigen konnten (Song & Guo 2012; Li et al. 2011a).

Im Gegensatz hierzu war es *Truglio et al.* möglich, MtMenB (MenB von *M. tuberculosis*) mittels N-terminalem Hexahistidin-Peptids zu isolieren (Truglio et al. 2003).

Ein möglicher Grund für diesen Unterschied kann die Unterteilung der 1,4-Dihydroxy-2-Naphthoyl-CoA-Synthase in zwei Gruppen sein. Während die Aktivität von MtMenB unabhängig von Bicarbonat ist, benötigen die Enzyme der Gruppe I (DHNS, EcMenB und ScMenB) exogenes Bicarbonat, um die Reaktion zu katalysieren. Dieser Umstand kann auf Unterschiede innerhalb der Proteinfaltung hindeuten, die sich in den Unterschieden bezüglich der Isolierbarkeit manifestieren.

Das „Hilfsenzym“ der gekoppelten Reaktion EcMenE konnte indes in allen drei Varianten produziert und gereinigt werden. Auch wies es in jeder Variante Enzymaktivität auf.

Im Zuge der Etablierung des gekoppelten Tests zeigte sich, dass ein C-terminaler His₆-Tag an EcMenE das Ausbleiben der von MenB bzw. DHNS katalysierten Folgereaktion (OSB-CoA → DHNA-CoA) nach sich zieht. Die Gründe hierfür können nur vermutet werden, jedoch legt die Tertiärstruktur von EcMenE eine mögliche Erklärung nahe. Der C-terminus des Proteins ragt in die aktive Tasche des Enzyms. Folglich würde ein Histidin-Hexapeptid am C-terminus ein basisches Potential in die aktive Tasche einbringen, das die Laktonisierung des instabilen Intermediats OSB-CoA fördert.

Ein N-terminaler His₆-Tag hat im Gegensatz hierzu keinen Effekt auf die Folgereaktion. Die Enzymkinetik konnte in der Konstellation, bestehend aus His₆-EcMenE und DHNS, aufgenommen werden.

In DMSO-freiem Reaktionspuffer wiesen DHNS und EcMenB (Li et al. 2011b) eine übereinstimmende Affinität gegenüber dem Substrat auf. Im Gegensatz hierzu zeigte sich, dass der Zusatz des Lösungsmittels DMSO (finale Konzentration 0,2 %) die Affinität des Enzyms gegenüber seinem Substrat (OSB-CoA) drastisch erhöhte (Faktor ~ 3) (siehe Tabelle 13, Seite 87). Dieses Ergebnis lässt sich durch verschiedene Hypothesen erklären.

Einerseits ist bekannt, dass DMSO und weitere denaturierende Agenzien in geringen Dosen die Konformation des Proteins und somit der aktiven Tasche flexibler machen. Dies führt in einigen Fällen zu einer Erhöhung von Affinität und Aktivität des Proteins (Batista et al. 2013; Zhang, Sheng, Pan & Zhou 1997; Steinschneider & Druck 1972). Weitere Erklärungen umfassen eine Erhöhung der Stabilität des Intermediats (OSB-CoA) sowie eine Erhöhung der Diffusionsgeschwindigkeit von diesem zur aktiven Tasche der DHNS.

Die molekulare Aktivität wird indes nicht merklich durch das Lösungsmittel beeinflusst, DHNS zeigt in beiden Umgebungen eine etwa fünfmal geringere Aktivität als EcMenB. Vergleicht man jedoch die katalytische Effizienz (den Bruch aus molekularer Aktivität und Affinität), so ähnelt diese von EcMenB der von DHNS (0,2 % DMSO). Somit setzen DHNS (0,2 % DMSO) und EcMenB insgesamt eine ähnliche Menge Substrat pro Zeiteinheit zu Produkt um, hierbei unterscheiden sie sich jedoch in den einzelnen Charakteristika der Kinetik (K_m , v_{max} , k_{cat}).

Ein augenmerklicher Unterschied zwischen diesen beiden Enzymen ist ihre Lokalisierung innerhalb der Zelle. Während sich EcMenB im Zytosol von *E.coli* findet, ist DHNS in *A.thaliana* in Peroxisomen eingeschlossen (Reumann et al. 2007). Somit ist das Milieu der Enzyme in ihrer nativen Umgebung stark unterschiedlich (Bspw. *E. coli* Zytosol pH 7,2 ; *A. thaliana* Peroxisom pH 8,4 (Shen et al. 2013; Wilks & Slonczewski 2007)), dies sollte sich auch in den Reaktionsoptima der Enzyme widerspiegeln.

Insbesondere der basische pH des Peroxisoms sowie die Neigung zur (unerwünschten) Laktonisierung des Intermediats führen zu weitergreifenden Hypothesen.

Da Laktonisierungen sowohl im sauren als auch basischen Milieu ablaufen, sollte das Substrat der DHNS-Reaktion möglichst vom alkalischen Milieu des Peroxisoms abgeschirmt werden. Eine denkbare Möglichkeit wäre hierbei das Zusammenlagern der Enzyme AAE14 (AtMenE; OSB-CoA Ligase) und DHNS. Somit könnte das Substrat von einer aktiven Tasche in die nächste „geschoben“ werden, ohne hierbei mit der Umgebung in Kontakt zu kommen.

Zur Überprüfung dieser Hypothese müsste ein Folgeversuch unternommen werden, der AAE14/AtMenE als „Hilfsenzym“ der gekoppelten Reaktion verwendet. Sollte es zur Bildung des „AAE14-DHNS-Komplexes“ kommen, so ist es sehr wahrscheinlich, dass dieser Umstand die gesamte Kinetik und ihre Kennzahlen verändert.

Weiterhin ermöglicht der Multi-Enzymkomplex durch die Abschirmung des Substrats eine Optimierung der Pufferbedingungen jenseits des neutralen Bereichs. Vor dem Hintergrund des theoretischen isoelektrischen Punkts der DHNS (pI_{DHNS} 6.48) sowie seiner natürlichen

Lokalisation im alkalischen Milieu liegt das Reaktionsoptimum des Enzyms außerhalb des neutralen Bereichs.

Die Inhibitorskinetik für MOCB-CoA an DHNS zeigte, dass MOCB-CoA mit einem K_i -Wert von 154,3 μM als eher schwacher Inhibitor angesehen werden kann. Das Enzym DHNS weist somit eine höhere Affinität gegenüber dem Substrat OSB-CoA auf als gegenüber dem Inhibitor. Somit müssen größere Mengen an Inhibitor aufgewendet werden, um die Reaktion zum Erliegen zu bringen. Dies wird auch dadurch belegt, dass sich die Reaktion *in-vitro* bis zu einer Wirkstoffkonzentration von 2 mM MOCB-CoA (maximal mögliche Wirkstoffkonzentration) nicht vollständig unterbinden ließ, folglich war die Ermittlung des IC_{50} -Wert (die halbmaximale inhibitorische Konzentration) nicht möglich.

Dieses Ergebnis wird von den Erkenntnissen der *in-silico* Studie untermauert. Der dort ermittelte Glide-Wert von -5,2 charakterisiert MOCB-CoA als „schwachen Binder“ für DHNS. Als ein solcher sollte auch die Affinität des Proteins gegenüber diesem Liganden gering sein.

Der schwachen *in-vitro* Wirkung (kein Unterbinden der Reaktion bei 2 mM MOCB-CoA) steht die stärkere *in-vivo* Wirkung des Inhibitors gegenüber. So waren 50 μM MOCB ausreichend, um Wachstum und Entwicklung der Pflanze umfassend zu hemmen (letale Konsequenz). Die Ursache hierfür ist wahrscheinlich ein Mengenproblem: Es waren 4 μM DHNS im *in-vitro* Test notwendig, um die Kinetik aufnehmen zu können. Die physiologische Proteinkonzentration innerhalb der Pflanze sollte deutlich niedriger sein, weshalb dort niedrigere Hemmdosen ausreichen dürften.

Im Gegensatz hierzu ist für MOCB-CoA am DHNS-Analogon von *M. tuberculosis* (eingesetzt in 100 – 150 nM) ein K_i -Wert von 50 nM beschrieben (Matarlo et al. 2016). Dieses Enzym weist somit eine über 75-mal höhere Affinität zum Inhibitor auf als das Enzym aus *Arabidopsis* (DHNS).

Die mathematische Beschreibung der Inhibitionskinetik von MOCB-CoA an DHNS ergab, dass ihr Modus gegen eine kompetitive Hemmung tendiert, dies findet Ausdruck im α -Wert von 13,89.

Auf Grundlage der Struktur des Inhibitors und seiner strukturellen Ähnlichkeit mit dem Substrat (OSB-CoA) ist dieses Ergebnis plausibel. Somit konkurrieren Substrat und Inhibitor um die aktive Tasche.

Insgesamt ließ sich im Zuge der chemischen Validierung (*in-vitro* Enzym Assay) zeigen, dass DHNS mittels MOCB-CoA gehemmt werden kann. Der „Angriffspunkt“ der Inhibition konnte

somit, aufbauend auf den Ergebnissen der phänotypischen Validierung (Komplementationsstudie), weiter eingegrenzt werden.

IX.1.3 Genetische Validierung – Überexpression und *Knockdown* von *DHNS* (At1g60550)

Zur genetischen Validierung des potenziellen Wirkstoffziels DHNS sowie der weiteren Festigung der Wirkstoff-Wirkort-Beziehung mit MOCB erfolgte die Erstellung mehrerer transgener Linien. In einer Überexpressions-Linie wurde, durch Einfügen des für DHNS kodierenden Gens in eine starke Promotoren-Kassette, dessen Transkription artifiziell erhöht. Demgegenüber wurde in den Knockdown-Linien die Proteinproduktion für DHNS mittels des RNSi-Effekts herunterreguliert.

IX.1.3.1. Erhöhung der Toleranz gegenüber MOCB mittels Überexpression der *DHNS* (At1g60550)

Die Überexpression hatte in der T₂-Generation, in Abwesenheit des Inhibitors (MOCB), keinen erkennbaren Effekt auf das Pflanzenwachstum. Demgegenüber konnten bei dessen Präsenz in der T₂-Generation Pflanzen selektiert werden, die gegenüber 20 µM des Inhibitors MOCB eine höhere Toleranz aufwiesen als die so inhibierten Wildtyp-Pflanzen (Abbildung 51, Seite 95).

Sie wiesen eine intensivere Grünfärbung und fortgeschrittenere Entwicklung auf. Der Phänotyp ähnelte somit den Pflanzen ohne Beaufschlagung durch den Inhibitor.

Bei weiterer Dosissteigerung des Inhibitors konnten die Wirkungseffekte nicht durch die Überexpression kompensiert werden (beide, Wildtyp und Überexpressions-Line, wiesen fahl-grünlichen Phänotyp mit Wachstumsdepression auf).

Durch eine vermehrte Bildung des aktiven Ziel-Proteins (DHNS) kann der Effekt des Inhibitors in Grenzen kompensiert werden. Folglich bedarf es einer höheren Inhibitorkonzentration für eine adäquate Hemmung, Ähnliches ist aus herbizidtoleranten Unkräutern bekannt (Gaines et al. 2020). Dies kann als weiterer Beleg für die Wirkstoff-Wirkort-Beziehung von MOCB zu DHNS gewertet werden.

IX.1.3.2. *Knockdown*-Linien mittels RNSi-Effekts – unerwartete Effekte auf die Samenbildung

Zugrunde lag der Gedanke, dass das Herunterregulieren des Wirkstoffziels DHNS zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber dem Inhibitor MOCB führen sollte; somit zur Induktion eines gegenteiligen Effekts zur Überexpressions-Linie.

Daher wurde das Wachstum von Pflanzen der T₂-Generation der RNSi-Linien ohne und mit Gegenwart des Inhibitors MOCB betrachtet. Hierbei kam es jedoch zu keinen erkennbaren phänotypischen Unterschieden zwischen RNSi-Linie und Wildtyp.

Zur Überprüfung, ob dieses Ergebnis durch Heterozygotie bedingt ist, erfolgte eine Kultivierung mehrerer T₁-Pflanzen zur Gewinnung von Samen für die T₂-Generation.

Bei Betrachtung der Samenentwicklung stellten sich unerwartete Auffälligkeiten ein. So kam es innerhalb der Schoten der RNSi-Linien zu Leerstellen beziehungsweise verkümmerten Samenanlagen, die augenscheinlich auf die vorausgegangene Transformation mit einem der RNSi-Konstrukte zurückzuführen waren (ausgedrückt durch Tabelle 16 und Abbildung 53, Seite 98).

Das Verhältnis von Leerstellen zu potenziell möglicher Anzahl an Samen bewegt sich im Mittel zwischen 21 – 34 % (somit circa $\frac{1}{4}$), was die Vermutung nahelegt, dass es beim Vorliegen eines homozygoten Genotyps (bezüglich des RNSi-Konstrukts) zu verkümmerten Samen oder Leerstellen kommt. Eine klare Begründung für diesen Fund kann auf Grundlage des aktuellen Wissensstands nicht getroffen werden, da die Rolle von Phylloquinon im Entwicklungsprozess der Samen noch nicht ausreichend ergründet ist.

Das Transkriptom von *A. thaliana*-Embryonen weist laut Literatur auf das Vorliegen von DHNS hin, obwohl innerhalb des Samens keine Photosynthese betrieben wird und für diese somit keine Notwendigkeit zur Produktion von Phylloquinon bestünde (Hofmann, Schon & Nodine 2019; Gu et al. 2018). Jedoch übt Phylloquinon neben seiner primären Rolle innerhalb von Photosystem I auch eine physiologische Funktion in der Knüpfung von Disulfidbrücken innerhalb des Thylakoidlumens aus (Furt et al. 2010; Karamoko et al. 2011). Sein Fehlen könnte eine der möglichen Erklärungen für die resultierenden Leerstellen sein.

Eine weitere hypothetische Deutung der gestörten Samenentwicklung stellt der im Teilbereich *in-vivo* Aktivität erläuterte Umstand dar, dass DHNA (Intermediat der Phylloquinon-Synthese; der DHNS-Reaktion nachgelagert) ein elementarer Verzweigungs-Ausgangspunkt für die

Synthese weiterer 1,4-NQs (1,4-Naphthoquinone) ist (McCoy et al. 2018; Widhalm & Rhodes 2016). Während diese im vorherigen Kontext vornehmlich der Abwehr von Schadorganismen sowie anderer Pflanzen zugeordnet wurden, kann ein Mitwirken von Stoffen dieser Gruppe bei Entwicklung und Stoffwechselwegen innerhalb des Samens nicht ausgeschlossen werden.

Dem stehen jedoch die Ergebnisse der literaturbekannten KO-Linien einiger Gene des Stoffwechselwegs gegenüber. Hier war es möglich, trotz eines T-DNS basierten Knockouts, nachweislich homozygote Pflanzen zu erhalten, die dennoch auf zuckerhaltigem Medium bedingt kultiviert werden konnten (Kim, van Oostende, Basset & Browse 2008; Gross et al. 2006; Garcion et al. 2008). Sollten die Enzyme der Phylloquinon-Synthese schon während der Samenentwicklung eine essenzielle Rolle spielen, so hätten dort in gleicher Weise abgetriebene Samen resultieren müssen.

Für sämtliche Gene der Phylloquinon-Synthese liegen bereits KO-Mutanten laut umfangreicher Literatur vor (letal und nicht letal; siehe Tabelle 1, Seite 26). Die einzige Ausnahme bildet DHNS, aus bisher unbekanntem Gründen. Spekulativ können die Ergebnisse der hier beschriebenen RNSi-Linien einen Hinweis liefern, dass die DHNS (im Gegensatz zu den anderen Enzymen des Stoffwechselwegs) auch eine Rolle in der Samenentwicklung spielt und in ihrer Abwesenheit (Knockout oder starker Knockdown) keine homozygoten Samen gebildet werden können. Die resultierenden Samen sind folglich nur heterozygot oder nicht transgen.

Allerdings könnten auch sekundäre Effekte des RNSi-Konstrukts zur Störung der Samenentwicklung geführt haben. Anteile der aus der shRNS (RNS in Haarnadelstruktur; ~ 300 bp) generierten siRNS (kurze interferierende RNS-Segmente 20 - 28 bp) könnten neben den Transkripten der DHNS ebenfalls weitere Transkripte binden und somit multiple Prozesse beeinflussen. Zu einem ähnlichen Schluss kamen *Majumdar et al.* und *Masanga et al.*, deren RNSi-Linien gleichfalls Leerstellen innerhalb der Schoten aufwiesen, obwohl der von ihnen induzierte RNSi-Effekt nicht auf den pflanzlichen Organismus, sondern auf einen ihn befallenden Pilz abzielte (Majumdar, Rajasekaran & Cary 2017; Masanga et al. 2015).

Die genetische Validierung der DHNS als Wirkstoffziel war zusammenfassend überwiegend erfolgreich. In der Überexpressions-Linie konnte eine höhere Toleranz der Pflanzen gegenüber dem Inhibitor erreicht werden; die Validierung war somit erfolgreich.

In den *Knockdown*-Linien war die Validierung nicht eindeutig. Dies könnte mit bisher ungeklärten Auswirkungen des *Knockdowns* der DHNS auf die Samenbildung zusammenhängen (kein Entstehen von homozygoten Samen).

Für den fehlenden Teil der genetischen Validierung der DHNS als Wirkstoffziel zukünftiger Herbizide müssen somit Folgeversuche unternommen werden, um den essenziellen Charakter des Proteins eindeutig zu bestätigen.

Zu diesem Zweck wäre anstelle der KD-, die Erstellungen einer KO-Linie hilfreich, beispielsweise mittels CRISPR/Cas, was ein gezieltes, verlässliches und totales Ausschalten des betreffenden Gens ermöglicht. Hierbei könnte auch die Samenentwicklung evaluiert werden, um die spekulativen Effekte zu überprüfen (vermutete Beeinflussung der Samenbildung durch Abwesenheit von DHNS).

Sollte der RNSi-Effekt weiterhin genutzt werden, so wären induzierbare Linien für die Erhöhung der Aussagekraft förderlich. Damit wäre es möglich, erst durch Zugabe eines Agens (beispielsweise 17β -Estradiol), gezielt die Produktion der shRNS anzuregen. Ohne Zugabe dieses Aktivators bleibe die Promotor-Kassette inaktiv und sollte daher keine ungewollten Auswirkungen auf die Samenbildung haben (Guo, Fei, Xie & Chua 2003).

IX.1.4 *In-silico*-Studie – Bestärkung der *in-vitro*-Ergebnisse

Im Zuge der *in-silico* Studie konnte gezeigt werden, dass sich der aktivierte Inhibitor MOCB-CoA computergestützt in eine der aktiven Taschen des Homohexamers der DHNS einfügen lässt.

Die dreidimensionale Struktur des Proteins wurde hierfür auf Grundlage des *E. coli* Analogons EcMenB mittels Homologie-Modellierung erstellt.

Aufgrund der stärkeren Konservierung der Tertiärstruktur (Faltung des Proteins, im Vergleich zu seiner Aminosäuresequenz) kann anhand einer bereits aufgeklärten dreidimensionalen Struktur eines Analogons auf die Faltung eines möglichen Zielproteins (mit bekannter ähnlicher Aminosäuresequenz) geschlossen werden (Bajaj & Blundell 1984; Abeln, Feenstra & Heringa 2019). Die Güte der Vorhersage hängt hierbei von der strukturellen und sequenziellen Identität zwischen „Vorlage“ und Zielprotein ab. Das resultierende Homologie-Modell von DHNS wies einen GDT-Wert von 0,82 auf, dies kann als eine Übereinstimmung von 82 % gewertet werden, was insgesamt für eine recht präzise Strukturvorhersage spricht.

Basierend auf diesem 3D-Modell war es möglich, den aktivierten Inhibitor MOCB-CoA computergestützt in die aktive Tasche zu docken und seine Stabilisierung zahlenmäßig fassbar

zu machen. Insgesamt ergab sich für MOCB-CoA ein Glide-Score von -5,2, dies klassifiziert den Inhibitor als einen „schwachen Binder“.

Das Ergebnis dieser Untersuchung hat für sich genommen keinen Beweischarakter, es hilft viel mehr bei der Interpretation der Ergebnisse der *in-vitro* Studie sowie bei der Beantwortung der Frage, ob der Wirkstoff theoretisch gebunden werden kann. So lässt sich der *in-vitro* ermittelte K_i -Wert (154,3 μM) vor dem Hintergrund der allgemein schwachen Bindung besser begründen.

Einschränkend ist zu sagen, dass das Einfügen des Wirkstoffs in das digital konstruierte 3D-Modell der DHNS einer Voreingenommenheit unterliegt. Dieses basiert auf der Kristallstruktur von EcMenB, das bekanntermaßen von MOCB-CoA inhibiert werden kann. Die Inhibierbarkeit der „Vorlage“ wird mit einiger Verlässlichkeit auf das konstruierte Modell übertragen.

IX.1.5 Strukturbasierte Betrachtung des Inhibitors MOCB

Wie schon zuvor erwähnt, weist die Strukturformel des Inhibitors MOCB eine Ähnlichkeit zum Substrat der von DHNS katalysierten Reaktion auf. Anders als beim Substrat erfolgt die Aktivierung laut Literatur mittels CoA jedoch nicht an der Carboxy-Gruppe (1. Kohlenstoff), sondern an der Doppelbindung zwischen dem 2 und 3 Kohlenstoffatom durch eine Michael-Addition (Li et al. 2011c; Matarlo et al. 2016) (siehe Abbildung 67). Matarlo et al. bewiesen mittels hochauflösender Massenspektroskopie, dass diese Form des Inhibitors im Zellextrakt von mit MOCB-behandelten MRSA-Zellen gefunden werden kann (Matarlo et al. 2016). Hierbei zeigte sich weiterhin, dass die Esterbindung innerhalb der Zellen nicht gespalten wird. Dieser Befund widerspricht der strukturbasierten Hypothese, dass es sich bei MOCB um einen sogenannten Resorptionsester handelt. Als solche werden Wirkstoffe bezeichnet, deren Hydroxy- beziehungsweise Carboxygruppe mittels Veresterung lipophiler gemacht werden, um eine bessere Resorption zu gewährleisten. Innerhalb der Zelle werden diese Esterbindungen durch Hydrolasen gespalten, wodurch die aktive Wirksubstanz entsteht. Ein Resorptionsester ist somit eine Form von Prodrug beziehungsweise Proherbizid (Casida 2017).

Bezüglich der Metabolisierung des Wirkstoffs innerhalb der Pflanzenzelle muss überprüft werden, ob diese mit der Literatur übereinstimmt, oder ob es zur Spaltung der Esterbindung kommt. Durch diese Spaltung würde sich ein weiterer Modus zur Aktivierung des Wirkstoffs an der Carboxygruppe (Kohlenstoffatom 1 in Abbildung 67) eröffnen. Der resultierende so

aktivierte Inhibitor sollte ebenfalls einer Prüfung im *in-vitro* Test unterzogen werden, um den Einfluss der Position der CoA-Gruppe zu überprüfen.

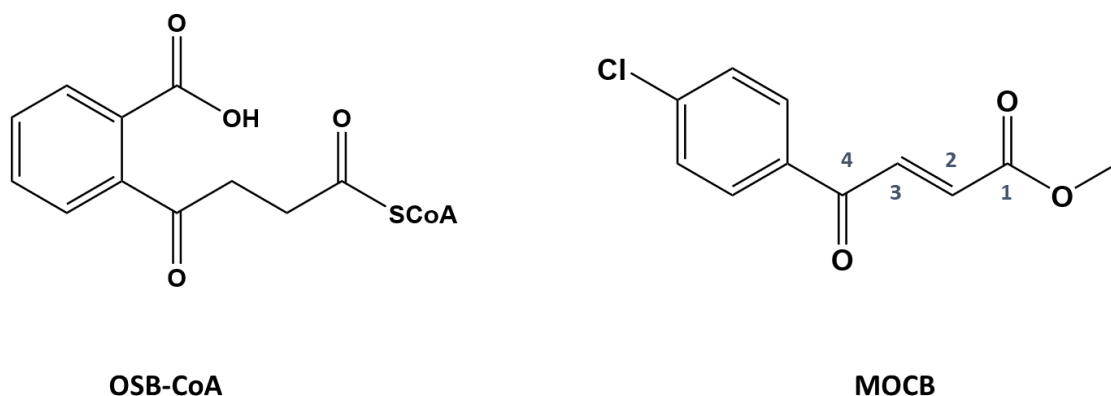


Abbildung 67

Strukturformeln von OSB-CoA und MOCB zur Diskussion möglicher Modi der Aktivierung sowie allgemeiner Wirkstoffabwägung

Eine weitere, sich aus der Strukturformel ergebende Frage ist die nach der Selektivität des Inhibitors. Die Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen 2 und 3 ergibt für MOCB den zusätzlichen Charakter eines α, β -ungesättigten Ketons. Dieses Strukturmotiv wird den sogenannten „PAINS“ (*pan assay interference compounds*) oder „Frequent Hitters“ zugerechnet (Baell & Holloway 2010; Baell & Nissink 2018). Unter dieser Bezeichnung versteht man Verbindungen, die in einer Vielzahl unterschiedlicher biochemischer Tests zu einem positiven Ergebnis führen (somit als Inhibitoren eines Zielproteins erkannt werden). Bei diesen „Treffern“ handelt es sich jedoch um Artefakte - ihre Aktivität hängt nicht von einer spezifischen, wirkstoffähnlichen Wechselwirkung zwischen Molekül und Protein ab. Während ein „echter“ Wirkstoff ein Protein spezifisch durch Anlagerung an eine Bindungsstelle inhibiert, weisen diese Artefakte eine zerstörerische Reaktivität auf, die zu falsch-positiven Signalen in einer Vielzahl von Tests führen (Baell & Walters 2014). Obwohl MOCB dieses Strukturmotiv aufweist, können die Notwendigkeit seiner Aktivierung sowie die Möglichkeit, ihn mittels Homologiemodellierung in das potenzielle Wirkstoffziel einzufügen, als starke Hinweise für seine Spezifität gewertet werden. Jedoch sollten Folgestudien unternommen werden, um einerseits die Spezifität zu beweisen und andererseits den Inhibitor dahingehend weiterzuentwickeln, eine höhere Wirkung zu erzielen.

Als Ausgangspunkt können hierbei die bereits überprüften Strukturanaloga (siehe Abbildung 22, Seite 54) dienen. Die Analoga, deren teilweise stärkere *in-vivo* Aktivität bereits gezeigt werden konnten, wiesen zum Teil nur eines der aktiven Zentren von MOCB auf. Ein *in-vitro*-Test mit

diesen Wirkstoffen sollte daher ein umfassenderes Verständnis für die Aktivierung und Wirkung vermitteln können.

IX.1.6 Ausblick: DHNS als Ziel zukünftiger Herbizide

Die präsentierten Ergebnisse zeigen, dass die DHNS mittels des Wirkstoffs MOCB in ihrer Aktivität gehemmt werden kann. Dieser Effekt konnte sowohl *in-vivo* (phänotypisch) als auch *in-vitro* abgebildet werden. Weiterhin war es möglich, mittels Komplementation mit einem post-DHNS-Intermediat und einer Überexpressionslinie die Effekte des Inhibitors teilweise zu kompensieren. Basierend auf diesen Ergebnissen kann die DHNS, für die durch MOCB schon ein erster Inhibitor bekannt ist, als neues Wirkstoffziel für Herbizide angesehen werden.

Die nun folgenden Schritte umfassen die Weiterentwicklung des *in-vitro*-Tests, um diesen innerhalb eines Hochdurchsatzscreenings verwenden zu können. Dies ermöglicht es, eine große Wirkstoffbibliothek innerhalb von kurzer Zeit für dieses Ziel zu testen und so weitere Leitstrukturen zur Entwicklung potenterer Inhibitoren zu finden.

Parallel dazu können, basierend auf der Struktur von MOCB, weitere Wirkstoffe entwickelt werden, um somit zu stärkeren Inhibitoren zu kommen.

Vor der Etablierung des oben genannten miniaturisierten *in-vitro* Tests müssen jedoch einige offen gebliebene Fragen beantwortet werden:

So sollte der nächste Schritt darin bestehen abzu prüfen, ob die Verwendung des Arabidopsis-Enzyms AAE14 als Hilfsenzym der Reaktion (anstelle von EcMenE) zu einer veränderten Enzymkinetik führt. Hieraus kann sich weiterhin die Forschungsfrage ergeben, ob AAE14 und DHNS einen Multi-Enzym-Komplex bilden, der das instabile Intermediat OSB-CoA zwischen den Reaktionszentren transferiert.

Basierend auf diesem Wissen sollte zusätzlich das Milieu des Reaktionspuffers angepasst werden, um das Reaktionsoptimum der Enzyme abbilden zu können.

Darüber hinaus könnte mittels Folgestudien ein umfassenderes Testsystem, basierend auf dieser gekoppelten Reaktion, etabliert werden. Durch Tests an den Enzymen repräsentativer Vertreter von Unkräutern (Dikotyle) und Ungräsern (Monokotyle) sowie von Bakterien (bspw. *E. coli*) kann die Spezifität der gefundenen Wirkstoffe zusätzlich geprüft werden. Somit ließe sich die

Wirkung eines künftigen idealen Herbizids auf pflanzliche Untergruppen eingrenzen, beziehungsweise eine neutrale Wirksamkeit gegenüber Bakterien erreichen.

Weiterhin sollte der Nachweis des aktivierten MOCB innerhalb der Pflanze erfolgen, um somit den Modus der Aktivierung innerhalb des pflanzlichen Organismus zu kennen und, basierend auf diesem Wissen, zukünftige Wirkstoffe optimieren zu können.

Für eine Weiterverfolgung des *in-silico* Ansatzes wäre die Aufnahme der Kristallstruktur der DHNS elementar. Basierend auf dieser Struktur sollte es möglich sein, virtuelle Wirkstoffscreenings für dieses Ziel durchzuführen und somit die Grundgesamtheit der real zu testenden Stoffe weiter einzuschränken.

Zur weiteren Charakterisierung der biologischen Wertigkeit der DHNS sollten zusätzliche transgene Linien erstellt werden, die sich mit dem Ausschalten (Knockout) beziehungsweise Herunterregulieren (Knockdown) des Gens befassen. Es gilt zu überprüfen, ob DHNS essenziell für das Überleben der Pflanze ist und ob es bei einem KO ebenfalls zu einer gestörten Samenentwicklung kommt.

X. Teil II: Identifikation des Wirkorts von Psoromsäure

Innerhalb des Themenschwerpunkts „Identifikation des Wirkorts der Psoromsäure“ galt es zu zeigen, dass Psoromsäure einen phänotypisch feststellbaren Effekt auf den pflanzlichen Organismus ausübt und weiterhin zu überprüfen, ob dieser Effekt mit Änderungen im Spleißmuster (Auftreten von fehlgespleißten Transkripten) einhergeht.

X.1.1 Phänotypische Überprüfung von Effekten von Psoromsäure auf Arabidopsis-Keimlinge

Innerhalb des Teilbereichs *in-vivo* Aktivität konnte gezeigt werden, dass Psoromsäure einen Einfluss auf den Phänotyp von Arabidopsispflanzen ausübt. Dieser bestand primär in einer Verzögerung von Entwicklung und Wachstum, Auswirkungen auf die Färbung der Sprosslinge waren jedoch nicht zu sehen.

Mit ansteigender Wirkstoffkonzentration stellte sich allgemein eine Verzögerung in Wachstum und Entwicklung bezüglich der gesamten Pflanze ein, dabei trat ein weiterer Effekt im Bereich

des Wurzelwachstums zu tage. Bei einer Wirkstoffkonzentration von 25 μM beschränkte sich das Wurzelwachstum vornehmlich auf die Bildung von Seitenwurzeln, eine klare Primärwurzel war nicht zu erkennen (siehe Abbildung 58, Seite 104).

Dieser Phänotyp des Wurzelwachstums könnte mit Störungen innerhalb des Spleißens erklärt werden. So lösen die Inhibitoren, die die SF3B1-Unterheit des Spleißosoms zum Ziel haben, einen ähnlichen Phänotyp aus (Ling et al. 2017; AlShareef et al. 2017). Weiterhin zeigten KO-Mutanten der integralen Spleißosom-Komponente CWC 15 in gleicher Weise keine klar ausgebildete Primärwurzel, sondern einen breiten Wuchs aus Seitenwurzeln (Slane et al. 2020).

Insgesamt stellt das Mangelwachstum per se keinen belastbaren Beweis für seine kausale Verursachung durch Psoromsäure-induziertes Fehlspleißen dar. Dieser abnorme Wurzelphänotyp kann ebenfalls durch gestörte Wechselwirkungen der Phytohormone (Qin, He & Huang 2019) ausgelöst werden. Diese müssen in keinem Zusammenhang mit fehlgespleißten Transkripten stehen.

Bei einer Erhöhung der Wirkstoffkonzentration auf 75 μM kam es lediglich zu einem rudimentären Aufkeimen der Sprösslinge (folglich letale Effekte), weiterhin kam es zum Ausflocken des Wirkstoffs innerhalb des gelierten Mediums.

Da es nicht möglich ist, nur auf Grundlage des Phänotyps das Auftreten fehlgespleißter Transkripte festzustellen, erfolgte ein Versuch zu deren Detektion mittels Transkriptom-Analyse. Zur Gewährleistung einer gleichmäßigen Probenqualität, wurden Pflanzen in Flüssigkultur als Pflanzenballen über sieben Tage angezogen und daraufhin durch Wechsel des Mediums mit dem Wirkstoff beaufschlagt.

Die Anzucht in Schüttelkultur (anstatt von festem Medium) ermöglichte es, die Konzentration der Psoromsäure auf 100 μM zu erhöhen. Wie aus den Platten der *in-vivo* Studie ersichtlich, war es bei festem Medium zum Ausflocken des Wirkstoffs schon bei einer Konzentration von 75 μM gekommen. Es blieb somit unklar, wie hoch die für die Keimlinge real-verfügbare Wirkstoffkonzentration in diesem plattenbasierten Testdesign war. Da der Wirkstoff innerhalb der Flüssigkultur jedoch vollständig gelöst werden konnte, kann von einer ausreichenden Verfügbarkeit für die Pflanzen ausgegangen werden. Die illustrierte schlechte Löslichkeit des Wirkstoffs innerhalb des Mediums der Platten (wässriges Milieu, geliert) wirft jedoch generell die Frage auf, wie gut Aufnahme und Verteilung des Wirkstoffs sind. Eine durch begrenzte Löslichkeit bedingte Verfügbarkeit der Psoromsäure für den Zielorganismus klassifiziert den Inhibitor schon per se als schlechtes Herbizid. Für eine umfassendere Charakterisierung des Wirkstoffs müsste daher die Pharmakokinetik in Folgeversuchen betrachtet werden.

Ein vielversprechender Ansatzpunkt hierzu findet sich im von *Herklotz et al.* vorgestellte Versuchsaufbau. Hierbei werden Pflanzen hydroponisch kultiviert und mittels des Flüssigmediums über die Wurzeln mit dem Wirkstoff beaufschlagt. Nach definierten Zeitpunkten können Pflanzen geerntet und, aufgeteilt in Wurzel, Blatt und Stängel, massenspektroskopisch analysiert werden (Herklotz, Gurung, Vanden Heuvel & Kinney 2010). Durch dieses Vorgehen kann die Aufnahme und Wirkstoffverteilung über den Organismus im Laufe der Zeit betrachtet und weiterhin potenzielle Metaboliten identifiziert werden.

In einer vorgeschalteten Pilotstudie blieben in der hier eingesetzten Schüttelkultur phänotypische Effekte, durch Behandlung der sieben Tage alten Pflanzen mit 100 μM Psoromsäure, nach 24 Stunden aus. Diese belegte, wie Voraussetzung für diesen Sequenzierungsversuch, eine zur Erzielung sofortiger letaler Konsequenzen noch nicht hinreichende Wirkstoffkonzentration.

Eine umgehend letale Dosis hätte auf Ebene der Transkripte vornehmlich die dem Zelltod zugeordneten Transkript-Spezies induziert und somit das Spektrum an detektierbaren Transkripten stark eingeschränkt. Weiterhin wäre es im Zuge der Apoptose zu einem rapiden Abbau von Poly-A-RNS und somit zu Einbußen bezüglich Qualität und Aussagekraft der isolierten Sequenzen gekommen (Liu et al. 2018; Thomas et al. 2015).

X.1.2 Bioinformatisch gestützte Suche nach fehlgespleißten Transkripten

Nach der „Ernte“ der Proben (Pflanzenballen aus Flüssigkultur) sowie dem Erstellen der cDNS-Bibliotheken erfolgte die Sequenzierung. Das hierfür verwendete Design umfasste ~ 40 Millionen *reads* pro Probe mit einer Länge von 150 Basenpaaren im gepaarten-Enden-Modus. Dieses Vorgehen wurde gewählt, um einerseits eine möglichst hohe und diverse Anzahl der vorliegenden Transkripte abbilden zu können und andererseits die computergestützte Zuordnung der *reads* zu den betreffenden Genen zu erleichtern.

Nach einer initialen Qualitätskontrolle sowie dem Zuordnen der *reads* erfolgte die computergestützte Suche nach fehlgespleißten Transkripten, mittels des Programmpakets eisaR.

Dieses grenzte die Anzahl der zu betrachtenden Transkripte mittels einer zu erreichenden Mindestanzahl an *reads* pro Exon und Intron je Genort ein (normalisierter und logarithmierter Wert von ≥ 5). Dieses Kriterium garantierte, dass die Analyse durch Genorte mit nur geringem

read-count nicht verzerrt wurde. Andererseits wurde die Analyse damit weniger empfindlich gegenüber dem Auftreten von selteneren Ereignissen.

Der Anteil an fehlgespleißten Transkripten, die mittels der empfohlenen Logik von eisaR gefunden werden konnten, belief sich bei Psoromsäure auf 6,5 % (t = 1 h) beziehungsweise 5,7 % (t = 6 h) der Gene von *A. thaliana*.

Die auf dieser Liste aufbauende weitere Analyse ergab eine Anzahl von 92 (t = 1h) / 290 (t = 6h) Genen, für die, im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (0,2 % DMSO), fehlgespleißte Transkripte mit hoher Signifikanz gefunden werden konnten (FDR von $\leq 5\%$).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Behandlung der Pflanzen mit Psoromsäure zu einem Verbleib von Introns innerhalb der mRNS führen. Folglich konnte die initiale These bestätigt werden, dass Psoromsäure den Prozess des Spleißens beeinflusst.

Bei Betrachtung des PRI-Werts (Prozent retinierter Introns) dieser fehlgespleißten Transkripte zeigt sich allerdings, dass Psoromsäure (Tabelle 17, Seite 111) bei nur circa 2 % der Transkripte pro Genort zu retinierten Introns führt. Vereinzelt kommt es zwar zu PRI-Werten oberhalb von 50 %, jedoch weist die Negativ-Kontrolle (0,2 % DMSO) für die Transkripte dieser Genorte ebenfalls erhöhte Werte für retinierte Introns auf. Eine Eingrenzung auf „Schlüssel-Effektoren“ (Genorte, deren Transkripte besonders stark betroffen sind) für den herbiziden Effekt der Psoromsäure ist somit nicht möglich.

Im Vergleich hierzu wiesen die mit Herboxidien (Positiv-Kontrolle) behandelten Pflanzen rund 2000 fehlgespleißte Transkripte auf, deren PRI-Werte im Median bei 9 – 18 % lagen, und dies bei einer 20-fach niedrigeren Wirkstoffkonzentration.

Psoromsäure ist somit im Vergleich zu Herboxidien ein zwar grundsätzlich wirksamer, aber schwacher Inhibitor.

So blieb die Frage offen, wie sich die im *in-vivo*-Test gesehene herbizide Wirkung der Psoromsäure erklären lässt.

Ob ihr inhibitorischer Effekt die Transkripte mancher Prozesse oder Zellbestandteile in besonderer Weise betrifft, wurde daher mittels des Classification SuperViewers geprüft. Diese Analyse konnte jedoch keine „Bevorzugung“ dieser Art finden. Das Auftreten fehlgespleißter Transkripte scheint vielmehr, nach stochastischer Erwartung, einzig von der Anzahl der vorliegenden Transkripte pro Gen abzuhängen. So fand sich das Gros der detektierten Ereignisse innerhalb der Transkripte der 6000 am höchsten exprimierten Genen. Dies trifft in gleicher Weise auf die Wirkung von Herboxidien zu. Die Inhibition des Spleißens erfolgte bei

beiden Wirkstoffen, dem Anschein nach, unselektiv (siehe Abbildung 62 und Abbildung 63, Seite 112 - 114).

Eine weitere Erklärung für den herbiziden Effekt könnten Fehlspleißungen für Transkripte von solchen Genen sein, die als essenziell gelten.

Aus der entsprechenden Analyse ergab sich, dass für insgesamt elf essentielle Gene (3 für $t = 1$ h; 9 für $t = 6$ h) fehlgespleißte Transkripte vorlagen. Hierbei entfiel jedoch, bis auf zwei Ausnahmen, lediglich ein geringer Anteil der detektierten Sequenzen auf Introns ($\leq 1,5$ %), somit war der resultierende Anteil der fehlgespleißten Transkripte dieser Gene sehr gering (siehe Tabelle 19, Seite 115).

Innerhalb der Transkripte der Gene At5g12840 und At4g02510 entfielen 5,02 % beziehungsweise 14,93 % der *reads* auf Introns. Für diese Genorte konnte jedoch auch innerhalb der mit DMSO-behandelten Proben (Negativ-Kontrolle) ein Anteil an intronischen *reads* von 4,50 % beziehungsweise 8,04 % festgestellt werden.

Der Umstand, dass selbst die Negativ-Kontrolle für diese Transkripte intronische *reads* aufwies, vermindert die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei den durch Psoromsäure fehlgespleißten Transkripten dieser Gene um den Auslöser des herbiziden Effekts handeln sollte.

Insgesamt konnte mit der gewählten Analysemethode kein individueller Effektor für den herbiziden Effekt der Psoromsäure identifiziert werden. Der Auslöser für die Verzögerung des Wachstums und das Ausbleiben der primären Wurzel kann viel mehr in der Gesamtheit der fehlgespleißten Transkripte vermutet werden. Der Effekt bestünde, falls überhaupt durch Fehlspleißen bedingt, somit aus deren Summationswirkung über einen längeren Zeitraum.

X.1.3 Biochemische Validierung des tatsächlichen Vorliegens fehlgespleißter Transkripte

Zur Überprüfung, ob es sich bei den per Computeranalyse detektierten Ereignissen tatsächlich um fehlgespleißte Transkripte handelt, wurde für eine willkürliche Auswahl derselben eine biochemische Validierung, basierend auf RT-PCR, durchgeführt. Hierbei wurden Primer in potenziell Intron-flankierende Exons gesetzt, um so für den Fall eines Verbleibs des Introns innerhalb der Sequenz eine größere Bande zu erhalten.

Insgesamt konnten für alle der ausgewählten computeranalytisch gefundenen Ereignisse tatsächlich fehlgespleißte Transkripte so nachgewiesen werden (es ergaben sich jeweils Banden für zwei unterschiedliche Fragmentgrößen).

Auch die mit eisaR gefundenen zeitlichen Unterschiede im Auftreten von Fehlspleißungen unter Psoromsäure konnten mittels RT-PCR größtenteils bestätigt werden.

Abbildung 66 (Seite 120) zeigt die Auswahl der mittels eisaR nach jeweils 1 h (links) beziehungsweise nach 6 h (rechts) detektierten Fehlspleiß-Ereignisse. Diese durch die Computeranalyse getroffenen Erwartungen konnten mittels RT-PCR für die jeweiligen Zeitpunkte (durch die beobachteten Doppelbanden) validiert werden. Wo eisaR Fehlspleißen nach 1 h und nicht nach 6 h findet, resultieren in der RT-PCR auch nur dort entsprechende Doppelbanden (linke Bildhälfte). Analoges gilt für die 6 h-Spanne (rechte Bildhälfte).

Die mittels eisaR gefundenen Ereignisse (für 1 h und 6 h) wurden zusätzlich mittels RT-PCR auf Transkripte von Pflanzen, die 12 h mit Psoromsäure behandelt wurden, untersucht.

Banden für fehlgespleißte Transkripte konnten hier nur da gefunden werden, wo auch schon bei 6 h ein Fehlspleißen gezeigt wurde. Die Intensität, der auf Fehlspleißung hinweisenden Banden war jedoch schwächer als bei 6 h, was auf eine Abnahme des Störeffekts durch Psoromsäure hindeuten könnte.

Der Wirkeffekt der Psoromsäure scheint von der Zeit abzuhängen. Die Zunahme der Fehlspleiß-Ereignisse im Laufe der Zeit ($t = 1 \text{ h}$, 92; $t = 6 \text{ h}$, 290) deuten darauf hin, dass das Wirkmaximum nach einer Stunde noch nicht erreicht ist, da nach sechs Stunden etwa dreimal so viele Ereignisse detektiert werden konnten. Die weniger intensiven Banden der Zeitspanne zwölf Stunden deuten auf eine nachlassende Wirkung hin.

Umgekehrt könnte das Verschwinden eines zum Einstunden-Zeitpunkts beobachteten Fehlspleißens nach sechs Stunden darauf hinweisen, dass die Sensibilität der Pflanze gegenüber Psoromsäure von einem Biorhythmus abhängt (1 h um 06:00; 6 h um 12:00; 12 h um 18:00).

Die biochemische Analyse der Transkripte des Gens At5g07880 (siehe Abbildung 66, Seite 120, linke Bildhälfte, rechts unten) stellt indes den Befund von eisaR in Frage. So fand die Computeranalyse für die Zeitspanne 6 h kein Fehlspleißen, die RT-PCR (Spalte P6) hingegen weist eine intensive Bande in der Größe des fehlgespleißten Fragments auf.

Das „Versagen“ von eisaR in diesem Fall ist einerseits der zu strengen Selektion geschuldet, die Transkripte (des Zeitpunkts 6 erreichen nicht die oben beschriebene Minimalanzahl des *read-counts*.

Andererseits könnte dieser Fall auf ein grundsätzliches Problem für die Detektion von retinierten Introns hinweisen. Die gezielte Detektion fehlgespleißter Transkripte und insbesondere retinierter Introns bleibt eine große Herausforderung für aktuelle bioinformatische Werkzeuge. So sind Introns oftmals deutlich länger als Exons und weisen wiederkehrende Sequenzmuster mit geringer Komplexität auf (Aneinanderreihung von einer einzelnen Base oder kurzer Basenmotive in Wiederholung). Diese Umstände erschweren die gezielte Zuordnung intronischer *reads* zu den betreffenden Genorten. Eine Folge hiervon ist oftmals das Verwerfen dieser Sequenzen als sogenannte „*Multi-Mapper*“ (Broseus & Ritchie 2020).

Eine Möglichkeit, diesem Umstand Sorge zu tragen, wäre eine Änderung der Sequenzier-Methodik hin zur Vollängen-Sequenzierung mittels der Systeme von Pacific Biosciences (PacBio) und Oxford Nanopore Technologies (ONT). Die Verwendung von *reads* in voller Transkriptlänge ermöglicht so die genaue Zuordnung zum betreffenden Genort (Byrne, Cole, Volden & Vollmers 2019).

Für eine genauere und umfassendere Analyse der Sequenzdaten bedarf es eines umfassenden Verständnisses der zugrundeliegenden bioinformatischen Methodik sowie der Anforderungen der verwendeten Werkzeuge. Weiterhin muss die durch die Detektionslogik eingeführte Voreingenommenheit gegenüber dem Datensatz kritisch hinterfragt und im besten Falle mittels eines alternativen Programmpakets validiert werden.

Für die Zielsetzung einer grundsätzlichen Detektion fehlgespleißter Transkripte, die durch Psoromsäure induziert wurden, war die hier verwendete Methode jedoch ausreichend.

Zusammenfassend kann aus den vorliegenden Daten somit geschlossen werden, dass 100 μ M Psoromsäure den Vorgang des Spleißens in sieben Tage alten Arabidopsis-Sprösslingen beeinflusst. Es konnten, basierend auf Sequenzierdaten von poly-A-aufgereinigten Transkripten, retinierte Introns gefunden werden, die mittels RT-PCR validiert werden konnten.

Da Psoromsäure das humane Spleißosom innerhalb der Wandlung von B- zu C-Komplex inhibiert, würde eine Verwendung dieses Wirkstoffs als Herbizid zu toxikologischen Problemen führen. Weiterhin zeigen die vorliegenden Daten, dass Psoromsäure zwar das Spleißen inhibiert, dieser Effekt jedoch im Gegensatz zu anderen bekannten Inhibitoren (bspw. Herboxidien) deutlich schwächer ausgeprägt ist. Dies spiegelt sich in der benötigten Aufwandmenge, in der geringen Anzahl der nachgewiesenen fehlgespleißten Transkripte und in deren ebenfalls geringem prozentualen Anteil an retinierten Introns (PRI) wider.

Die Frage, ob der herbizide Effekt der Psoromsäure auf der Induktion von fehlgespleißten Transkripten beruht, bleibt unbeantwortet. Wie bereits innerhalb des Abschnitts II.2.8.2 (siehe Seite 44) erwähnt, weist der Wirkstoff einen inhibitorischen Effekt auf multiple Prozesse (d.h. unabhängig vom Spleißen) bei unterschiedlichen Organismen (beispielsweise Mensch und Plasmodium) auf. Die hier beobachteten phänotypischen Änderungen könnten somit ebenfalls auf Nebeneffekten beruhen.

X.1.4 Ausblick: Spleißen als Ziel für zukünftige Herbizide

Wie durch die vorliegenden Daten gezeigt, ist es möglich, durch Zugabe von Wirkstoffen fehlgespleißte Transkripte zu induzieren und den Prozess des Spleißens an unterschiedlichen „Stufen“ zu inhibieren. Da das Spleißen per se ein essenzieller Prozess ist, führt seine globale Inhibition zu letalen Folgen. Durch die hohe Konservierung der Untereinheiten des Spleißosoms müssen Inhibitoren, die als Herbizid verwendet werden sollen, eine hohe Spezifität aufweisen, um toxikologische Probleme zu vermeiden.

Zur weiteren Verfolgung des Themenkomplexes „Spleißen als Ziel zukünftiger Herbizide“ gilt es Prozesse, Untereinheiten und Kofaktoren zu identifizieren, die keine Entsprechung in höheren Tieren aufweisen.

XI. Allgemeine Einordnung und abschließender Vergleich

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei potenzielle neue Wirkstoffziele für Herbizide beschrieben. Mittels *tool-compounds* war es möglich, erste Versuche für diese Wirkstoffziele zu unternehmen und somit zu überprüfen, ob es sich hierbei um aussichtsreiche Kandidaten für die Entwicklung neuer Herbizide handelt.

Im Jahr 2012 wurden 80 % des globalen Herbizidmarkts (in Geldwert) von nur sieben Wirkmechanismen abgedeckt. Innerhalb dieser bestehen für mindestens vier der Wirkmechanismen ernste Probleme mit resistenten Unkräutern und Ungräsern (etwa 60 % des Markts; Hemmung von: Acetyl CoA Carboxylase, Acetolactat Synthase, Enolpyruvylshikimat-Phosphat-Synthase sowie synthetische Auxine) (Kraehmer et al. 2014). Dies offenbart einen Mangel an Diversität innerhalb der verfügbaren Wirkmechanismen sowie deren Entwicklung. So wurden zwischen 1950 und Mitte der 1980 circa jedes zweite Jahr ein neuer und einzigartiger Wirkmechanismus entdeckt. Dies änderte sich jedoch drastisch, innerhalb der vergangenen 30 Jahre konnte kein neuer Wirkmechanismus mehr identifiziert werden. Als Grund hierfür gelten die hohe Entwicklungskosten, strengere Zulassungsverfahren sowie der immense Erfolg von Glyphosat-resistenten Nutzpflanzen, der (zeitweise) Forschung nach neuen Wirkzielen obsolet machte (Dayan 2019).

In Anbetracht des Anstiegs an herbizidresistenten Unkräutern (ebenfalls für Glyphosat) erlebt die Suche nach neuen Wirkstoffzielen eine Renaissance. Hierbei lässt sich die Herbizidforschung teilweise von „Trends“ aus der Pharmaforschung inspirieren, wie beispielsweise bei dem hier verwendete Wirkstoffziel-basierte Ansatz. Bisher konnte noch kein Herbizid auf diesem Ansatz entwickelt werden, die größte Schwierigkeit stellt hierbei das Überführen von *in-vitro* Wirkung auf *in-vivo* Wirkung dar. Jedoch zeigen Daten aus der Pharmaforschung das immense potential dieses Ansatzes auf. So entstammen 78 der 113 *first-in-class* Wirkstoffe (erster Wirkstoff einer Arzneimittelgruppe), die zwischen 1999 und 2013 bei der FDA registriert wurden, diesem Ansatz (Eder, Sedrani & Wiesmann 2014).

Ein immenser Vorteil liegt hierbei darin begründet, dass initial das zu adressierende Wirkstoffziel gewählt wird und bei dieser Wahl toxikologische Überlegungen beachtet werden können. Die resultierenden Wirkstoffe können somit spezifischer gestaltet werden.

Die Hemmung des Spleißens gilt innerhalb der Pharmaforschung als ein aussichtsreicher neuer Wirkmechanismus in der Krebstherapie. Ebenso ist seine Eignung als herbizides Wirkstoffziel gegeben, da der Spleißvorgang für die Proteinproduktion aller Eukaryoten nötig ist. Die vorliegende Untersuchung konnte die Verwendbarkeit dieses Wirkziels für Herbizide grundsätzlich bestätigen. Durch Gabe des Inhibitors konnten Fehlspleißungen induziert werden, die potenziell zum herbiziden Effekt des Wirkstoffs geführt haben können. Die Hemmung von Pflanzenwachstum durch Eingriffe in den Spleißprozess ist machbar und aussichtsreich. Künftige Forschung sollte den exakten Ansatzpunkt im Spleißvorgang so weit einengen, dass von seiner Hemmung nur pflanzliche Organismen betroffen sind.

Der Eingriff in den Spleißvorgang bei Pflanzen befindet sich noch im Stadium früher Entwicklung. Im Gegensatz hierzu kann die DHNS auf Grundlage der hier präsentierten Daten schon als ein äußerst aussichtsreiches und unmittelbar zu verwendendes Ziel angesehen werden. Die Synthese von Phylloquinon ist essenziell für das Überleben der Pflanze, wie durch KO-Linien in der Literatur illustriert. In tierisch-eukaryotischen Zellen fehlt dieser Syntheseweg, das Risiko für toxikologische Probleme ist somit minimiert. Mittels des *tool-compounds* MOCB ist es möglich, die von DHNS katalysierte Reaktion zu hemmen.

Anhand der hier präsentierten Daten kann ein Hochdurchsatz-Screening auf dem Wirkstoffziel DHNS sowie chemische Optimierungen, aufbauend auf MOCB, durchgeführt werden.

Der Eingriff in die Phylloquinon-Synthese ist zukunftsfruchtig und könnte der erste neue herbizide Wirkmechanismus seit 30 Jahren sein und auch der erste, der mittels Wirkstoffziel-basiertem Ansatz gefunden wurde.

XII. Material und Methoden

XII.1.1 Organismen

XII.1.1.1. E.coli

<i>NEB® 5-alpha Competent E. coli (High Efficiency)</i>	New England BioLabs®
<i>NEB® 10-beta Competent E. coli (High Efficiency)</i>	New England BioLabs®
<i>BL21 (DE3)</i>	New England BioLabs®

XII.1.1.2. Agrobacterium tumefaciens

<i>GV3101 (pMP90)</i>	(Koncz & Schell 1986)
-----------------------	-----------------------

XII.1.2 Sequenzen

XII.1.2.1. MenE (*Escherichia coli*)

Proteinsequenz	MIFSDWPWRHWRQVRGETIALRLNDEQLNWRELCAVDELASGFVQGVVEGSGVMLRAWNTPQTLLAWLALLQ CGARVLPVNPQLPQLLEELLPNLTLQFALVPDGENTFPALTSLHIQLVEGAHAATWQPTRLCSMTLTSGSTGL PKAAVHTYQAHLASAQGVLSLIPFGDHDWLLSLPLFHVSGQGIMWRWLYAGARMTVRDKQPLEQMLAGCTHAS LVPTQLWRLLVNRSSVSLKAVLLGGAAIPVELTEQAREQGIRCFYGLTEFASTVCAKEADGLADVGSPLPGR EVKIVNNEVWLRAASMAEGYWRNGQLVSLVNDEGWYATRDRGEMHNGKLTIVGRDLNFFSGGEGIQPEEVERV IAAHFAVLQVFIIVPVADKEFGHRPVAVMEYDHESVDLSEWVKDKLARFQQPVRWLTLPPELKNGGIKISRQALK EWVQRQQ
DNS-Sequenz	ATGATTTTTAGCGATTGGCCGTGGCGTCATTGGCGTCAGGTTCTGGTGAACCATTGCACTGCGTCTGAATGA TGAACAGCTGAATTGGCGTGAACGTGTGCACGTGTTGATGAACGGCAAGCGGTTTTGCAGTTCAGGGTGTG TTGAAGGTAGCGGTGTTATGCTGCGTGCAATGGAATACACCGCAGACACTGTGGCATGGCTGGCACTGCTGCAG TGTGGTGCCCGTGTCTGCGGTTAATCCGCAGCTGCCGAGCCGCTGCTGGAAGAACTGCTGCCGAATCTGAC CCTGCAGTTTGCAGTGGTCCGGATGGTGAAAATACCTTTCCGGCACTGACCAGCCTGCATATTCAGCTGGTTG AAGGTGCACATGCAGCAACCTGGCAGCCGACACGTCTGTGTAGCATGACCCTGACCAGCGGTAGCACCGGCTG CCGAAAGCAGCCGTTCATACTATCAGGCACATCTGGCCAGCGCACAGGGTGTCTGAGCCTGATTCCGTTTGG TGATCATGATGATTGGCTGCTGAGCCTGCCGCTGTTTCATGTTAGCGGTGAGGGTATTATGTGGCGTTGGCTGT ATGCCGGTGACGTATGACCGTTCGTGATAAACAGCCGCTGGAACAAATGCTGGCAGGTTGTACCATGCAAGC CTGGTCCGACGCACTGTGGCGTCTGCTGGTGAATCGTAGCAGCGTTAGCCTGAAAGCAGTCTCTGTAGGTGG TGACGCAATCCGGTTGAACTGACCGAACAGGCAGTGAACAGGGTATTGCTGTTTTTGTGGTTATGGTCTGA CCGAATTTGCAAGCACCGTTTGTGCAAAAAGAGCAGACGGTCTGGCAGATGTTGGTAGTCCGCTGCCTGGTCTG GAAGTTAAAATTGTTAATAATGAAGTTTGGCTGCGTGCCGCAAGCATGGCCGAAGGTTATTGGCGTAATGGTCA GCTGGTGAGCCTGGTTAATGATGAAGGCTGGTATGCAACCCGTGATCGCGGTGAAATGCATAATGGTAAACTGA CCATTGTTGGTCTGCTGGATAACCTGTTTTTTAGCGGTGGTGAAGGATTACAGCCGAAGAAGTTGAACGCGTT ATTGACGACATCCGGCAGTTCTGCAGTTTTTATGTTCCGGTTCCCGATAAAGAAATTTGGTCACTCGTCCGGT TGACGTGATGGAATATGATCATGAAAGCCTTGATCTGAGCGAATGGGTTAAAGATAAACTGGCACGTTTTACG AGCCGGTTCGTTGGCTGACACTGCCTCCGGAAGTAAAAATGGTGGTATCAAAAATAGCCGTCAGGCACTGAAA GAATGGGTTACAGCTCAGCAG

XII.1.2.2. MenB (*Escherichia coli*)

Proteinsequenz	MIYPDEAMLYAPVEWHDCSEGFEDIRYEKSTDGIAKITINRNPQVRNAFRPLTVKEMI QALADARYDDNIGV IIL TGAGDKAFCSGGDQKVRGDYGGYKDDSGVHHLNVLDFQRQIRTCPKPVVAMVAGYSIGGGHVLHMMCDLTI AAD NAIFGQTGPKVGSFDGGWGSYMARIVGQKKAREIWF LCRQYDAKQALDMLVNTVVPLADLEKETVRWCREML QNSPMALRCLKAALNADCDGQAGLQELAGNATMLFYMTEEGQEGRNAFNQKRQPDFSKFKRNP
DNS- Sequenz	ATGATTTATCCTGATGAAGCAATGCTTTACGCACCGGTTGAATGGCACGACTGCTCCGAAGGTTTCGAGGACATTCGTTATGAAA AATCCACCGACGGTATCGCAAAAATCACCATTATCGTCCGCAGGTGCGCAATGCCTCCGTCCTCTGACGGTAAAAGAGATGAT CCAGGCGCTGGCAGATGCGCGTTATGACGACAACATCGCGGTGATCATTCTGACTGGTGCAGGCGATAAAGCGTTCTGCTCCGGT GGTGACCAGAAAAGTGGTGGTATTACGGCGGCTATAAAGATGATTCGGCGTACATCACCTGAATGTCTGGACTCCAGCGTC AGATCCGTACTGTCCGAAACCGGTTGTCGCGATGGTGGCTGGCTACTCCATCGGCGGCGGTACAGTCTGACATGATGTGCGA CCTGACTATCGCGGAGATAATGCCATCTTCGGTCAGACTGGCCGAAAAGTCCGTTCCCTCGACGGCGGCTGGGGCGCTTCCTAC ATGGCTCGCATCGTCCGGCAGAAAAAGCGCGTGAATCTGGTTCCTGTGCCGTCAGTACGACGCAAAACAGGCGCTGGATATGG GCCTTGTAACACCGTGGTACCCTGGCGGATCTGGAAAAAGAACCGTCCGTTGGTCCGCGAAAATGCTGCAAAACAGCCCGAT GGCGCTGGCTGCCTGAAAGCTGCATGAACCGGACTGTGACGGGACGGCGGGCTGCAGGAGCTGGCGGCAACGCCACCATG CTGTTCTACATGACGGAAGAAGTTCAGGAAGTTCGCAACGCCCTTCAACCAGAAACGTCAGCCTGACTTCAGCAAATTCAAACGGA ATCCG

XII.1.2.3. DHNS/MenB (*Arabidopsis thaliana*)

Proteinsequenz	MADSNELGSASRRLSVVTNHLIPIGFSPARADSVELCSASSMDDRFHKVHGEVPTHEVVWKTDFFEGEDNKEFVDI IYEKALDE GIAKITINRPERRNAFRPQTVKELMRAFNDARDSSVGV IILTKGTFKAFCSGGDQALRTQDGYADPNVGRNLNVLDLQVQIRRL PKPVIAMVAGYAVGGGHI LHMVCDLTI AADNAIFGQTGPKVGSFDAGYGS IMSRLVGPKKAREMFMFTRFYTASEAEKMLINT VVPLEDEKETVWKREILRNSPTAIRVLKAALNAVDGHDGAGLQGLGGDALLFYGTTEEATEGRTAYMHRPPDFSKFHRRP
DNS-Sequenz	ATGGCGGATTCGAATGAGCTTGCTCGGCGAGCGACGACTCTCCGTCGTCACCAATCATCTCATCCCTATCGGATTGATCCAG CTCGTGCTGACTCAGTGAAGTCTGTAGTGCTTCGTCGATGGATGATAGATTCCATAAAGTTACAGGTTGAAGTCCGACCCACGA AGTCGTTTGAAAAAACTGATTTCTTTGGTGAAGGAGATAACAAGGAGTTTGTGATATATTTATGAGAAAAGCCCTTGATGAA GGCATTGCAAAGATTACTATAAACCGGCCAGAGAGAAGAAATGCGTTCGGCCCTCAGACTGTGAAGGAGCTTATGCGTGGCTTTA ATGATGCTAGAGATGATAGCTCTGTAGGAGTCATCACTACCCGCAAGGGAACAAAAGCATTTTGCAGTGGTGGTATCAGGC TTTGAGAACACAAGACGGGTATGCTGATCCCAATGACGTTGGCCGCTTAATGTTCTTGATCTTCAGGTTCAAATCCGAGATTG CCAAAGCCAGTTATTGCAATGGTAGCTGGTTATGCTGTGGAGGAGGACACATTTGCACATGGTCTGCGATCTAACAAATTGCAG CTGATAATGCGATTTTGGTCAAACGGGTCCTAAGGTTGGAAGTTTGTGCTGGTTATGGAAGTTCATCATGTCTCGTCTGGT TGGTCTTAAAAAGGCACGAGAAATGTGGTTTATGACGAGGTTCTACACAGCTTCTGAAGCAGAGAAAATGGGACTTATCAATACA GTTGTACCGCTAGAGGATTTGGAGAAAGAACTGTGAAATGGTGCAGAGAAATCTTACGGAACAGTCCAACTGCAATCCGAGTAC TTAAGGCAGCACTTAATGCAAGTTGATGATGGCCATGCCGGCTTCAGGACTCGGTGGTATGCGACACTCTTATTCATGGAAC CGAAGAAGCTACTGAAGGGAGAAGTCTTATATGCACCCGCCACCCGACTTCTTAATTTACCCGGCGACT

XII.1.3 Konstrukte

Tabelle 20 Auflistung der Konstrukte, die für die rekombinante Überexpression verwendet wurden

Konstrukt	Beschreibung (Protein)	Methode	Verwendetes Material
pET15b- EcMenE	Aus <i>E.coli</i> stammende Version von MenE in nativer Form (EcMenE)	Gibson Assembly	Template: EcMenE-His ₆ Primer: O119, O120, O121, O122; Vektor: pET15b
pET15b- EcMenE-His ₆	EcMenE mit C- terminalem Histidin- Hexapeptid (EcMenE- His₆)	Restriktionsverdau und Ligation	Restriktionsenzyme: <i>NcoI</i> , <i>BamHI</i> T4-DNA-Ligase Vektor: pSE420

pET15b-His ₆ -EcMenE	EcMenE mit N-terminalem Histidin-Hexapeptid sowie TEV-Schnittstelle (His₆-EcMenE)	Gibson Assembly	Template: EcMenE Primer: O127, O128, O129, O121 Vektor: pET15b
pET15b-DHNS	Aus <i>A.thaliana</i> stammende Version von MenB in nativer Form (DHNS)	PCR, Restriktionsverdau und Ligation	Template: His ₆ -DHNS Primer: O96, O97 Restriktionsenzyme: <i>NcoI</i> , <i>BamHI</i> T4-DNA-Ligase Vektor: pET15b
pET15b-DHNS-His ₆	DHNS mit C-terminalem Histidin-Hexapeptid (DHNS-His₆)	Restriktionsverdau und Ligation	Restriktionsenzyme: <i>NcoI</i> , <i>BamHI</i> T4-DNA-Ligase Vektor: pET15b
pET15b-His ₆ -DHNS	DHNS mit N-terminalem Histidin-Hexapeptid sowie TEV-Schnittstelle (His₆-DHNS)	Gibson Assembly + Restriktionsverdau und Ligation	Template: DHNS-His ₆ Primer: O71, O72, O73, O74 Restriktionsenzyme: <i>NcoI</i> , <i>BamHI</i> T4-DNA-Ligase Vektoren: pRT100, pET15b
pET15b-EcMenB	Aus E.coli stammende Version von MenB in nativer Form (EcMenB)	PCR und Restriktionsverdau mit Ligation	Template: His ₆ -AtMenB Primer: O95, O97 Restriktionsenzyme: <i>XbaI</i> , <i>BamHI</i> T4-DNA-Ligase Vektor: pET15b

pET15b- EcMenB-His6	EcMenB mit C- terminalem Histidin- Hexapeptid (EcMenB- His₆)	Restriktionsverdau und Ligation	Restriktionsenzyme: <i>NcoI</i> , <i>BamHI</i> T4-DNA-Ligase Vector: pET15b
pET15b-His6- EcMenB	EcMenB mit N- terminalem Histidin- Hexapeptid sowie TEV- Schnittstelle (His₆- EcMenB)	Gibson Assembly + Restriktionsverdau und Ligation	Template: AtMenB-His6 Primer: O75, O76, O77, O78 Restriktionsenzyme: <i>NcoI</i> , <i>BamHI</i> T4-DNA-Ligase Vektoren: pRT100, pET15b

Tabelle 21 Konstrukte für Erstellung der transgenen Linien

Name	Verwendung	Verwendetes Verfahren	Primer für PCR
OX-DHNS	Überexpressionslinie	Golden Gate Assembly	O83; O90
shRNS 1	RNSi-Linie sh1	Gateway Cloning	O98; O99
shRNS 2	RNSi-Linie sh2	Gateway Cloning	O100; O101
shRNS 3	RNSi-Linie sh3	Gateway Cloning	O102; O103

XII.1.4 Puffer:

Name	Zusammensetzung	Verwendung
His-Trap A	0,02 M Tris-HCl [pH 7.9]; 0,5 M NaCl; 0,005 M Imidazol	Zellyse, Auftragen der Probe auf die Säule, Waschen der Säule; Gradient
His-Trap B	0,02 M Tris-HCl [pH 7.9]; 0,5 M NaCl; 1 M Imidazol	Gradient; Waschen der Säule

AIEX A – DHNS/EcMenB	0,01 M NaPi [pH 8]	Zellyse, Auftragen der Probe auf die Säule, Waschen der Säule; Gradient
AIEX B – DHNS/EcMenB	0,01 M NaPi [pH 8] 1 M NaCl	Gradient; Waschen der Säule
AIEX A – EcMenE	0,05 M Tris-HCl [pH 8]	Zellyse, Auftragen der Probe auf die Säule, Waschen der Säule; Gradient
AIEX B – EcMenE	0,05 M Tris-HCl [pH 8] 1 M NaCl	Gradient; Waschen der Säule
SEC	0,05 M NaPi [pH 7] 0,3 M NaCl	Größenausschlusschromatographie
Lagerungspuffer- DHNS/EcMenB	0,05 M NaPi [pH 7] 0,3 M NaCl 4 % Glycerol	Aufbewahrung der Proteine bei - 80°C
Lagerungspuffer- EcMenE	0,1 M Tris-HCl [pH 8] 0,3 M NaCl 4 % Glycerol	Aufbewahrung der Proteine bei - 80°C
HPLC A	92 % 0,1 M KH ₂ PO ₄ [pH 5] 8 % Methanol	HPLC Gradient
HPLC B	50 % 0,1 M KH ₂ PO ₄ [pH 5] 50 % Methanol	HPLC Gradient

XII.1.5 Primer:

#	NAME	Oligo
O71	6HisTEV_fwd_DHNS	tcgtcgcccttaaggatccctgggcctcatg
O72	6HisTEV_rev_DHNS	tgcaccctgaaaatacaggttttc
O73	AtMenB_fwd	acctgtattttcagggtgcaatggcagatagcaatgaac
O74	AtMenB_rev	gggatccttaaggcgacgatgaaatttg
O75	6HisTEV_fwd_EcB	acgtaatccgtaaggatccctgggcctcatg
O76	6HisTEV_rev_EcB	gataaatcattgcaccctgaaaatacaggttttc
O77	EcMenB_fwd	tcagggtgcaatgattatccggatgaag
O78	EcMenB_rev	gggatccttacggattacgtttgaattg
O83	AtmenBcDNA_rev_BsaI	GAAGGTCTCTAGTTAGGTCGCCGGTGAAATTTAGAGAAG
O90	AtmenBcDNA_fwd_BsaI	GAAGGTCTCAGCAATGGCGGATTCCAATGAGCTTGG
O95	EcMenB_HisDel_fwd	CCATGGGCATTTATCCGGATGAAGCAATGCTGTATGCACC
O96	AtMenB_HisDel_fwd	CCATGGCAGATAGCAATGAACTGGGTAGCGCAAGCCGTCG
O97	pET15b_rev	CCTTTCGGGCTTTGTTAGCAGCCGGATCCITTAAGG
O98	shRNA_1_fwd	TGCTTCGTCGATGGATGATAGATTCC
O99	shRNA_1_rev	TCACCACCACTGCAAAAATGCTTTTG
O100	shRNA_2_fwd	TGAAGGAGCTTATGCGTGCGTTTAATG
O101	shRNA_2_rev	TAGGACCCGTTTGACCAAAAATCGC
O102	shRNA_3_fwd	TGCCAAAGCCAGTTATTGCAATGGTAG
O103	shRNA_3_rev	TCTCTGCACCATTTACAGTTTCTTTCTCC
O119	pET15b_fwd	CCATGGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTCTA G
O120	pET15b_rev	CTCGAGGATCCGGCTGCT
O121	EcMenE_fwd	ttagcagccggatccctcgagTTACTGCTGACGCTGAAC
O122	EcMenE_rev	aagaaggagatataccatggATGATTTTTAGCGATTGGC
O123	At1g60550_fwd	ggacctcgagATGGCGGATTCCAATGAG
O124	At1g60550_rev	gatccccgggTTAAGGTCGCCGGTGAAATTTAG
O127	pET15b_His_fwd	CTCGAGGATCCGGCTGCTAAC
O128	pET15b_His_rev	CATATGGCTGCCGCGCGG
O129	EcMenE_His_fwd	tgccgcggcagccatagATTTTTAGCGATTGGCCG
O137	At5g64250_splice_fwd	TGTTGCTGTAGGAGTAGACGC
O138	At5g64250_splice_rev	CGGAAGAGACCTCCAGTCATC
O139	At3g08590_rev	TTGTGCATCCCAACCTCGTT
O140	At3g08590_fwd	GGTGCTAAGAGAATCCGCGT
O141	At5g67320_rev	ACTCGCTATGTACTCCCCGT

O142	At5g67320_fwd	GCAGAACTCGGGAAGATGCT
O143	At5g64240_rev	GACCATCGATCTCGTCTCCG
O144	At5g64240_fwd	CTGCITGAGCCTCTTCCCTC
O145	At5g48570_rev	GACAGCCTTAGAAAAGCGCAG
O146	At5g48570_fwd	AGTATGAAGCTCGGCTTGAGG
O147	At5g16930_rev	CTTCCCTGTTCTGGTGGAC
O148	At5g16930_fwd	AGGTCTAACCGCTCTGCAG
O149	At5g11670_rev	AAGGTCAAACGCATTGTGGT
O150	At5g11670_fwd	TCCTGCACGAAATTCATGTGC
O151	At5g07880_rev	CTCCGAGGCGTCCAAGAATC
O152	At5g07880_fwd	GAAGCCCTCGGGAGGTAAAG
O153	At4g15545_rev	TCTCTCTGAAGTCTCTTGACAGT
O154	At4g15545_fwd	TCGGATCTCCGGGAACTTCT
O155	At3g48980_rev	TCGGAAGTAATCTGGGCACG
O156	At3g48980_fwd	ATACCTCTGCAACGCACTCT
O157	At3g25910_rev	CAAGGCTTGCCTCACAACAC
O158	At3g25910_fwd	TCTCTCAATGAGGAGCCCGA
O161	At3g04120_rev	ACACCAGTAGACTCAACAACGTA
O162	At3g04120_fwd	CTTCGGTGAGAAGCCAGTCA
O163	At3g03640_rev	CCTCTGAAGGACTCGAGGTG
O164	At3g03640_fwd	CGTGGTGGATACGAGACTGG

XIII. Mikrobiologische Methoden

Die verwendeten mikrobiologischen Methoden sind in folgendem Abschnitt zu einem besseren Verständnis kurz erläutert. Allgemein wurde sich an die Angaben und Methoden der jeweiligen Hersteller der Kits und Enzyme gehalten.

Bei Abweichungen vom Standardprotokoll sind diese hier unter Angabe des betreffenden Versuchs vermerkt.

XIII.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Verringerung von PCR-bedingten Fehlern wurde vornehmlich der Phusion® Hot Start Flex 2X Master Mix [New England BioLabs® Inc. aufgrund seiner Korrekturlese-Funktion (*eng. proof-reading*) verwendet.

Ein allgemeines Pipettierschema der Reaktionsbedingungen findet sich Tabelle 22, ein Schema des zugehörigen Programms des Thermozyklers ist aus Tabelle 23 zu entnehmen.

Die Empfehlungen des Herstellers wurden befolgt, jedoch erfolgten standardmäßige Anpassungen, die in den Tabellen inkludiert sind.

Tabelle 22 Reaktionsaufbau PCR mit Phusion(R) Hot Start Flex 2x Master Mix [verändert nach Herstellerangaben]

Bestandteil	Volumen für 50 µl Reaktion
Primer (Vorwärts) [10 µM]	2.5 µl
Primer (Revers) [10 µM]	2.5 µl
DMSO	1.5 µl
2x Phusion Master Mix	25 µl
Template DNS	1 ng (bei Plasmiden), 100 ng (gDNS), 1µl (cDNS)
ddH ₂ O (Nuklease frei)	Auf 50 µl

Tabelle 23 Grundlegendes Programm des Thermozyklers für PCR mit Phusion(R) Hot Start Flex 2x Master Mix [verändert nach Herstellerangaben]

Schritt:	Temperatur [°C]	Dauer [Sekunden]
Denaturierung (initial)	98	30
30 Zyklen	98	7
	$T = \frac{T_{m(fwd)} + T_{m(rev)}}{2}$	20
	72	20/kb ()
Abschließende Verlängerung	72	600
Halt// HOLD	4	

XIII.1.1.1. RT-PCR

Für die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) galt es in einem ersten Schritt mRNA in cDNA umzuschreiben, um daraufhin eine PCR für die entsprechenden Sequenzen durchzuführen.

Hierfür wurde das RevertAid Erststrang-cDNA-Synthesekit (ThermoScientific) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Pro Synthese wurden 1 µM Poly-A-aufgereinigte mRNA verwendet.

Für die folgenden PCRs verwendete man von dieser cDNA-Bibliothek je 1 µl.

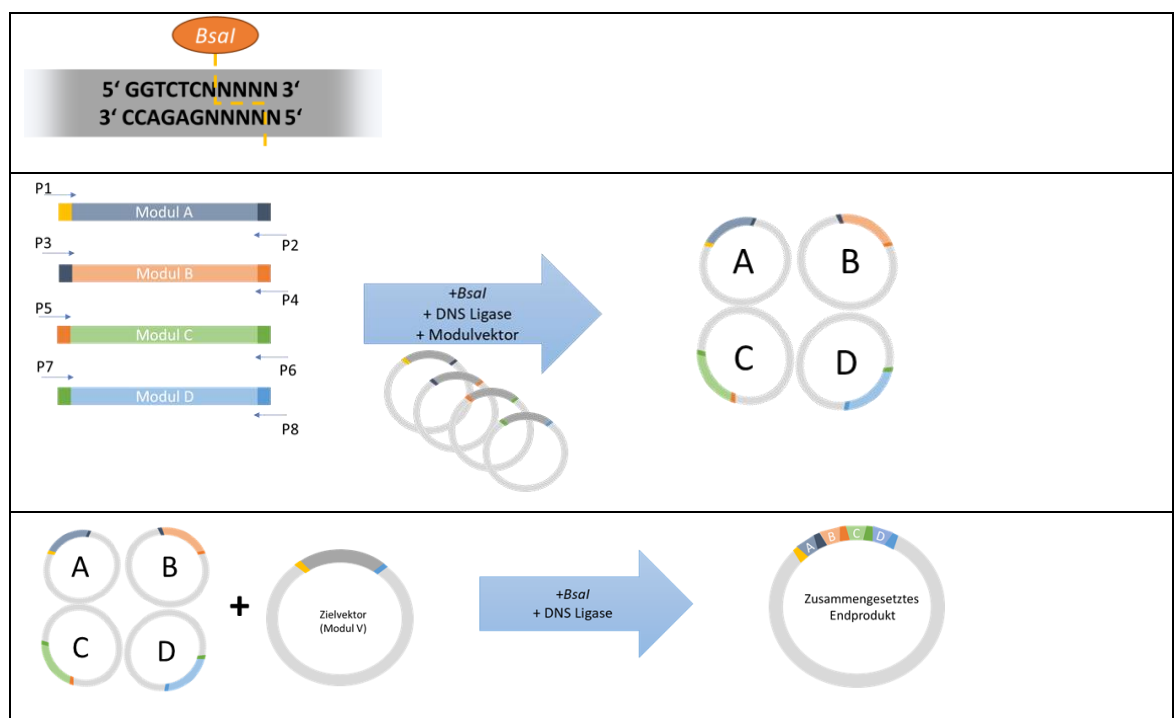
XIII.1.2 Klonierungen

XIII.1.2.1. Golden Gate Assembly

Die Überexpressionslinie wurde mittels Golden Gate Assembly erstellt. Das Vorgehen orientierte sich hierbei an der Literatur der ersten Beschreibung des Verfahrens (Engler, Kandzia & Marillonnet 2008).

Diese Methode ermöglicht es gleichzeitig mehrere Fragmente in der vordefinierten Reihenfolge eines modularen Systems in einen Vektor einzubringen.

Somit kann ein Fundus an Einzelmodulen aufgebaut werden und je nach Bedarf kombiniert werden.



Modul	Fragment	Sequenz 5'	Sequenz 3'	Herkunft
A	UBQ10 Promotor	TGCC	CAGA	Modul-Bibliothek von Dr. A. Pfeiffer
B	Leerstelle	CAGA	GCAA	
C	At1g60550 (cDNA)	GCAA	AACT	PCR Primer: O83, O90 Template: <i>A.thaliana</i> cDNA
D	Stop codon	AACT	TGTG	Modul-Bibliothek von Dr. A. Pfeiffer
E	UBQ10 Terminator	TGTG	ATTC	
F	Kanamycin Resistenz Pflanze	ATTC	GAGC	
V	Rückgrat-Vector pADP67	GAGC	TGCC	

XIII.1.2.2. Gibson Assembly

Das Grundprinzip des Gibson Assembly beruht auf dem Aneinanderfügen von DNS-Doppelsträngen die an ihren Enden jeweils einen Überlapp aufweisen. Die hierfür verwendete Exonuklease T5 verdaut die 5'-Enden der DNS-Doppelstränge und erzeugt somit Überhänge, die daraufhin zu einer Hybridisierung der DNS-Fragmente führen (Gibson 2011). Durch dieses Verfahren ist es somit möglich, ähnlich des Golden Gate Assembly, mehrere DNS-Fragmente in einer definierten Reihenfolge innerhalb einer Reaktion zusammenzuführen.

Der Ablauf des Gibson Assembly lässt sich in zwei Schritte unterteilen:

1. Erzeugen der DNS-Fragmente mittels Primern
 - a. Die hierfür verwendete Primer weisen neben der Sequenz ihres „Zielfragments“ ebenso eine weitere Sequenz auf, die den Überlapp zum vorherigen und nächsten Fragment der Reihung erzeugt
2. Gibson Assembly
 - a. Zusammenführen der DNS-Fragmente und Ablaufen der Reaktion

Für das Verfahren des Gibson Assembly wurde das NEBuilder® HiFi DNA Assembly kit verwendet. Die Durchführung beruhte auf den Herstellerangaben.

Das Primerdesign erfolgte mittel NEBuilder.

XIII.1.2.3. Gateway Cloning

Die Gateway Cloning Technologie beruht auf einem aus dem Bakteriophagen λ stammenden Rekombinationssystem, die es dem Bakterienvirus ermöglicht seine DNS sequenzspezifisch in das Genom von *E.coli* zu integrieren und nach Vermehrung wieder zu desintegrieren. Hierbei werden Sequenzabschnitte („Rekombinationsstellen“) verwendet, die mittels zweier

Proteine spezifisch gespalten und daraufhin miteinander verknüpft werden. Dies führt zum Entstehen zwei neuer Rekombinationsstellen, die für die reverse Reaktion genutzt werden (Landy & Ross 1977). Das Gateway-System macht diesen Rekombinationsmechanismus, unter Adaption für die Direktionalität von DNS-Fragmenten, für *in-vitro* Versuche nutzbar. Hierbei werden anstatt einer Rekombinationsstelle pro DNS-Fragment zwei verwendet, die ihre Entsprechung im Zielsystem finden. Das von Invitrogen entwickelte System basiert hierbei auf zwei Schritten:

1. Erstellen des *Eingangsvektors*, in dem die „Wertsequenz“ von zwei der Rekombinationsstellen eingerahmt wird.
2. Transferieren der Wertsequenz in den *Zielvektor* zum Erhalt des *Zielklons* mittels der Rekombinationsstellen.

Dieses System ermöglicht es, ähnlich dem Golden Gate Assembly, eine Bibliothek an *Eingangsvektor*- und *Zielvektoren* zu erstellen, die untereinander kompatibel sind und somit eine schnelle Anpassung zulassen. Ein weiterer Vorteil des Systems ist die hohe positive Transformationsrate. Diese beruht auf dem „Selbstmordgen“ *ccdB*, das innerhalb des *Zielvektors* von den Rekombinationsstellen eingerahmt wird. Findet die Rekombinationsreaktion nicht statt, so verbleibt das Gen im *Zielvektor* und induziert im Transformanten den Tod.

Für das Gateway Cloning wurde der LR Clonase II Enzyme Mix nach Herstellerangaben (Invitrogen) verwendet.

XIII.1.2.4. Restriktionsverdau und Ligation

Bei einem Restriktionsverdau wird DNS sequenzspezifisch mittels Enzymen geschnitten. Die Methode findet einerseits Anwendung zur Analyse der Insertion von Fragmenten in ein Plasmid (die durch den Verdau erzeugten Fragmente weisen unterschiedliche Größen auf, die mittels Agarosegel aufgetrennt und ausgewertet werden können). Andererseits ermöglicht sie, unterschiedliche Fragmente mit übereinstimmenden Schnittstellen mittels des Enzyms Ligase zu verknüpfen.

XIII.1.3 Proteinexpression

XIII.1.3.1. Protokoll BugBuster® Protein Extraction Reagent:

- Herstellen von Lysis-Puffer (5 ml)
 - 5 ml BugBuster Lösung [Merck Millipore]

- 1.5 µl Benzonase® (250 U/µl) [Sigma-Aldrich]
- Spatelspitze Lysozym aus Hühnereiweiss (23 kU/mg) [Sigma-Aldrich]
- 80 µl Protease Inhibitor Cocktail (1 Tablette cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail in 2 ml ddH₂O gelöst) [Sigma-Aldrich]
- Resuspendieren von Pellet einer 2 ml Kultur in 500 µl Lysis-Puffer durch wiederholtes pipettieren sowie leichtes vortexen
- Inkubieren der Probe unter leichtem Schütteln für 30 min bei Raumtemperatur
- Auftrennen von löslichen und unlöslichen Bestandteilen durch Zentrifugation (16 000 x g, 5 min)
- Überführen des Überstands in frisches Reaktionsgefäß

XIII.1.3.2. Proteinproduktion

- Volumen: 400 ml LB-Medium (in 2l Kolben)
- Temperaturregime: 37°C (Anzuchtphase) / 25 °C (Produktionsphase)
- Induktion mit 0.1 mM IPTG bei OD_{600nm} 0,6 (~ 2,5 h nach Animpfen der Kolben)
- Ernte: 6 h nach Induktion mittels Zentrifugation (Pelletieren der Zellen); 1000 g; 30 min
- 3,5 g Pellets

XIII.1.4 Proteinreinigung

XIII.1.4.1. Zellaufschluss

- Resuspendieren von Pellet in Puffer A (je nach Reinigungsmethodik; siehe Tabelle Puffer) → Volumen Puffer = 5 x Gewicht Pellet
- Zusetzen von Lysozym, Benzonase und Protease Inhibitor Cocktail wie bei BugBuster® erwähnt
- Ultraschall-Zellaufschluss Sonoplus MS 72; 6 min; 10 sec 100%; 40 sec 0%
- French Pressure Cell: 1000 psi 4 Zyklen
- Abtrennen von Zellfragmenten: Zentrifugation 90 min; 48254.4 x g
- Verwenden des Lysats (Überstand) in folgender Reinigungsmethodik

XIII.1.4.2. Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie wurde sowohl im Kit-Design (Ni-NTA Fast Start Kit; Qiagen) als auch mittels eines ÄKTAprime plus Systems (GE Healthcare) durchgeführt (HisTrap FF 5 ml; Cytiva)

Die Aufreinigung mittels des Kits erfolgte auf Grundlage der Herstellerangaben.

Die Proteinreinigung mittels ÄKTAprime System basierte auf folgendem Programm:

1. Waschen von System und Säule
2. Laden von Probe auf Säule
3. Waschen der Säule HisTrap (6 Säulenvolumen)
4. Gradient 0 % HisTrap B → 50 % HisTrap B (10 Säulenvolumen)
5. Plateau 50 % HisTrap B (1 Säulenvolumen)
6. Sprung auf 100 % HisTrap B mit Plateau (2 Säulenvolumen)
7. Sprung auf 0% HisTrap B und Waschen der Säule (4-5 Säulenvolumen)
 - Fraktionssammlung erfolgte für die Schritte 2. – 6.:
 - 2. & 3. → 1 Säulenvolumen pro Probe
 - 4. → ½ Säulenvolumen pro Probe
 - 5. & 6. → 1 Säulenvolumen pro Probe

XIII.1.4.3. Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie wurde mittels ÄKTAprime plus Systems (GE Healthcare) durchgeführt (HisTrap Q XL 5 ml; Cytiva).

Die Proteinreinigung mittels ÄKTAprime System basierte auf folgendem Programm:

1. Waschen von System und Säule
2. Laden von Probe auf Säule
3. Waschen der Säule AIEX A (6 Säulenvolumen)
4. Gradient 0 % AIEX B → 40 % AIEX B (10 Säulenvolumen)
5. Plateau 40 % AIEX B (1 Säulenvolumen)
6. Sprung auf 100 % AIEX B mit Plateau (2 Säulenvolumen)
7. Sprung auf 0% AIEX B und Waschen der Säule (4-5 Säulenvolumen)
 - Fraktionssammlung erfolgte für die Schritte 2. – 6.:
 - 2. & 3. → 1 Säulenvolumen pro Probe
 - 4. → ½ Säulenvolumen pro Probe
 - 5. & 6. → 1 Säulenvolumen pro Probe

XIII.1.4.4. Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie wurde mittels ÄKTAprime plus Systems (GE Healthcare) durchgeführt (HiLoad 16/600 Superdex 200 prep grade; Cytiva).

Die Proteinreinigung mittels ÄKTAprime System basierte auf folgendem Programm:

1. Waschen von System und Säule
2. Laden der Probe auf Säule
3. 1 Säulenvolumen Durchfluss
4. Austreten der Proteinfraktionen (über 2 Säulenvolumen)
 - Fraktionssammlung erfolgte für Schritt 4 (2,5 ml pro Fraktion)

XIV. Biochemische / Biophysikalische Methoden

XIV.1.1 Enzymassay

XIV.1.1.1. Malachitgrün-Test

Das nebenstehende Schema illustriert in groben Zügen den Hintergrund des Malachitgrün-Tests. Das Verfahren dient zum Nachweis von Phosphat $[PO_4^{3-}]$ durch Komplexierung des Phosphats mittels Molybdat zu Dodekamolybdatphosphorsäure. Durch Zugabe von Malachitgrün, das als Kation dient, bildet sich ein grüner Niederschlag (Farbstoffsalz), der Photometrisch bei 620 nm gemessen werden kann und somit als Maß für die vorhandene Phosphatmenge dient (Altmann, Fürstenau, Gielewski & Scholz 1971)

Lanzetta-Reagenz (pro 50 µl Reaktion)	Bestandteil	Konzentration	
7,5 µl	Malachitgrün	0.225%	Für 30 min reagieren lassen
25 µl	Ammoniummolybdat (in 4N HCl)	1%	
67,5 µl	ddH ₂ O		

0,38 µl	Triton X 100	10%	Nach 30 min hinzugeben, nochmals 5 min Reaktionszeit; dann Filtern
Σ 100 µl			

Pipettierschema Enzym-Reaktion:

Stocklösung	Bestandteil	Gelöst in	Volumen eingesetzt in µl	Konzentration in Test
200 mM	Tris-HCl [pH 7.0]	H ₂ O	5.00	20 mM
750 mM	NaCl	H ₂ O	10.00	150 mM
5 mM	MgCl ₂	H ₂ O	10.00	1 mM
2 mM	OSB	H ₂ O	1.50	0.06 mM
1.95 mM	ATP	H ₂ O	3.08	0.12 mM
1.5 mM	CoA	H ₂ O	4.00	0.12 mM
0.5 U	Pyrop_ase	Tris-HCl [pH 7.0]	5.00	0.05 U
	H ₂ O		1.42	
		Final	50.00	
		Σ	40.00	
variabel	EcMenE		10	variabel

Die Enzymreaktion wurde für 5 min bei 30°C inkubiert und durch Zugabe von 100 µl Lanzetta-Reagenz pro 50 µl Enzymreaktion gestoppt. Nach 30 min bei RT wurde die Absorption bei 620 nm gemessen.

XIV.1.2 Gekoppelter Enzym-Assay

Pipettierschema Gekoppelter Enzym-Assay

Stocklösung	Bestandteil	Gelöst in	Volumen eingesetzt in μl	Konzentration in Test
1000 mM	NaPi[pH7.0]	H ₂ O	20	100 mM
750 mM	NaCl	H ₂ O	40	150 mM
5 mM	MgCl ₂	H ₂ O	40	1 mM
1.95 mM	ATP	H ₂ O	12.3	0.12 mM
3.73 mM	CoA	H ₂ O	6.4	0.12 mM
500 mM	HNaCO ₃	H ₂ O	4	10 mM
100 %	DMSO		0.4	0.2 %
variabel (bspw. 0.96 mM)	EcMenE	Lagerungspuffer	Variabel (4.2)	0.02 mM
variabel (bspw. 0.38 mM)	DHNS	Lagerunspuffer	Variabel (2.1)	0.004 mM
	ddH ₂ O		Variabel (50.6)	
		Final	200 μl	
		Σ	180 μl	
variabel	OSB	H ₂ O	20 μl	Variabel (0 – 0.2 mM)

Der gekoppelte Enzym-Assay wurde im 96-Lochplatten-Format aufgenommen. Die Detektion des Produkts DHNA-CoA erfolgte bei 392 nm mittels Microplate Reader (CLARIOstar plus; BMGLabtech). Hierbei wurde über 8 min alle 17 sec eine Messung durchgeführt.

Zur Aufnahme der Inhibitorskinetik wurde der im Pipettierschema geführte Punkt „DMSO“ durch die jeweilige in DMSO gelöste Wirkstofffraktion ersetzt; die Konzentration an DMSO war somit konstant. Das Pipettierschema zeigt die Zusammensetzung eines Reaktionsgefäßes der Platte. Für den Test wurde pro Platte je ein Mastermix bestehend aus allen Komponenten bis auf das Substrat vorgelegt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von OSB gestartet, nach Zugabe erfolgte eine kurze Durchmischung mittels Mikroplattenschüttler (10 sec; 60% Leistung).

XV. RNS-Sequenzierung

Für das Erstellen der cDNS-Sequenzierbibliothek wurden folgende Kits verwendet. Die Durchführung der einzelnen Schritte erfolgte nach Herstellerangaben.

RNeasy Midi Kit	Qiagen
DNA-free	Ambion
Superscript II Reverse Transcriptase	Invitrogen
TruSeq Stranded mRNA LT Set A & Set B	Illumina
Agencourt AmpPure XP	Fisher Scientific
NextSeq500 High-Output kit v2 (300 cycles)	Illumina
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent
Agilent High Sensitivity DNA Kit	Agilent

Ablauf in Kürze: RNA-Extraktion (RNeasy Midi Kit)

DNase-Behandlung (DNA-free)

Messung von Konzentration und Qualitätskontrolle (Bioanalyzer; Agilent RNA 6000 Nano Kit; Nanodrop)

Erstellen der Sequenzierbibliothek (TruSeq Stranded mRNA LT Kit; AmpPure XP; SuperScript II Reverse Transcriptase)

Messung von Konzentration und Qualität (Bioanalyzer; Agilent High Sensitivity DNA Kit; Nanodrop)

Verdünnen der Bibliothek und Vorbereiten des NGS-Laufs (NextSeq500 High-Output kit v2 (300 cycles))

NGS-Lauf an Illumina NextSeq 500

XVI. Phylogenetische Methoden

XVI.1.1 Sterilisieren von Saatgut

Alle Schritte werden unter einem Laminarflow-Abzug durchgeführt.

1. Einfüllen von 20 mg (drei Spatelspitzen) in 1,5 ml Reaktionsgefäß
2. Hinzugeben von 1 ml 70% Ethanol, sowie aufwirbeln der Samen durch Invertieren des Gefäßes
3. Inkubation der Suspension für 10 - 12 min; circa alle 2 min invertieren

4. Abnehmen des 70 % Ethanol und hinzugeben von 1 ml von Ethanol absolut (aufwirbeln der Samen durch invertieren)
5. Umgehendes Überführen des Inhalts des Reaktionsgefäßes auf steriles Filterpapier
6. Abtrocknen der Samen auf Filterpapier
7. Abfüllen der Samen in sterile Reaktionsgefäße

XVI.1.2 Kultivierung von *Arabidopsis thaliana* (Wildtyp/transgene Pflanzen) auf Nährmedium

Für die Tests auf Nährmedium wurden sterilisierte Samen auf ½ MS-Medium ausgelegt und ihre Keimung durch eine zweitägige Ruhephase bei 4°C synchronisiert. Daraufhin folgte eine Wachstumsphase über 14 Tage. (12 h Photoperiode)
Medium:

Murashige & Skoog Salze 2,15 g/l ; MES 0,5 g/l; Gelrite® 3,5 g/l; pH 5.8 mit KOH

Die im Zuge der Tests der *in-vivo*-Aktivität verwendeten Wirkstoffe wurden zur besseren Durchmischung in Reaktionsgefäßen vorgelegt, mit Nährmedium versetzt und nach mehrfachem invertieren in die betreffenden BioAssay-Schalen überführt.

XVI.1.3 Transformation von Pflanzen

Drei bis fünf *Arabidopsis thaliana Col-0* Samen werden pro Topf ausgelegt und mit einer 12 h Photoperiode angezogen, bis die ersten Blütenstände zu sehen sind. Diese Blütenstände werden gekappt um das Austreiben sekundärer Blütenstände zu fördern. Sobald diese zu sehen sind und sich kurz vor dem Öffnen befinden sind die Pflanzen bereit zur Transformation.

Für die Transformation wird eine 5 ml Vorkultur (LB-Medium; mit entsprechenden Selektions-Antibiotika) mit einer *Agrobacterium* Einzelkolonie angeimpft. Diese Vorkultur wird bei 28°C für 48 h im Orbitalschüttler (140 Upm) angezogen. Daraufhin erfolgt das Animpfen der 100 ml Hauptkultur mittels 100 µl der Vorkultur. Diese wird über Nacht bei 28°C im Orbitalschüttler (140 Upm) angezogen und daraufhin mittels Zentrifugation pelletiert. Das resultierende Pellet wird in 100 ml einer 5% Saccharose Lösung resuspendiert.

Die resultierende *Agrobacterium*-Suspension wird in einer Schale vorgelegt und mit 0,03 % Silwet versetzt. Daraufhin taucht man die Pflanzen kopfüber in die Suspension und schwenkt sie um möglichst alle Blüten zu benetzen. Zur weiteren Erhöhung der Benetzung der Blütenstände werden diese erneut mittels Einmalpipette beträufelt. Daraufhin werden die Töpfe mit perforierten Folienbeuteln überzogen und bis zur Abreife der Samen kultiviert.

Zur Selektion der Samen, werden diese nach Sterilisation (siehe Sterilisieren von Saatgut) auf Selektionsmedium ausplattiert um die transgenen Pflanzen zu gewinnen.
Selektionsmedium:

Murashige & Skoog Salze 2,15 g/l ; MES 0,5 g/l; Phytoblend 8 g/l; pH 5.8 mit KOH
+ 50 µM Kanamycin

XVI.1.4 Entfärben von Samenschoten

- Pflanzenmaterial in einer Lösung aus 9 Teilen Ethanol und 1 Teil Essigsäure fixieren.
Pflanzengewebe durch Anlegen eines Vakuums infiltrieren. Alternativ in Lösung bei -20°C für zwei Tage lagern.
- Gewebe zweimal mit 90% Ethanol waschen. 30 min Inkubation je Waschschritt
- Ansetzen der Chloralhydrat/Glycerin-Lösung
Mische 2,5 g Chloralhydrat pro Milliliter mit einer 30% Glycerin-Lösung.
Mischen durch invertieren bis alle Kristalle aufgelöst sind.
CAVE: Volumen erhöht sich!
- Überdecke Pflanzengewebe mit ausreichend Chloralhydrat/Glycerin-Lösung.
Bei einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß rechnet man ungefähr 500 µl.
Inkubation über mehrere Stunden.
- Aufbringen von Pflanzengewebe auf Objektträger für Durchlichtmikroskopie.
Zugabe von ausreichend Chloralhydrat/Glycerin-Lösung um Gewebe zu bedecken.
Auflegen von Deckplättchen.

Referenzprotokoll siehe (Berleth & Jurgens 1993)

XVII. Analytik

XVII.1.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die verwendete Methode basierte auf dem Kapitel „Activity and Inhibition of Acetyl-CoA Carboxylase Determined by HPLC (G. Paul)“ des Buchs „Target assays for modern herbicides and related phytotoxic compounds“ (Böger & Sandmann 1993).

Puffer: HPLC A & HPLC B **Säule:** Merck LiChrospher 100 RP18 (5 µm, 125 x 4 mm)

System: Hewlett Packard (Agilent) 1100 HPLC

Protokoll:

10 min isokratisch bei 0% HPLC B, 1 ml/min; 40 min linear zu 80 % HPLC B; 2 ml/min;

3 min isokratisch bei 80 % HPLC B; 1 ml/min; 4 min linear zu 0% HPLC B; 2 ml/min;
 5 min isokratisch bei 0% HPLC B; 1 ml/min Detektion: 260 nm / 392 nm

XVIII. Bioinformatische Methoden / Tools

Hardware	Lenovo ThinkPad T470	OMEN by HP Laptop 15-ce0xx
Betriebssystem	Ubuntu 18.04.5 LTS	Windows 10 x64 (build 19042)

- Verwendete Pakete in R

```
> sessionInfo()
```

```
R version 4.0.0 (2020-04-24)
Platform: x86_64-w64-mingw32/x64 (64-bit)
Running under: windows 10 x64 (build 19042)
```

```
Matrix products: default
```

```
locale:
```

```
[1] LC_COLLATE=German_Germany.1252 LC_CTYPE=German_Germany.1252 LC_M
ONETARY=German_Germany.1252
[4] LC_NUMERIC=C LC_TIME=German_Germany.1252
```

```
attached base packages:
```

```
[1] stats4 parallel stats graphics grDevices utils datasets
methods base
```

```
other attached packages:
```

```
[1] drc_3.0-1 MASS_7.3-51.6 dplyr_1.0.0
ensemldb_2.12.1
[5] AnnotationFilter_1.12.0 GenomicFeatures_1.40.0 AnnotationDbi_1.50.
0 Biobase_2.48.0
[9] eisaR_1.0.0 Rhisat2_1.4.0 QuasR_1.28.0
Rbowtie_1.28.0
[13] GenomicRanges_1.40.0 GenomeInfoDb_1.24.0 IRanges_2.22.2
S4Vectors_0.26.1
[17] BiocGenerics_0.34.0 edgeR_3.30.3 limma_3.44.1
```

```
loaded via a namespace (and not attached):
```

```
[1] TH.data_1.0-10 colorspace_1.4-1 hwriter_1.3
.2 ellipsis_0.3.1
[5] rio_0.5.16 xVector_0.28.0 rstudioapi_
0.11 bit64_0.9-7
[9] mvtnorm_1.1-1 codetools_0.2-16 splines_4.0
.0 Rsamtools_2.4.0
[13] dbplyr_1.4.4 png_0.1-7 SGSeq_1.22.
0 BiocManager_1.30.10
[17] compiler_4.0.0 httr_1.4.1 assertthat_
0.2.1 Matrix_1.2-18
[21] lazyeval_0.2.2 prettyunits_1.1.1 tools_4.0.0
igraph_1.2.5
[25] glue_1.4.1 GenomeInfoDbData_1.2.3 rappdirs_0.
3.1 ShortRead_1.46.0
[29] Rcpp_1.0.4.6 carData_3.0-4 cellranger_
1.1.0 vctrs_0.3.0
[33] Biostrings_2.56.0 rtracklayer_1.48.0 stringr_1.4
.0 openxlsx_4.2.2
[37] lifecycle_0.2.0 gtools_3.8.2 XML_3.99-0.
3 zlibbioc_1.34.0
[41] zoo_1.8-8 scales_1.1.1 BSgenome_1.
56.0 VariantAnnotation_1.34.0
[45] hms_0.5.3 ProtGenerics_1.20.0 SummarizedE
xperiment_1.18.1 sandwich_3.0-0
```

```

[49] RColorBrewer_1.1-2          curl_4.3          memoise_1.1
      .0                      biomaRt_2.44.0
[53] latticeExtra_0.6-29       stringi_1.4.6     RSQlite_2.2
      .0                      plotrix_3.7-8
[57] zip_2.1.1                 BiocParallel_1.22.0 rlang_0.4.6
pkgconfig_2.0.3
[61] GenomicFiles_1.24.0       matrixStats_0.56.0 bitops_1.0-
      6                      lattice_0.20-41
[65] purrr_0.3.4              GenomicAlignments_1.24.0 bit_1.1-15.
      2                      tidyselect_1.1.0
[69] magrittr_1.5             R6_2.4.1         generics_0.
      0.2                      RUnit_0.4.32
[73] multcomp_1.4-14         DelayedArray_0.14.0 DBI_1.1.0
pillar_1.4.4
[77] haven_2.3.1             foreign_0.8-80   survival_3.
      1-12                    abind_1.4-5
[81] RCurl_1.98-1.2         tibble_3.0.1     crayon_1.3.
      4                      car_3.0-10
[85] BiocFileCache_1.12.0     jpeg_0.1-8.1     progress_1.
      2.2                    locfit_1.5-9.4
[89] grid_4.0.0             readxl_1.3.1     data.table_
      1.13.0                 blob_1.2.1
[93] forcats_0.5.0          digest_0.6.25    openssl_1.4
      .1                      munsell_0.5.0
[97] askpass_1.1

```

Der verwendete Ablauf der Auswertung wurde aus literaturbekannten Methoden erstellt. Im folgenden seine die verwendeten Befehle aufgelistet und zur besseren Nachvollziehbarkeit kommentiert (Michael Stadler 2020b, 2020a; Gaidatzis, Lerch, Hahne & Stadler 2015; Gaidatzis, Burger, Florescu & Stadler 2015).

- Trimmen der Sequenzen:

```

library(QuasR)
trim_report <- preprocessReads(filename = infile, filenameMate =
inMate, outputFilename = outF, outputFilenameMate = outM,
complexity = 0.6, nBases = 1L, clobj = makeCluster(detectCores()))

# Variablen: infile: inputfile xx_R1.fastq.gz; inmate: inputfile
xx_R2.fastq.gz; outF: outputfile xx_R1_trimmed.fastq.gz; outM:
outputfile xx_R2_trimmed.fastq.gz; complexity: Faktor (entferne
Reads mit einer Dinucleotidkomplexität von complexity *
Durchschnittskomplexität des humanen Genoms); nBases: Faktor
(entferne Reads mit mehr als nBases N-Basen) [Anmerkung: 1 == 1L;
numeric: 8 bytes/element, integer: 4 bytes/element]; clobj =
verwende Cluster für Verfahren; makeCluster(detectCores()):
Erstelle Cluster über alle verfügbaren Rechenkerne

```

- Alignment der Sequenzen

```
# load libraries
```

```

library(QuasR)
library(Rhisat2)

#define variables
genofile <- '../ref/Arabidopsis_thaliana.TAIR10.dna.toplevel.fa'
#Fasta-File des A.thaliana Genoms
sampleF1 <- '../Fastq.txt'
# Txt-File der Pfade der fastq.gz.files (trimmed)
  Format: FileName1  FileName2  SampleName (Tab-delimited)
gtf <- '../ref/Arabidopsis_thaliana.TAIR10.47.gtf'
# gtf-file, Annotationsfile, Informationen über Genstruktur des
Genoms (Exon,Intron,UTR)
sampleF2 <- '../Bam.txt'
# Txt-File der Pfade der resultierenden .bam files

# Cluster
Q_core <- makeCluster(detectCores())

proj <- qAlign(sampleFile = sampleF1, genome = genofile, aligner =
"Rhisat2", paired = "rf", splicedAlignment = T, geneAnnotation =
gtf, clobj = Q_core)
#Rhisat2: HISAT2-Aligner eingebunden in R;
  paired = „rf“ Information über Orientierung der Readpaare
  (Resultiert aus Sequenzierverfahren);
  splicedAlignment: Reads die eine Exon-Schnittstelle überspannen
  werden berücksichtigt
write.table(alignments(proj)$genome, sampleF2,sep = '\\t',
row.names = F)
align <- alignmentStats(proj)

```

- Detektion von wirkstoffinduzierten Effekten auf Spleißebene

```

# load libraries
library(QuasR)
library(eisaR)
library(ensemldb)

# Cluster
Q_core <- makeCluster(6L)

#make EDB from gff3 using ensdb
ensDbFromGtf(gtf = '../ref/Arabidopsis_thaliana.TAIR10.47.gtf',
outfile = '../ref/Arabidopsis_thaliana.TAIR10.47.sqlite')

# Define variables
genofile <- '../ref/Arabidopsis_thaliana.TAIR10.dna.toplevel.fa'
sampleF1 <- '../Bam.txt'

```

```

gtf <- '../ref/Arabidopsis_thaliana.TAIR10.47.gtf'
EDB <- EnsDb('../ref/Arabidopsis_thaliana.TAIR10.47.sqlite')

regS <- getRegionsFromTxDb(EDB)
# regS: extrahiert Exon und GeneBody-Regionen strangspezifisch aus
EDB-File, Überlappende Gene auf selbem Strang werden exkludiert

proj <- qAlign(sampleF1, genome = genofile, paired = "rf")
# Da hier mit .bam-Files gearbeitet wird, muss kein Aligner
verwendet
werden;"Pseudo-Alignment" um proj-Datenbank zu erhalten
cntEx<- qCount(proj = proj,regS$exons, orientation = 'same', clobj
= Q_core)
# Zählt alle Reads die auf Exons entfallen,
orientation = ,same' zählt nur die Reads, die auf den codierenden
Strang entfallen
cntGb<- qCount(proj = proj,regS$genebodies, orientation = 'same',
clobj = Q_core)
# Zählt alle Reads die auf GeneBody entfallen
cntInt<- cntGb_1h - cntEx_1h
# Die Differenz von GeneBody-Reads und Exon-Reads sind Reads die
auf
Introns entfallen
# Prepare Samples for EISA
Rex <- cntEx[,c(2:7)]
Rin <- cntInt[,c(2:7)]
# Die erste Spalte von cntEX und cntInt gibt die Länge der Sequenz
an, diese wird für die Analyse nicht benötigt. Die DMSO-Proben
finden sich in Spalte 2-4, die der Psoromsäure in 5-7
cond <- factor(c(„DMSO“, „DMSO“, „DMSO“, „PS“, „PS“, „PS“))
# Zuordnung der Proben zur ihren Bedingungen (DMSO oder
Psoromsäure)
res1 <- runEISA(Rex, Rin, cond, method = "Gaidatzis2015")
# Die Methode "Gaidatzis2015" setzt die Detektionsparameter
basierend auf (Gaidatzis, Burger, Florescu & Stadler 2015), die
einzelnen Schritte des Detektionsverlaufs waren somit
nachvollziehbar
[https://www.bioconductor.org/packages/devel/bioc/vignettes/eisaR/
inst/doc/eisaR.html#7_Run_EISA_step-by-step]
# Speichern der Ergebnisse der Analyse im Tabellenformat
results <- res1$tab.ExtIn
# Signifikanz und vulkan-Plot
sig <- res1$tab.ExIn$FDR < 0.05
#Setze Signifikanzniveau auf eine Falscherkennungsrate von 0.05
(5%) [Standardmethode]
sig.dir <- sign(res1$tab.ExIn$logFC[sig])

```

```

cols <- ifelse(sig, ifelse(res1$tab.ExIn$logFC > 0, "#FF5733",
"#5DADE2"), "#22222244")
# volcano plot
plot(res1$tab.ExIn$logFC, -log10(res1$tab.ExIn$FDR), col = cols,
pch = 20,
      xlab = expression(paste("RNA Änderung (log2
",Delta,"exon/",Delta,"intron)")),
      ylab = "Signifikanz (-log10 FDR)")
abline(h = -log10(0.05), lty = 2)
abline(v = 0, lty = 2)
text(x = par("usr")[1] + 3 * par("cxy")[1], y = par("usr")[4], adj
= c(0,1),
      labels = sprintf("n=%d", sum(sig.dir == -1)), col =
"#5DADE2")
text(x = par("usr")[2] - 3 * par("cxy")[1], y = par("usr")[4], adj
= c(1,1),
      labels = sprintf("n=%d", sum(sig.dir == 1)), col =
"#FF5733")

```

XIX. Erstellen von Homologie-Modell und Docking

- Homologie-Modell:

Das Homologie-Modell erstellte man mittels robetta. Hierzu wurde die Aminosäuresequenz in die Website eingepflegt, daraufhin erfolgte ein sequenzbasierter Suchlauf nach Homologen. Das Programm lieferte fünf Modelle, diese wurden basierend auf ihrem Angström Error Estimate pro Position evaluiert und das Modell mit dem kleinsten Fehler gewählt. Nach laden des gewählten Modells in Pymol, war es möglich dieses mit der Referenzstruktur (3t88.pdb) auszurichten um somit das Homologie-Modell zu erhalten.

- Docking:

- 1. Versuch:

Verwenden des in 3t88.pdb gebundenen Substrat-Analogons (S0N) als Referenzstruktur zum Docken des Inhibitors MOCB-CoA (Alternative Substrate mittels SeeSar).

Ergebnis: Nur der CoA-Anteil zeigte einen teilweisen Überlapp mit S0N auf; Großteil des Moleküls wurde zufällig auf der Modell-Oberfläche angelagert.

→ MOCB-CoA (3D-Struktur) wurde *in-silico* erstellt. Keine Elektronendichte-Karte vorhanden.

- 2. Versuch:

Modellierung von MOCB-CoA basierend auf der Elektronendichte-Karte von S0N.

Ausrichten des so erstellten Moleküls an 3t88.pdb.

Docken des resultierenden Moleküls in das Homologie-Modell

XX. Websites

<i>Name</i>	<i>URL</i>	<i>Verwendung</i>
<i>TAIR</i>	https://www.arabidopsis.org/index.jsp	Analyse von Gen und Transkript-Sequenzen
<i>NCBI Blast</i>	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	Identifikation von Analoga
<i>Uniprot</i>	https://www.uniprot.org/	Analyse von Proteinsequenzen
<i>Clustal Omega</i>	https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/	Multi-Sequenzabgleich
<i>rosetta</i>	https://rosetta.bakerlab.org/	Homologie-Modellierung
<i>Ensembl Plants</i>	https://plants.ensembl.org/Arabidopsis_thaliana/Info/Index	Beziehen von Annotation und Referenzsequenz für <i>A. thaliana</i> release 47
<i>Isoelectric Point calculator</i>	http://isoelectric.org/calculate.php	Errechnen des Isoelektrischen Punkts
<i>bioconductor</i>	https://www.bioconductor.org/	Beziehen von R-Paketen
<i>bioconda</i>	https://bioconda.github.io/#	Beziehen von Python-Paketen

XXI. Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
1,4-NQ	1,4-Naphthoquinon-Derivate
3'SS	3' Spleiß-Stelle
5'SS	5' Spleiß-Stelle
AAE14	OSB-CoA-Ligase (Pflanze)
ABA	Abszissinsäure
ABC4	DHNA Phythyltransferase (Pflanze)
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BPS	Verzweigungsstelle
cDNS	komplementäre DNS (DNS-Abschrift der mRNA)
CoA	Koenzym A
DHNA	1,4-Dihydroxy-2-naphthoat
DHNAT1 // DHNAT2	DHNA-Thioesterase (Bakterium)
DHNS	1,4-Dihydroxy-2-naphthoyl-CoA Synthase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dsRNS	doppelsträngige RNS
ECHID	Enoyl-CoA Hydratase/Isomerase D
EcMenB	E.coli Version der 1,4-Dihydroxy-2-naphthoyl-CoA Synthase
EcMenE	E.coli Version der OSB-CoA Ligase
EPSPS	5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase
Fd	Ferredoxin
FDR	Falscherkennungsrate
FeS	Eisen-Schwefel-Cluster
FNR	Ferredoxin-NADP ⁺ -Reduktase
gDNS	genomische DNS
GDT	Globaler Distanz Test
GMO	gentechnisch modifizierter Organismus
His ₆ -Tag	Hexahistidin-Peptidsequenz zur Verwendung innerhalb der Affinitätschromatographie
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ICS1 // ICS2	Isochorismate synthase (Pflanze)
ITPG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
KD	Knockdown
KO	Knockout
LHC	Lichtsammelkomplex
mAU	tausendstel Absorptionseinheiten
MenA	DHNA Phythyltransferase (Bakterium)
MenB	DHNA-CoA Synthase (Bakterium)
MenC	OSB synthase (Bakterium)
MenD	SEPHCHC synthase (Bakterium)

MenE	OSB-CoA-Ligase (Bakterium)
MenF	Isochorismate synthase (Bakterium)
MENG	Demethylphyloquinone Methyltransferase (Pflanze)
MenG/UbiE	Demethylphyloquinone Methyltransferase (Bakterium)
MenH	SHCHC synthase (Bakterium)
MenI	DHNA-Thioesterase (Bakterium)
MOCB	Methyl 4-Oxo-4-(4-Chlorophenyl)-2-butenolat
mRNS	messengerRNS; Boten-RNS; Matrize der Translation
NADPH // NADP+	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NDC1	NAD(P)H-Dehydrogenase C1
NMD	Nonsense-vermittelter-Abbau
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	Optischedichte
OSB	o-succinylbenzoat
PAINS	<i>pan assay interference compounds</i>
PC	Plastocyanin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PHYLLLO	Multifunktionales Enzym, Domänen von MenD, MenH, MenC (Pflanze)
PP _i	Pyrophosphat
prä-mRNS	vorläufer der mRNS; Produkt der Transkription
PRI	Prozent retinierte Introns
PTB	Polypyrimidin-Trakt Bindeprot
PTS2	Peroxisomales-Zielrichte-Signal Typ 2
RISC	RNS-induzierter Stillege-Komplex
RNS	Ribonukleinsäure
RNSi	Interferierende RNS
RNSi	RNS-Interferenz
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	revolutions per minute; Umdrehungen pro Minute; Drehzahl
RRM	RNS-Bindedomäne
rRNS	ribosomale RNS
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SAM	S-Adenosylmethionine
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEPHCHC	5-Enolpyruvoyl-6-hydroxy-2-succinyl-cyclohex-3-en-1-carboxylat
SHCHC	(1R,6R)-6-hydroxy-2-succinylcyclohexa-2,4-diene-1-carboxylate
shRNS	kleine haarnadelförmige RNS
siRNS	kurzer interferierende RNS
snRNP	kleines zellkerneigenes Ribonukleoprotein
SR-Proteine	Serin/Arginin reiche Proteine

XXII. Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich im Laufe meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt hierbei meiner betriebsinternen Betreuerin Dr. Rhea Stoppel, für das mir gegenübergebrachte Vertrauen, die gewährten Freiräume sowie die freundlichen Ermahnungen (dann und wann), mich nicht nur in einen Themenkomplex zu verbeißen, sondern das Gesamtbild im Blick zu behalten.

Gleichermaßen gilt mein Dank Prof. Dr. Sascha Laubinger, meinem Doktorvater in der Ferne, für die Bereitschaft, diese Arbeit zu betreuen und diese damit überhaupt erst zu ermöglichen. Vielen Dank für den fachlichen Austausch sowie die eingebrachten Anregungen!

Ebenso möchte ich Dr. Anne Pfeiffer und Dr. Roberto Orrù danken, die mich während der letzten Monate meiner Promotion betreuten. Insbesondere durch Annes Anregungen und Kritik erhielten einige meiner Versuche sowie die vorliegende Arbeit den letzten Schliff. Dank Robertos endloser Geduld wurden die *in-silico*-Studie und weite Teile des *in-vitro*-Tests nochmals um Längen besser.

Ich danke Prof. Dr. Rüdiger Hain für die Bereitschaft, das Zweitgutachten meiner Arbeit zu übernehmen.

Ich danke der Bayer AG für das Ermöglichen dieser Arbeit.

Einen großen Dank an Dr. Birgit Kuhn und ihr Labor sowie Dr. Gilbert Besong und Dr. Jared Freeman für die Unterstützung von chemischer Seite, durch Synthese des Inhibitors sowie dessen Aktivierung.

Vielen Dank an die Labors der Herbizid-Biochemie am Standort Frankfurt am Main für das kollegiale Verhältnis, die umfassende Unterstützung, viele Ratschläge und die schöne gemeinsame Zeit.

Hierbei möchte ich insbesondere „meine“ Damen vom Linka/Bisterfeld/Orrù Labor hervorheben, die mich in ihre Mitte aufnahmen und mir so manchen ansonsten deprimierenden Versuchstag versüßen konnten!

In gleicher Weise danke ich Dr. Carolin Bisterfeld für viele Anregungen und viele endlose Gespräche, manchmal politischer-, manchmal humoristischer Natur.

Abschließend gilt der größte Dank meiner Familie, die mir mein Studium ermöglichen und mich während der letzten vier Jahre in jedweder Art unterstützen!

XXIII. Ehrenwörtliche Versicherung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Wetzlar, den

.....

Julius Heuchert

Literatur

- Abeln, S., Feenstra, K.A. & Heringa, J. (2019). Protein Three-Dimensional Structure Prediction. In Ranganathan, S., Gribskov, M., Nakai, K. & Schönbach, C. (Hrsg.), *Encyclopedia of bioinformatics and computational biology* (S. 497–511). Amsterdam, Boston, Heidelberg: Elsevier.
- Ali, G.S., Palusa, S.G., Golovkin, M., Prasad, J., Manley, J.L. & Reddy, A.S.N. (2007). Regulation of plant developmental processes by a novel splicing factor. *PLoS one*, 2(5), e471.
- Alsafadi, S., Houy, A., Battistella, A., Popova, T., Wassef, M., Henry, E., Tirode, F., Constantinou, A., Piperno-Neumann, S., Roman-Roman, S., Dutertre, M. & Stern, M.-H. (2016). Cancer-associated SF3B1 mutations affect alternative splicing by promoting alternative branchpoint usage. *Nature communications*, 7, 10615.
- AlShareef, S., Ling, Y., Butt, H., Mariappan, K.G., Benhamed, M. & Mahfouz, M.M. (2017). Herboxidiene triggers splicing repression and abiotic stress responses in plants. *BMC genomics*, 18(1), 260.
- Altmann, H.J., Fürstenau, E., Gielewski, A. & Scholz, L. (1971). Photometrische Bestimmung kleiner Phosphatmengen mit Malachitgrün. *Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie*, 256(4), 274–276.
- Asahina, Y. & Hayashi, H. (1933). Untersuchungen über Flechtenstoffe, XXVI. Mitteil.: Über Psoromsäure. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)*, 66(7), 1023–1030.
- Babujee, L., Wurtz, V., Ma, C., Lueder, F., Soni, P., van Dorsselaer, A. & Reumann, S. (2010). The proteome map of spinach leaf peroxisomes indicates partial compartmentalization of phylloquinone (vitamin K1) biosynthesis in plant peroxisomes. *Journal of experimental botany*, 61(5), 1441–1453.
- Babula, P., Vaverkova, V., Poborilova, Z., Ballova, L., Masarik, M. & Provaznik, I. (2014). Phytotoxic action of naphthoquinone juglone demonstrated on lettuce seedling roots. *Plant physiology and biochemistry : PPB*, 84, 78–86.
- Baell, J. & Walters, M.A. (2014). Chemistry: Chemical con artists foil drug discovery. *Nature*, 513(7519), 481–483.
- Baell, J.B. & Holloway, G.A. (2010). New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. *Journal of medicinal chemistry*, 53(7), 2719–2740.
- Baell, J.B. & Nissink, J.W.M. (2018). Seven Year Itch: Pan-Assay Interference Compounds (PAINS) in 2017-Utility and Limitations. *ACS chemical biology*, 13(1), 36–44.
- Bajaj, M. & Blundell, T. (1984). Evolution and the tertiary structure of proteins. *Annual review of biophysics and bioengineering*, 13, 453–492.

- Basset, G.J., Latimer, S., Fatihi, A., Soubeyrand, E. & Block, A. (2017). Phylloquinone (Vitamin K1): Occurrence, Biosynthesis and Functions. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 17(12), 1028–1038.
- Bates, B.C., Kundzewicz, Z., Wu, S. & Palutikof, J. (Hrsg.) (2013). *Climate change and water*, [Geneva, Switzerland], Beaconsfield, Quebec: Intergovernmental Panel on Climate Change; Canadian Electronic Library.
- Batista, A.N.L., Batista, J.M., Bolzani, V.S., Furlan, M. & Blanch, E.W. (2013). Selective DMSO-induced conformational changes in proteins from Raman optical activity. *Physical chemistry chemical physics : PCCP*, 15(46), 20147–20152.
- Behera, B.C., Mahadik, N. & Morey, M. (2012). Antioxidative and cardiovascular-protective activities of metabolite usnic acid and psoromic acid produced by lichen species *Usnea complanata* under submerged fermentation. *Pharmaceutical biology*, 50(8), 968–979.
- Bentley, R. & Meganathan, R. (1982). Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. *Microbiological Reviews*, 46(3), 241–280.
- Berleth, T. & Jurgens, G. (1993). The role of the monopteros gene in organising the basal body region of the *Arabidopsis* embryo. *Development*, 118(2), 575–587.
- Biamonti, G., Maita, L. & Montecucco, A. (2018). The Krebs Cycle Connection: Reciprocal Influence Between Alternative Splicing Programs and Cell Metabolism. *Frontiers in oncology*, 8, 408.
- Biankin, A.V., Waddell, N., Kassahn, K.S., Gingras, M.-C., Muthuswamy, L.B., Johns, A.L., Miller, D.K., Wilson, P.J., Patch, A.-M., Wu, J., Chang, D.K., Cowley, M.J., Gardiner, B.B., Song, S., Harliwong, I., Idrisoglu, S., Nourse, C., Nourbakhsh, E., Manning, S., Wani, S., Gongora, M., Pajic, M., Scarlett, C.J., Gill, A.J., Pinho, A.V., Rooman, I., Anderson, M., Holmes, O., Leonard, C., Taylor, D., Wood, S., Xu, Q., Nones, K., Fink, J.L., Christ, A., Bruxner, T., Cloonan, N., Kolle, G., Newell, F., Pinese, M., Mead, R.S., Humphris, J.L., Kaplan, W., Jones, M.D., Colvin, E.K., Nagrial, A.M., Humphrey, E.S., Chou, A., Chin, V.T., Chantrill, L.A., Mawson, A., Samra, J.S., Kench, J.G., Lovell, J.A., Daly, R.J., Merrett, N.D., Toon, C., Epari, K., Nguyen, N.Q., Barbour, A., Zeps, N., Kakkar, N., Zhao, F., Wu, Y.Q., Wang, M., Muzny, D.M., Fisher, W.E., Brunicardi, F.C., Hodges, S.E., Reid, J.G., Drummond, J., Chang, K., Han, Y., Lewis, L.R., Dinh, H., Buhay, C.J., Beck, T., Timms, L., Sam, M., Begley, K., Brown, A., Pai, D., Panchal, A., Buchner, N., Borja, R. de, Denroche, R.E., Yung, C.K., Serra, S., Onetto, N., Mukhopadhyay, D., Tsao, M.-S., Shaw, P.A., Petersen, G.M., Gallinger, S., Hruban, R.H., Maitra, A., Iacobuzio-Donahue, C.A., Schulick, R.D., Wolfgang, C.L., Morgan, R.A., Lawlor, R.T., Capelli, P., Corbo, V., Scardoni, M., Tortora, G., Tempero, M.A., Mann, K.M., Jenkins, N.A., Perez-Mancera, P.A., Adams, D.J.,

- Largaespada, D.A., Wessels, L.F.A., Rust, A.G., Stein, L.D., Tuveson, D.A., Copeland, N.G., Musgrove, E.A., Scarpa, A., Eshleman, J.R., Hudson, T.J., Sutherland, R.L., Wheeler, D.A., Pearson, J.V., McPherson, J.D., Gibbs, R.A. & Grimmond, S.M. (2012). Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature*, 491(7424), 399–405.
- Böger, P. & Sandmann, G. (Hrsg.) (1993). *Target assays for modern herbicides and related phytotoxic compounds*, Boca Raton: Lewis Publishers.
- Braunschweig, U., Gueroussov, S., Plocik, A.M., Graveley, B.R. & Blencowe, B.J. (2013). Dynamic integration of splicing within gene regulatory pathways. *Cell*, 152(6), 1252–1269.
- Brettel, K., Sétif, P. & Mathis, P. (1986). Flash-induced absorption changes in photosystem I at low temperature: evidence that the electron acceptor A 1 is vitamin K 1. *FEBS Letters*, 203(2), 220–224.
- Broseus, L. & Ritchie, W. (2020). Challenges in detecting and quantifying intron retention from next generation sequencing data. *Computational and structural biotechnology journal*, 18, 501–508.
- Buchanan, B.B., Gruissem, W. & Jones, R.L. (2015). *Biochemistry & molecular biology of plants*, Chichester: Wiley.
- Byrne, A., Cole, C., Volden, R. & Vollmers, C. (2019). Realizing the potential of full-length transcriptome sequencing. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 374(1786), 20190097.
- Carvalho, R.F., Carvalho, S.D. & Duque, P. (2010). The plant-specific SR45 protein negatively regulates glucose and ABA signaling during early seedling development in Arabidopsis. *Plant physiology*, 154(2), 772–783.
- Carvalho, R.F., Szakonyi, D., Simpson, C.G., Barbosa, I.C.R., Brown, J.W.S., Baena-González, E. & Duque, P. (2016). The Arabidopsis SR45 Splicing Factor, a Negative Regulator of Sugar Signaling, Modulates SNF1-Related Protein Kinase 1 Stability. *The Plant cell*, 28(8), 1910–1925.
- Casida, J.E. (2017). Why Prodrugs and Propesticides Succeed. *Chemical research in toxicology*, 30(5), 1117–1126.
- Chen, M., Jiang, M., Sun, Y., Guo, Z.-F. & Guo, Z. (2011). Stabilization of the second oxanion intermediate by 1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-coenzyme A synthase of the menaquinone pathway: spectroscopic evidence of the involvement of a conserved aspartic acid. *Biochemistry*, 50(26), 5893–5904.
- Chen, M., Ma, X., Chen, X., Jiang, M., Song, H. & Guo, Z. (2013). Identification of a hotdog fold thioesterase involved in the biosynthesis of menaquinone in Escherichia coli. *Journal of bacteriology*, 195(12), 2768–2775.

- Cheng, C.-Y., Krishnakumar, V., Chan, A.P., Thibaud-Nissen, F., Schobel, S. & Town, C.D. (2017). Araport11: a complete reannotation of the Arabidopsis thaliana reference genome. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 89(4), 789–804.
- Chi, W.-C., Fu, S.-F., Huang, T.-L., Chen, Y.-A., Chen, C.-C. & Huang, H.-J. (2011). Identification of transcriptome profiles and signaling pathways for the allelochemical juglone in rice roots. *Plant molecular biology*, 77(6), 591–607.
- Chorev, M. & Carmel, L. (2012). The function of introns. *Frontiers in genetics*, 3, 55.
- Collins, M.D. & Jones, D. (1981). Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implication. *Microbiological Reviews*, 45(2), 316–354.
- Copeland, R.A. (2005). *Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery. A guide for medicinal chemists and pharmacologists*, Hoboken, N.J: Wiley-Interscience.
- Corrionero, A., Miñana, B. & Valcárcel, J. (2011). Reduced fidelity of branch point recognition and alternative splicing induced by the anti-tumor drug spliceostatin A. *Genes & development*, 25(5), 445–459.
- Dam, H. (1946). *The Discovery of Vitamin K, Its Biological Functions and Therapeutical Application*. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1943, Stockholm, Sweden.
- Dayan, F.E. (2019). Current Status and Future Prospects in Herbicide Discovery. *Plants (Basel, Switzerland)*, 8(9).
- DeBoever, C., Ghia, E.M., Shepard, P.J., Rassenti, L., Barrett, C.L., Jepsen, K., Jamieson, C.H.M., Carson, D., Kipps, T.J. & Frazer, K.A. (2015). Transcriptome sequencing reveals potential mechanism of cryptic 3' splice site selection in SF3B1-mutated cancers. *PLoS computational biology*, 11(3), e1004105.
- Deraeve, C., Guo, Z., Bon, R.S., Blankenfeldt, W., DiLucrezia, R., Wolf, A., Menninger, S., Stigter, E.A., Wetzels, S., Choidas, A., Alexandrov, K., Waldmann, H., Goody, R.S. & Wu, Y.-W. (2012). Psoromic acid is a selective and covalent Rab-prenylation inhibitor targeting autoinhibited RabGGTase. *Journal of the American Chemical Society*, 134(17), 7384–7391.
- Du, J.-L., Zhang, S.-W., Huang, H.-W., Cai, T., Li, L., Chen, S. & He, X.-J. (2015). The Splicing Factor PRP31 Is Involved in Transcriptional Gene Silencing and Stress Response in Arabidopsis. *Molecular plant*, 8(7), 1053–1068.
- Eckardt, N.A. (2013). The plant cell reviews alternative splicing. *The Plant cell*, 25(10), 3639.
- Eder, J., Sedrani, R. & Wiesmann, C. (2014). The discovery of first-in-class drugs: origins and evolution. *Nature reviews. Drug discovery*, 13(8), 577–587.
- Edmunds, A., Trueb, W., Oppolzer, W. & Cowley, P. (1997). Herboxidiene: Determination of absolute configuration by degradation and synthetic studies. *Tetrahedron*, 53(8), 2785–2802.

- Effenberger, K.A., Urabe, V.K. & Jurica, M.S. (2017). Modulating splicing with small molecular inhibitors of the spliceosome. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 8(2).
- Ellis, M.J., Ding, L., Shen, D., Luo, J., Suman, V.J., Wallis, J.W., van Tine, B.A., Hoog, J., Goiffon, R.J., Goldstein, T.C., Ng, S., Lin, L., Crowder, R., Snider, J., Ballman, K., Weber, J., Chen, K., Koboldt, D.C., Kandoth, C., Schierding, W.S., McMichael, J.F., Miller, C.A., Lu, C., Harris, C.C., McLellan, M.D., Wendl, M.C., DeSchryver, K., Allred, D.C., Esserman, L., Unzeitig, G., Margenthaler, J., Babiera, G.V., Marcom, P.K., Guenther, J.M., Leitch, M., Hunt, K., Olson, J., Tao, Y., Maher, C.A., Fulton, L.L., Fulton, R.S., Harrison, M., Oberkfell, B., Du, F., Demeter, R., Vickery, T.L., Elhammali, A., Piwnica-Worms, H., McDonald, S., Watson, M., Dooling, D.J., Ota, D., Chang, L.-W., Bose, R., Ley, T.J., Piwnica-Worms, D., Stuart, J.M., Wilson, R.K. & Mardis, E.R. (2012). Whole-genome analysis informs breast cancer response to aromatase inhibition. *Nature*, 486(7403), 353–360.
- Emonds-Alt, B., Coosemans, N., Gerards, T., Remacle, C. & Cardol, P. (2017). Isolation and characterization of mutants corresponding to the MENA, MENB, MENC and MENE enzymatic steps of 5'-monohydroxyphyloquinone biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 89(1), 141–154.
- Engler, C., Kandzia, R. & Marillonnet, S. (2008). A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS one*, 3(11), e3647.
- Eugeni Piller, L., Besagni, C., Ksas, B., Rumeau, D., Br  h  lin, C., Glauser, G., Kessler, F. & Havaux, M. (2011). Chloroplast lipid droplet type II NAD(P)H quinone oxidoreductase is essential for prenylquinone metabolism and vitamin K1 accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(34), 14354–14359.
- Eugeni Piller, L., Glauser, G., Kessler, F. & Besagni, C. (2014). Role of plastoglobules in metabolite repair in the tocopherol redox cycle. *Frontiers in plant science*, 5, 298.
- Fatih  , A., Latimer, S., Schmollinger, S., Block, A., Dussault, P.H., Vermaas, W.F.J., Merchant, S.S. & Basset, G.J. (2015). A Dedicated Type II NADPH Dehydrogenase Performs the Penultimate Step in the Biosynthesis of Vitamin K1 in *Synechocystis* and *Arabidopsis*. *The Plant cell*, 27(6), 1730–1741.
- Fica, S.M., Tuttle, N., Novak, T., Li, N.-S., Lu, J., Koodathingal, P., Dai, Q., Staley, J.P. & Piccirilli, J.A. (2013). RNA catalyses nuclear pre-mRNA splicing. *Nature*, 503(7475), 229–234.
- Filichkin, S.A., Cumbie, J.S., Dharmawardhana, P., Jaiswal, P., Chang, J.H., Palusa, S.G., Reddy, A.S.N., Megraw, M. & Mockler, T.C. (2015). Environmental stresses modulate abundance and timing of alternatively spliced circadian transcripts in *Arabidopsis*. *Molecular plant*, 8(2), 207–227.

- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. & Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, *391*(6669), 806–811.
- Folco, E.G., Coil, K.E. & Reed, R. (2011). The anti-tumor drug E7107 reveals an essential role for SF3b in remodeling U2 snRNP to expose the branch point-binding region. *Genes & development*, *25*(5), 440–444.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (2015). *FAO statistical pocketbook 2015. World food and agriculture*, Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Foyer, C.H. (2018). Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis. *Environmental and experimental botany*, *154*, 134–142.
- Friesner, R.A., Banks, J.L., Murphy, R.B., Halgren, T.A., Klicic, J.J., Mainz, D.T., Repasky, M.P., Knoll, E.H., Shelley, M., Perry, J.K., Shaw, D.E., Francis, P. & Shenkin, P.S. (2004). Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *Journal of medicinal chemistry*, *47*(7), 1739–1749.
- Furt, F., van Oostende, C., Widhalm, J.R., Dale, M.A., Wertz, J. & Basset, G.J.C. (2010). A bimodular oxidoreductase mediates the specific reduction of phyloquinone (vitamin K₁) in chloroplasts. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, *64*(1), 38–46.
- Gaidatzis, D., Burger, L., Florescu, M. & Stadler, M.B. (2015). Analysis of intronic and exonic reads in RNA-seq data characterizes transcriptional and post-transcriptional regulation. *Nature biotechnology*, *33*(7), 722–729.
- Gaidatzis, D., Lerch, A., Hahne, F. & Stadler, M.B. (2015). QuasR: quantification and annotation of short reads in R. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *31*(7), 1130–1132.
- Gaines, T.A., Duke, S.O., Morran, S., Rigon, C.A.G., Tranel, P.J., Küpper, A. & Dayan, F.E. (2020). Mechanisms of evolved herbicide resistance. *The Journal of biological chemistry*, *295*(30), 10307–10330.
- Gao, Y., Vogt, A., Forsyth, C.J. & Koide, K. (2013). Comparison of splicing factor 3b inhibitors in human cells. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, *14*(1), 49–52.
- Garcion, C., Lohmann, A., Lamodièrre, E., Catinot, J., Buchala, A., Doermann, P. & Métraux, J.-P. (2008). Characterization and biological function of the ISOCHORISMATE SYNTHASE2 gene of *Arabidopsis*. *Plant physiology*, *147*(3), 1279–1287.
- Gibson, D.G. (2011). Enzymatic assembly of overlapping DNA fragments. *Methods in enzymology*, *498*, 349–361.
- Gross, J., Cho, W.K., Lezhneva, L., Falk, J., Krupinska, K., Shinozaki, K., Seki, M., Herrmann, R.G. & Meurer, J. (2006). A plant locus essential for phyloquinone (vitamin K₁)

- biosynthesis originated from a fusion of four eubacterial genes. *The Journal of biological chemistry*, 281(25), 17189–17196.
- Gross, J., Meurer, J. & Bhattacharya, D. (2008). Evidence of a chimeric genome in the cyanobacterial ancestor of plastids. *BMC evolutionary biology*, 8, 117.
- Gu, X., Chen, I.-G., Harding, S.A., Nyamdari, B., Ortega, M.A., Clermont, K., Westwood, J.H. & Tsai, C.-J. (2018). *Plasma Membrane Phylloquinone Biosynthesis in Nonphotosynthetic Parasitic Plants*.
- Guo, H.-S., Fei, J.-F., Xie, Q. & Chua, N.-H. (2003). A chemical-regulated inducible RNAi system in plants. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 34(3), 383–392.
- Hang, J., Wan, R., Yan, C. & Shi, Y. (2015). Structural basis of pre-mRNA splicing. *Science (New York, N.Y.)*, 349(6253), 1191–1198.
- Hasegawa, M., Miura, T., Kuzuya, K., Inoue, A., Won Ki, S., Horinouchi, S., Yoshida, T., Kunoh, T., Koseki, K., Mino, K., Sasaki, R., Yoshida, M. & Mizukami, T. (2011). Identification of SAP155 as the target of GEX1A (Herboxidiene), an antitumor natural product. *ACS chemical biology*, 6(3), 229–233.
- Herklotz, P.A., Gurung, P., Vanden Heuvel, B. & Kinney, C.A. (2010). Uptake of human pharmaceuticals by plants grown under hydroponic conditions. *Chemosphere*, 78(11), 1416–1421.
- Hofmann, F., Schon, M.A. & Nodine, M.D. (2019). The embryonic transcriptome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant reproduction*, 32(1), 77–91.
- Holden, H.M., Benning, M.M., Haller, T. & Gerlt, J.A. (2001). The crotonase superfamily: divergently related enzymes that catalyze different reactions involving acyl coenzyme a thioesters. *Accounts of chemical research*, 34(2), 145–157.
- Hoskins, A.A. & Moore, M.J. (2012). The spliceosome: a flexible, reversible macromolecular machine. *Trends in biochemical sciences*, 37(5), 179–188.
- Isaac, B.G., Ayer, S.W., Elliott, R.C. & Stonard, R.J. (1992). Herboxidiene: a potent phytotoxic polyketide from *Streptomyces* sp. A7847. *The Journal of Organic Chemistry*, 57(26), 7220–7226.
- Jiang, M., Chen, M., Guo, Z.-F. & Guo, Z. (2010). A bicarbonate cofactor modulates 1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-coenzyme a synthase in menaquinone biosynthesis of *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry*, 285(39), 30159–30169.
- Johnson, M.P. (2016). Photosynthesis. *Essays in biochemistry*, 60(3), 255–273.
- Johnson, T.W., Shen, G., Zybilov, B., Kolling, D., Reategui, R., Beauparlant, S., Vassiliev, I.R., Bryant, D.A., Jones, A.D., Golbeck, J.H. & Chitnis, P.R. (2000). Recruitment of a foreign quinone into the A(1) site of photosystem I. I. Genetic and physiological characterization of

- phyloquinone biosynthetic pathway mutants in *Synechocystis* sp. pcc 6803. *The Journal of biological chemistry*, 275(12), 8523–8530.
- Johnston, J.M., Arcus, V.L. & Baker, E.N. (2005). Structure of naphthoate synthase (MenB) from *Mycobacterium tuberculosis* in both native and product-bound forms. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 61(Pt 9), 1199–1206.
- Karamoko, M., Cline, S., Redding, K., Ruiz, N. & Hamel, P.P. (2011). Lumen Thiol Oxidoreductase1, a disulfide bond-forming catalyst, is required for the assembly of photosystem II in *Arabidopsis*. *The Plant cell*, 23(12), 4462–4475.
- Kato, N., Yamakawa, D., Yamauchi, N., Hashimoto, Y., Matsuoka, E. & Hara, M. (2019). Induction of the heat shock response in *Arabidopsis* by chlorinated 1,4-naphthoquinones. *Plant Growth Regulation*, 87(3), 413–420.
- Keren, H., Lev-Maor, G. & Ast, G. (2010). Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function. *Nature reviews. Genetics*, 11(5), 345–355.
- Kim, H.U., van Oostende, C., Basset, G.J.C. & Browse, J. (2008). The AAE14 gene encodes the *Arabidopsis* o-succinylbenzoyl-CoA ligase that is essential for phyloquinone synthesis and photosystem-I function. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 54(2), 272–283.
- Klein, W., Grabler, W. & Tischner, H. (2015). *Sachkundig im Pflanzenschutz. Arbeitshilfe zum Erlangen des Sachkundenachweises im Pflanzenschutz; Prüfungsfragen mit Antworten*, Stuttgart: Ulmer.
- Koncz, C. & Schell, J. (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular and General Genetics MGG*, 204(3), 383–396.
- Koskull-Döring, P. von, Scharf, K.-D. & Nover, L. (2007). The diversity of plant heat stress transcription factors. *Trends in plant science*, 12(10), 452–457.
- Kotake, Y., Sagane, K., Owa, T., Mimori-Kiyosue, Y., Shimizu, H., Uesugi, M., Ishihama, Y., Iwata, M. & Mizui, Y. (2007). Splicing factor SF3b as a target of the antitumor natural product pladienolide. *Nature chemical biology*, 3(9), 570–575.
- Kraehmer, H., van Almsick, A., Beffa, R., Dietrich, H., Eckes, P., Hacker, E., Hain, R., Streck, H.J., Stuebler, H. & Willms, L. (2014). Herbicides as weed control agents: state of the art: II. Recent achievements. *Plant physiology*, 166(3), 1132–1148.
- Lagisetti, C., Palacios, G., Goronga, T., Freeman, B., Caufield, W. & Webb, T.R. (2013). Optimization of antitumor modulators of pre-mRNA splicing. *Journal of medicinal chemistry*, 56(24), 10033–10044.
- Lagisetti, C., Yermolina, M.V., Sharma, L.K., Palacios, G., Prigaro, B.J. & Webb, T.R. (2014). Pre-mRNA splicing-modulatory pharmacophores: the total synthesis of herboxidiene, a

- pladienolide-herboxidiene hybrid analog and related derivatives. *ACS chemical biology*, 9(3), 643–648.
- Laloum, T., Martín, G. & Duque, P. (2018). Alternative Splicing Control of Abiotic Stress Responses. *Trends in plant science*, 23(2), 140–150.
- Landau, D.A., Carter, S.L., Stojanov, P., McKenna, A., Stevenson, K., Lawrence, M.S., Sougnez, C., Stewart, C., Sivachenko, A., Wang, L., Wan, Y., Zhang, W., Shukla, S.A., Vartanov, A., Fernandes, S.M., Saksena, G., Cibulskis, K., Tesar, B., Gabriel, S., Hacohen, N., Meyerson, M., Lander, E.S., Neuberger, D., Brown, J.R., Getz, G. & Wu, C.J. (2013). Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell*, 152(4), 714–726.
- Landy, A. & Ross, W. (1977). Viral integration and excision: structure of the lambda att sites. *Science (New York, N.Y.)*, 197(4309), 1147–1160.
- Lauinger, I.L., Vivas, L., Perozzo, R., Stairiker, C., Tarun, A., Zloh, M., Zhang, X., Xu, H., Tonge, P.J., Franzblau, S.G., Pham, D.-H., Esguerra, C.V., Crawford, A.D., Maes, L. & Tasdemir, D. (2013). Potential of lichen secondary metabolites against Plasmodium liver stage parasites with FAS-II as the potential target. *Journal of natural products*, 76(6), 1064–1070.
- Leistner, E. (2012). Biosynthesis of Chorismate-Derived Quinones in Plant Cell Cultures. In Neumann, K.-H., Barz, W. & Reinhard, E. (Hrsg.), *Primary and secondary metabolism of plant cell cultures* (S. 215–224). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Li, H.-J., Li, X., Liu, N., Zhang, H., Truglio, J., Mishra, S., Kisker, C., Garcia-Diaz, M. & Tonge, P. (2011a). Crystal structure of *Escherichia coli* MenB in complex with substrate analogue, OSB-NCoA.
- Li, H.-J., Li, X., Liu, N., Zhang, H., Truglio, J.J., Mishra, S., Kisker, C., Garcia-Diaz, M. & Tonge, P.J. (2011b). Mechanism of the intramolecular Claisen condensation reaction catalyzed by MenB, a crotonase superfamily member. *Biochemistry*, 50(44), 9532–9544.
- Li, X., Liu, N., Zhang, H., Knudson, S.E., Li, H.-J., Lai, C.-T., Simmerling, C., Slayden, R.A. & Tonge, P.J. (2011c). CoA Adducts of 4-Oxo-4-Phenylbut-2-enoates. Inhibitors of MenB from the *M. tuberculosis* Menaquinone Biosynthesis Pathway. *ACS medicinal chemistry letters*, 2(11), 818–823.
- Li, X. & Manley, J.L. (2010). The Role of Alternative Splicing During the Cell Cycle and Programmed Cell Death. In *Handbook of Cell Signaling* (S. 2329–2333): Elsevier.
- Lin, C.-L., Taggart, A.J. & Fairbrother, W.G. (2016). RNA structure in splicing: An evolutionary perspective. *RNA biology*, 13(9), 766–771.
- Ling, Y., AlShareef, S., Butt, H., Lozano-Juste, J., Li, L., Galal, A.A., Moustafa, A., Momin, A.A., Tashkandi, M., Richardson, D.N., Fujii, H., Arold, S., Rodriguez, P.L., Duque, P. & Mahfouz, M.M. (2017). Pre-mRNA splicing repression triggers abiotic stress signaling in plants. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 89(2), 291–309.

- Liu, J., Sun, N., Liu, M., Liu, J., Du, B., Wang, X. & Qi, X. (2013). An autoregulatory loop controlling Arabidopsis HsfA2 expression: role of heat shock-induced alternative splicing. *Plant physiology*, *162*(1), 512–521.
- Liu, X., Fu, R., Pan, Y., Meza-Sosa, K.F., Zhang, Z. & Lieberman, J. (2018). PNPT1 Release from Mitochondria during Apoptosis Triggers Decay of Poly(A) RNAs. *Cell*, *174*(1), 187–201.e12.
- Lloyd, J.P., Seddon, A.E., Moghe, G.D., Simenc, M.C. & Shiu, S.-H. (2015). Characteristics of Plant Essential Genes Allow for within- and between-Species Prediction of Lethal Mutant Phenotypes. *The Plant cell*, *27*(8), 2133–2147.
- Lohmann, A., Schöttler, M.A., Bréhélin, C., Kessler, F., Bock, R., Cahoon, E.B. & Dörmann, P. (2006). Deficiency in phylloquinone (vitamin K1) methylation affects prenyl quinone distribution, photosystem I abundance, and anthocyanin accumulation in the Arabidopsis AtmenG mutant. *The Journal of biological chemistry*, *281*(52), 40461–40472.
- Lu, X., Zhou, R., Sharma, I., Li, X., Kumar, G., Swaminathan, S., Tonge, P.J. & Tan, D.S. (2012). Stable analogues of OSB-AMP. Potent inhibitors of MenE, the o-succinylbenzoate-CoA synthetase from bacterial menaquinone biosynthesis. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, *13*(1), 129–136.
- Madeira, F., Park, Y.M., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., Basutkar, P., Tivey, A.R.N., Potter, S.C., Finn, R.D. & Lopez, R. (2019). The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic acids research*, *47*(W1), W636–W641.
- Majumdar, R., Rajasekaran, K. & Cary, J.W. (2017). RNA Interference (RNAi) as a Potential Tool for Control of Mycotoxin Contamination in Crop Plants: Concepts and Considerations. *Frontiers in plant science*, *8*, 200.
- Marquez, Y., Brown, J.W.S., Simpson, C., Barta, A. & Kalyna, M. (2012). Transcriptome survey reveals increased complexity of the alternative splicing landscape in Arabidopsis. *Genome research*, *22*(6), 1184–1195.
- Masanga, J.O., Matheka, J.M., Omer, R.A., Ommeh, S.C., Monda, E.O. & Alakonya, A.E. (2015). Downregulation of transcription factor aflR in *Aspergillus flavus* confers reduction to aflatoxin accumulation in transgenic maize with alteration of host plant architecture. *Plant cell reports*, *34*(8), 1379–1387.
- Matarlo, J.S., Lu, Y., Daryaee, F., Daryaee, T., Ruzsicska, B., Walker, S.G. & Tonge, P.J. (2016). A Methyl 4-Oxo-4-phenylbut-2-enoate within VivoActivity against MRSA that Inhibits MenB in the Bacterial Menaquinone Biosynthesis Pathway. *ACS infectious diseases*, *2*(5), 329–340.

- Matlin, A.J. & Moore, M.J. (2007). Spliceosome assembly and composition. *Advances in experimental medicine and biology*, 623, 14–35.
- McCoy, R.M., Utturkar, S.M., Crook, J.W., Thimmapuram, J. & Widhalm, J.R. (2018). The origin and biosynthesis of the naphthalenoid moiety of juglone in black walnut. *Horticulture research*, 5, 67.
- Meganathan, R. & Kwon, O. (2009). Biosynthesis of Menaquinone (Vitamin K2) and Ubiquinone (Coenzyme Q). *EcoSal Plus*, 3(2).
- Meinke, D.W. (2020). Genome-wide identification of EMBRYO-DEFECTIVE (EMB) genes required for growth and development in Arabidopsis. *The New phytologist*, 226(2), 306–325.
- Michael Stadler (2020a). An introduction to QuasR. <https://bioconductor.org/packages/3.11/bioc/vignettes/QuasR/inst/doc/QuasR.html> (13.10.2020).
- Michael Stadler (2020b). Using eisaR for Exon-Intron Split Analysis (EISA). <https://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/vignettes/eisaR/inst/doc/eisaR.html> (13.10.2020).
- Michael Stadler, Dimos Gaidatzis, Lukas Burger, Charlotte Sonesson (2020). *eisaR*: Bioconductor.
- Moore, M.J., Wang, Q., Kennedy, C.J. & Silver, P.A. (2010). An alternative splicing network links cell-cycle control to apoptosis. *Cell*, 142(4), 625–636.
- Neamati, N., Hong, H., Mazumder, A., Wang, S., Sunder, S., Nicklaus, M.C., Milne, G.W., Proksa, B. & Pommier, Y. (1997). Depsides and depsidones as inhibitors of HIV-1 integrase: discovery of novel inhibitors through 3D database searching. *Journal of medicinal chemistry*, 40(6), 942–951.
- Ner-Gaon, H., Halachmi, R., Savaldi-Goldstein, S., Rubin, E., Ophir, R. & Fluhr, R. (2004). Intron retention is a major phenomenon in alternative splicing in Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 39(6), 877–885.
- Nicholas Provart, T.Z. (2003). A browser-based functional classification SuperViewer for Arabidopsis genomics. *Curr Comput Mol Biol*, 2003, 271–272.
- Papasaïkas, P. & Valcárcel, J. (2016). The Spliceosome: The Ultimate RNA Chaperone and Sculptor. *Trends in biochemical sciences*, 41(1), 33–45.
- Paudel, A., Hamamoto, H., Panthee, S. & Sekimizu, K. (2016). Menaquinone as a potential target of antibacterial agents. *Drug discoveries & therapeutics*, 10(3), 123–128.
- Qin, H., He, L. & Huang, R. (2019). The Coordination of Ethylene and Other Hormones in Primary Root Development. *Frontiers in plant science*, 10, 874.

- Raman, S., Vernon, R., Thompson, J., Tyka, M., Sadreyev, R., Pei, J., Kim, D., Kellogg, E., DiMaio, F., Lange, O., Kinch, L., Sheffler, W., Kim, B.-H., Das, R., Grishin, N.V. & Baker, D. (2009). Structure prediction for CASP8 with all-atom refinement using Rosetta. *Proteins*, *77 Suppl 9*, 89–99.
- Reumann, S. (2013). Biosynthesis of vitamin K1 (phylloquinone) by plant peroxisomes and its integration into signaling molecule synthesis pathways. *Sub-cellular biochemistry*, *69*, 213–229.
- Reumann, S., Babujee, L., Ma, C., Wienkoop, S., Siemsen, T., Antonicelli, G.E., Rasche, N., Lüder, F., Weckwerth, W. & Jahn, O. (2007). Proteome analysis of Arabidopsis leaf peroxisomes reveals novel targeting peptides, metabolic pathways, and defense mechanisms. *The Plant cell*, *19*(10), 3170–3193.
- Sakai, Y., Tsujita, T., Akiyama, T., Yoshida, T., Mizukami, T., Akinaga, S., Horinouchi, S., Yoshida, M. & Yoshida, T. (2002). GEX1 compounds, novel antitumor antibiotics related to herboxidiene, produced by *Streptomyces* sp. II. The effects on cell cycle progression and gene expression. *The Journal of antibiotics*, *55*(10), 863–872.
- Samatov, T.R., Wolf, A., Odenwälder, P., Bessonov, S., Deraeve, C., Bon, R.S., Waldmann, H. & Lührmann, R. (2012). Psoromic acid derivatives: a new family of small-molecule pre-mRNA splicing inhibitors discovered by a stage-specific high-throughput in vitro splicing assay. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, *13*(5), 640–644.
- Sanz, D.J., Hollywood, J.A., Scallan, M.F. & Harrison, P.T. (2017). Cas9/gRNA targeted excision of cystic fibrosis-causing deep-intronic splicing mutations restores normal splicing of CFTR mRNA. *PLoS one*, *12*(9), e0184009.
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M. & Ragg, T. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology*, *7*(1), 3.
- Seyffert, W. & Balling, R. (Hrsg.) (1998). *Lehrbuch der Genetik*, Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.
- Shang, X., Cao, Y. & Ma, L. (2017). Alternative Splicing in Plant Genes: A Means of Regulating the Environmental Fitness of Plants. *International journal of molecular sciences*, *18*(2).
- Shen, J., Zeng, Y., Zhuang, X., Sun, L., Yao, X., Pimpl, P. & Jiang, L. (2013). Organelle pH in the Arabidopsis endomembrane system. *Molecular plant*, *6*(5), 1419–1437.
- Shiferaw, B., Prasanna, B.M., Hellin, J. & Bänziger, M. (2011). Crops that feed the world 6. Past successes and future challenges to the role played by maize in global food security. *Food Security*, *3*(3), 307–327.
- Shimada, H., Ohno, R., Shibata, M., Ikegami, I., Onai, K., Ohto, M. & Takamiya, K. (2005). Inactivation and deficiency of core proteins of photosystems I and II caused by genetical

- phylloquinone and plastoquinone deficiency but retained lamellar structure in a T-DNA mutant of Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 41(4), 627–637.
- Sigfridsson, K., Hansson, O. & Brzezinski, P. (1995). Electrogenic light reactions in photosystem I: resolution of electron-transfer rates between the iron-sulfur centers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(8), 3458–3462.
- Slane, D., Lee, C.H., Kolb, M., Dent, C., Miao, Y., Franz-Wachtel, M., Lau, S., Maček, B., Balasubramanian, S., Bayer, M. & Jürgens, G. (2020). The integral spliceosomal component CWC15 is required for development in Arabidopsis. *Scientific reports*, 10(1), 13336.
- Solomon, S., D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M. Tignor and H.L. Miller (eds.) (Hrsg.) (2007). *Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA: Cambridge University Press.
- Song, H. & Guo, Z. (2012). Characterization of 1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-coenzyme A synthase (MenB) in phylloquinone biosynthesis of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Science China Chemistry*, 55(1), 98–105.
- Song, Y., DiMaio, F., Wang, R.Y.-R., Kim, D., Miles, C., Brunette, T., Thompson, J. & Baker, D. (2013). High-resolution comparative modeling with RosettaCM. *Structure (London, England : 1993)*, 21(10), 1735–1742.
- Steinschneider, A. & Druck, K. (1972). Ribonuclease properties and activity in the presence of dimethylsulfoxide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 287(1), 77–89.
- Steitz, T.A. & Steitz, J.A. (1993). A general two-metal-ion mechanism for catalytic RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(14), 6498–6502.
- Strasburger, E., Noll, F.C., Schimper, A.F.W., Kadereit, J.W., Körner, C., Kost, B. & Sonnewald, U. (2014). *Lehrbuch der Pflanzenwissenschaften*, Berlin: Springer Spektrum.
- Strawn, M.A., Marr, S.K., Inoue, K., Inada, N., Zubieta, C. & Wildermuth, M.C. (2007). Arabidopsis isochorismate synthase functional in pathogen-induced salicylate biosynthesis exhibits properties consistent with a role in diverse stress responses. *The Journal of biological chemistry*, 282(8), 5919–5933.
- Sun, Y., Song, H., Li, J., Jiang, M., Li, Y., Zhou, J. & Guo, Z. (2012). Active site binding and catalytic role of bicarbonate in 1,4-dihydroxy-2-naphthoyl coenzyme A synthases from vitamin K biosynthetic pathways. *Biochemistry*, 51(22), 4580–4589.
- Sun, Y., Song, H., Li, J., Li, Y., Jiang, M., Zhou, J. & Guo, Z. (2013). Structural basis of the induced-fit mechanism of 1,4-dihydroxy-2-naphthoyl coenzyme A synthase from the crotonase fold superfamily. *PloS one*, 8(4), e63095.

- Swinney, D.C. (2013). Phenotypic vs. target-based drug discovery for first-in-class medicines. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 93(4), 299–301.
- Szcześniak, M.W., Kabza, M., Pokrzywa, R., Gudyś, A. & Makalowska, I. (2013). ERISdb: a database of plant splice sites and splicing signals. *Plant & cell physiology*, 54(2), e10.
- Taber, H.W., Dellers, E.A. & Lombardo, L.R. (1981). Menaquinone biosynthesis in *Bacillus subtilis*: isolation of men mutants and evidence for clustering of men genes. *Journal of bacteriology*, 145(1), 321–327.
- Taiz, L. (Hrsg.) (2015). *Plant physiology and development*, Sunderland Mass.: Sinauer.
- Thomas, M.P., Liu, X., Whangbo, J., McCrossan, G., Sanborn, K.B., Basar, E., Walch, M. & Lieberman, J. (2015). Apoptosis Triggers Specific, Rapid, and Global mRNA Decay with 3' Uridylated Intermediates Degraded by DIS3L2. *Cell reports*, 11(7), 1079–1089.
- Torrens-Spence, M.P., Bobokalonova, A., Carballo, V., Glinkerman, C.M., Pluskal, T., Shen, A. & Weng, J.-K. (2019). PBS3 and EPS1 Complete Salicylic Acid Biosynthesis from Isochorismate in *Arabidopsis*. *Molecular plant*, 12(12), 1577–1586.
- Truglio, J.J., Theis, K., Feng, Y., Gajda, R., Machutta, C., Tonge, P.J. & Kisker, C. (2003). Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* MenB, a key enzyme in vitamin K2 biosynthesis. *The Journal of biological chemistry*, 278(43), 42352–42360.
- Turunen, J.J., Niemelä, E.H., Verma, B. & Frilander, M.J. (2013). The significant other: splicing by the minor spliceosome. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 4(1), 61–76.
- United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. World Population Prospects 2019, Volume I: Comprehensive Tables.
- Wachter, A., Rühl, C. & Stauffer, E. (2012). The Role of Polypyrimidine Tract-Binding Proteins and Other hnRNP Proteins in Plant Splicing Regulation. *Frontiers in plant science*, 3, 81.
- Wallace, B.J. & Young, I.G. (1977). Role of quinones in electron transport to oxygen and nitrate in *Escherichia coli*. Studies with a *ubiA*⁻ *menA*⁻ double quinone mutant. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 461(1), 84–100.
- Widhalm, J.R., Ducluzeau, A.-L., Buller, N.E., Elowsky, C.G., Olsen, L.J. & Basset, G.J.C. (2012). Phylloquinone (vitamin K(1)) biosynthesis in plants: two peroxisomal thioesterases of Lactobacillales origin hydrolyze 1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-CoA. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 71(2), 205–215.
- Widhalm, J.R. & Rhodes, D. (2016). Biosynthesis and molecular actions of specialized 1,4-naphthoquinone natural products produced by horticultural plants. *Horticulture research*, 3, 16046.
- Widhalm, J.R., van Oostende, C., Furt, F. & Basset, G.J.C. (2009). A dedicated thioesterase of the Hotdog-fold family is required for the biosynthesis of the naphthoquinone ring of

- vitamin K1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(14), 5599–5603.
- Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G. & Ausubel, F.M. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, 414(6863), 562–565.
- Wilks, J.C. & Slonczewski, J.L. (2007). pH of the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli*: rapid measurement by green fluorescent protein fluorimetry. *Journal of bacteriology*, 189(15), 5601–5607.
- Will, C.L. & Lührmann, R. (2005). Splicing of a rare class of introns by the U12-dependent spliceosome. *Biological chemistry*, 386(8), 713–724.
- Xu, H. (2009). *Mechanistic Studies of Potential Drug Targets against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*. Dissertation. Stony Brook University.
- Zhang, H.J., Sheng, X.R., Pan, X.M. & Zhou, J.M. (1997). Activation of adenylate kinase by denaturants is due to the increasing conformational flexibility at its active sites. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 238(2), 382–386.
- Zhang, R., Calixto, C.P.G., Marquez, Y., Venhuizen, P., Tzioutziou, N.A., Guo, W., Spensley, M., Entizne, J.C., Lewandowska, D., Have, S. ten, Frei Dit Frey, N., Hirt, H., James, A.B., Nimmo, H.G., Barta, A., Kalyna, M. & Brown, J.W.S. (2017). A high quality Arabidopsis transcriptome for accurate transcript-level analysis of alternative splicing. *Nucleic acids research*, 45(9), 5061–5073.
- ZHANG, P., DENG, H., XIAO, F. & LIU, Y. (2013). Alterations of Alternative Splicing Patterns of Ser/Arg-Rich (SR) Genes in Response to Hormones and Stresses Treatments in Different Ecotypes of Rice (*Oryza sativa*). *Journal of Integrative Agriculture*, 12(5), 737–748.
- Zhu, F.-Y., Chen, M.-X., Ye, N.-H., Shi, L., Ma, K.-L., Yang, J.-F., Cao, Y.-Y., Zhang, Y., Yoshida, T., Fernie, A.R., Fan, G.-Y., Wen, B., Zhou, R., Liu, T.-Y., Fan, T., Gao, B., Di Zhang, Hao, G.-F., Xiao, S., Liu, Y.-G. & Zhang, J. (2017). Proteogenomic analysis reveals alternative splicing and translation as part of the abscisic acid response in *Arabidopsis* seedlings. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 91(3), 518–533.

Anhang

Anhang I Proteinsequenzabgleich DHNS, MenB

MENB_MYCTU	-----MVAPAGEQGRSSTALSDNPFDAKA-	24
DHNS_ARATH	MADSNELGSASRRLSVVTNHLIPIGFSPARADSVELCSASSMDDRFHKVHGEVPTHEVVW	60
MENB_ECOLI	-----MIYPDEAMLY	10
P73495_SYNY3	-----	0
MENB_MYCTU	----WRLVDGFDDLTDITYHRHVDDATVRVAFNRPEVRNAFRPHTVDELYRVLDHARMS	80
DHNS_ARATH	KKTDFFGEGDNKEFVDIIEKALDEGIAKITINRPERRNAFRPQTVKELMRAFNDARDD	120
MENB_ECOLI	APVEWH--DCSEGFEDIRYEKS-TDGIAKITINRPQVRNAFRPLTVKEMIQALADARYDD	67
P73495_SYNY3	--MDWH--IAK-HYDDILYY-K-AGGIKIVINRPHKRNAFRPQTVFELYDAFCNAREDN	53
	: ** * . :.:***. ***** ** *: .: .** .	
MENB_MYCTU	DVGVVLLTGNGPSPKGGWAFCSGGDQRIQR-SGYQYASGDTADTVDVARAGRLHILEV	139
DHNS_ARATH	SVGVIILTGKG-----TKAFCSGGDQALRTQ-DGYA-----DPNDVGRNLNVLDL	163
MENB_ECOLI	NIGVVIILTGAG-----DKAFCSGGDQKVRGDYGGYK-----DDSGVHHLNVLDF	111
P73495_SYNY3	RIGVVLLTGAGPH-SDGKYAFCSGGDQSVRGE-GGYI-----DDQGTPrLNVLDL	101
	:*.:*** * ***** :* .** * . :*.:*.:.	
MENB_MYCTU	QRLIRFMPKVVICLVNGWAAGGGHSLHVVCDLTLASREYARFKQTDADVGSFDGGYGSAY	199
DHNS_ARATH	QVQIRRLPKPVIAMVAGYAVGGGHILHMVCDLTIAAD-NAIFGQTGPKVGSFDAGYGSSI	222
MENB_ECOLI	QRQIRTCPKPVVAMVAGYSIGGGHVLHMMCDLTIAAD-NAIFGQTGPKVGSFDGGWGASY	170
P73495_SYNY3	QRLIRSMKVVIALVAGYAIAGGGHVLHLVCDLTIAAD-NAIFGQTGPKVGSFDGGFGSSY	160
	* ** ** * :.* * :. :**** ** :***** :* : * * * . *****.* :.:	
MENB_MYCTU	LARQVGQKFAREIFFLGRITYTAEQMHQMGAVNAVAEHALETVGLQWAAEINAKSPQAQR	259
DHNS_ARATH	MSRLVGPKKAREMWFMTFRFYTASEAEKMGINTVVPLEDELEKETVKWCREILRNSPTAIR	282
MENB_ECOLI	MARIVGQKKAREIWFLCRQYDAKQALDMGLVNTVVPPLADLEKETVWRCREMLQNSPMALR	230
P73495_SYNY3	LARIVGQKKAREIWYLCRQYSAQEAERMGMVNTVVPVDRLEEEGIQWAKEILSKSPLAIR	220
	::* ** * ***:.: * * *.: ** :*.:. ** :.*. * : :* * *	
MENB_MYCTU	MLKFAFNLLDDGLVGQQLFAGEATRLAYMTDEAVEGRDAFLQKRPPDWSPPFRYF	314
DHNS_ARATH	VLKAAALNAVDDGHAGLQGLGGDATLLFYGTTEEATEGRTAYMHRPPDFSKFHRRP	337
MENB_ECOLI	CLKAAALNADCDGQAGLQELAGNATMLFYMTEEGQEGRNAFNQKRQPDFSKFKRNP	285
P73495_SYNY3	CLKAAFNADCDGQAGLQELAGNATLLYMTTEEGSEGKQAFLEKRPPDFSQYPWLP	275
	** *:* ** . * * :.*:*** * * *.*. ** :* :.* ** * * :	

- R-Skript: Enzymkinetik; nichtlineare Regressionsanalyse nach Michaelis-Menten

```
# import benötigter Pakete
>library(drc)
# Variablen definieren
>S <- c(a,b,b,...) #Substratkonzentrationen
>V <- c(Va, Vb,Vc,...) # zugehörige Reaktionsgeschwindigkeit (gemessen)
>df <- data.frame(S,V)
#Erstellen des Modells
>model.mm <- drm(V~S, data = df, fct = MM.2()) #baut Model auf den Daten auf und
liefert Vmax- (d:) und Km-wert (e:)
>summary(model.mm)
#Erstellen von Sequenz für Abbildung
mm.curve <- data.frame(S = seq(0, max(df$S), length.out = 100))
mm.curve$V <- predict(model.mm, newdata = mm.curve)
```

- Berechnung Bestimmtheitsmaß

$$\text{Mittelwert}_{\text{gemessen}}: \bar{v} = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^n v_j$$

$$\text{Gesamtstreuung: } SQ_v := \sum_{j=1}^n (v_j - \bar{v})^2$$

$$\text{erklärte Streuung: } SQ_x := \sum_{j=1}^n (x_j - \bar{v})^2$$

$$\text{Bestimmtheitsmaß: } R^2 = \frac{SQ_x}{SQ_v}$$

- Rohdaten gekoppelter Enzymassay
 - Pro Substratkonzentration (Spalten) wurden drei unabhängige Serien über 493 Sekunden (Zeilen) aufgenommen.
 - Die in Blau dargestellten Werte wurden nicht für die Ermittlung der Kinetik verwendet.
 - Ungehemmte Reaktion

	5			10			30			60			120			200		
0	-0.014	-0.012	-0.012	-0.011	-0.009	-0.008	-0.007	-0.006	-0.005	-0.003	-8.3E-05	-0.001	0.002	0.000317	0.002	0.000717	0.002	0.001
17	-0.012	-0.012	-0.011	-0.009	-0.006	-0.006	-0.003	-0.002	-0.00035	0.004	0.005	0.003	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006
34	-0.012	-0.011	-0.011	-0.009*	-0.009*	-0.008*	-0.00072	0.000383	0.000783	0.006	0.007	0.005	0.01	0.009	0.009	0.009	0.01	0.008
51	-0.01	-0.009	-0.01	-0.007*	-0.006*	-0.007*	0.002	0.004	0.004	0.008	0.011	0.009	0.014	0.012	0.012	0.014	0.013	0.01
68*	-0.01	-0.01	-0.01	-0.007*	-0.007*	-0.008*	0.003	0.004	0.004	0.011	0.011	0.011	0.015	0.015	0.016	0.016	0.014	0.013
85*	-0.011	-0.008	-0.01	-0.007*	-0.006*	-0.006*	0.005	0.006	0.005	0.013	0.015	0.011	0.019	0.018	0.018	0.018	0.017	0.015
102*	-0.011	-0.01	-0.01	-0.006*	-0.006*	-0.007*	0.005	0.005	0.005	0.015	0.016	0.014	0.02	0.019	0.02	0.021	0.018	0.019
119*	-0.013	-0.008	-0.011	-0.009*	-0.005*	-0.006*	0.004	0.007	0.006	0.015	0.018	0.015	0.022	0.021	0.022	0.022	0.022	0.019
136*	-0.011	-0.009	-0.009	-0.008*	-0.004*	-0.005*	0.006	0.008	0.01	0.017	0.018	0.016	0.024	0.024	0.024	0.022	0.022	0.022
153*	-0.012	-0.01	-0.01	-0.007*	-0.006*	-0.007*	0.007*	0.009*	0.01*	0.019*	0.02*	0.019*	0.027	0.026	0.025	0.026	0.026	0.027
170*	-0.012	-0.009	-0.01	-0.008*	-0.006*	-0.007*	0.008*	0.01*	0.011*	0.02*	0.022*	0.021*	0.029	0.028	0.028	0.027	0.028	0.027
187*	-0.013	-0.01	-0.009	-0.008*	-0.006*	-0.006*	0.009*	0.01*	0.012*	0.022*	0.024*	0.022*	0.032	0.032	0.029	0.03	0.03	0.028
204*	-0.012	-0.011	-0.01	-0.007*	-0.005*	-0.006*	0.011*	0.012*	0.012*	0.024*	0.025*	0.024*	0.032	0.032	0.033	0.03	0.031	0.029
221*	-0.01	-0.009	-0.01	-0.005*	-0.006*	-0.005*	0.012*	0.016*	0.013*	0.027*	0.025*	0.026*	0.036	0.034	0.034	0.034	0.034	0.032
238*	-0.012*	-0.009*	-0.01*	-0.008*	-0.005*	-0.005*	0.014*	0.014*	0.014*	0.026*	0.028*	0.027*	0.037	0.036	0.036	0.035	0.037	0.033
255*	-0.012*	-0.01*	-0.011*	-0.008*	-0.006*	-0.006*	0.014*	0.016*	0.015*	0.03*	0.03*	0.028*	0.038	0.04	0.038	0.039	0.037	0.034
272*	-0.012*	-0.011*	-0.011*	-0.007*	-0.006*	-0.004*	0.014*	0.015*	0.015*	0.03*	0.031*	0.03*	0.043	0.041	0.041	0.041	0.041	0.036
289*	-0.012*	-0.01*	-0.01*	-0.005*	-0.006*	-0.004*	0.015*	0.016*	0.016*	0.03*	0.033*	0.03*	0.042	0.042	0.042	0.041	0.042	0.038
306*	-0.012*	-0.009*	-0.01*	-0.006*	-0.006*	-0.006*	0.015*	0.018*	0.018*	0.032*	0.034*	0.032*	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.04
323*	-0.012*	-0.01*	-0.01*	-0.006*	-0.007*	-0.005*	0.016*	0.017*	0.018*	0.034*	0.036*	0.034*	0.045	0.046	0.043	0.045	0.046	0.041
340*	-0.013*	-0.01*	-0.01*	-0.007*	-0.006*	-0.006*	0.016*	0.019*	0.017*	0.036*	0.036*	0.036*	0.047	0.046	0.046	0.046	0.046	0.042
357*	-0.012*	-0.011*	-0.012*	-0.007*	-0.006*	-0.005*	0.018*	0.018*	0.019*	0.037*	0.039*	0.037*	0.049	0.048	0.049	0.049	0.048	0.044
374*	-0.013*	-0.012*	-0.013*	-0.008*	-0.007*	-0.007*	0.016*	0.018*	0.018*	0.038*	0.038*	0.036*	0.05	0.049	0.048	0.048	0.051	0.047
391*	-0.013*	-0.01*	-0.012*	-0.008*	-0.004*	-0.007*	0.019*	0.021*	0.019*	0.04*	0.042*	0.04*	0.054	0.051	0.051	0.05	0.052	0.047
408*	-0.013*	-0.012*	-0.012*	-0.008*	-0.007*	-0.007*	0.018*	0.018*	0.018*	0.04*	0.041*	0.039*	0.055	0.052	0.051	0.052	0.052	0.047
425*	-0.014*	-0.014*	-0.014*	-0.009*	-0.007*	-0.008*	0.016*	0.017*	0.019*	0.04*	0.041*	0.04*	0.055	0.053	0.054	0.051	0.054	0.048
442*	-0.015*	-0.013*	-0.014*	-0.008*	-0.006*	-0.008*	0.018*	0.019*	0.019*	0.041*	0.042*	0.042*	0.056	0.055	0.055	0.053	0.055	0.05
459*	-0.014*	-0.013*	-0.013*	-0.008*	-0.007*	-0.008*	0.019*	0.021*	0.019*	0.044*	0.043*	0.043*	0.058	0.056	0.056	0.056	0.056	0.05
476*	-0.016*	-0.015*	-0.015*	-0.008*	-0.007*	-0.009*	0.019*	0.019*	0.019*	0.042*	0.043*	0.042*	0.059	0.057	0.058	0.056	0.056	0.053
493*	-0.016*	-0.012*	-0.013*	-0.008*	-0.008*	-0.009*	0.018*	0.019*	0.019*	0.044*	0.044*	0.043*	0.06	0.059	0.059	0.059	0.059	0.053

○ 250 μM MOCB-CoA

	5			10			30			60			120			200		
0*	0.012	0.02	0.016	0.017	0.017	0.018	0.021	0.021	0.022	0.028	0.029	0.026	0.028	0.028	0.029	0.028	0.03	0.03
17	0.015	0.017	0.016	0.024	0.019	0.018	0.024	0.026	0.025	0.032	0.031	0.03	0.033	0.033	0.034	0.032	0.034	0.036
34	0.016	0.02	0.018	0.027	0.023	0.021	0.026	0.031	0.027	0.036	0.037	0.034	0.038	0.038	0.037	0.038	0.04	0.039
51	0.016	0.019	0.018	0.028	0.021	0.024	0.029	0.03	0.028	0.038	0.038	0.037	0.04	0.04	0.041	0.039	0.044	0.043
68	0.016*	0.019*	0.016*	0.03*	0.021*	0.022*	0.03*	0.032*	0.03*	0.042	0.04	0.038	0.044	0.041	0.045	0.043	0.046	0.046
85	0.017*	0.018*	0.015*	0.03*	0.021*	0.021*	0.03*	0.032*	0.031*	0.041	0.043	0.04	0.045	0.045	0.046	0.044	0.051	0.047
102*	0.016*	0.019*	0.017*	0.028*	0.022*	0.021*	0.032*	0.035*	0.034*	0.044*	0.044*	0.042*	0.047*	0.046*	0.048*	0.05*	0.052*	0.052*
119*	0.014*	0.018*	0.016*	0.027*	0.023*	0.02*	0.034*	0.035*	0.035*	0.048*	0.044*	0.045*	0.05*	0.049*	0.049*	0.051*	0.054*	0.054*
136*	0.016*	0.018*	0.018*	0.029*	0.021*	0.02*	0.034*	0.035*	0.034*	0.049*	0.048*	0.046*	0.053*	0.052*	0.053*	0.055*	0.056*	0.057*
153*	0.017*	0.021*	0.02*	0.035*	0.024*	0.022*	0.036*	0.037*	0.036*	0.052*	0.051*	0.049*	0.054*	0.055*	0.056*	0.056*	0.06*	0.062*
170*	0.017*	0.018*	0.018*	0.038*	0.022*	0.022*	0.037*	0.039*	0.037*	0.053*	0.053*	0.051*	0.058*	0.056*	0.057*	0.059*	0.062*	0.061*
187*	0.016*	0.019*	0.017*	0.04*	0.022*	0.023*	0.038*	0.04*	0.039*	0.056*	0.053*	0.052*	0.06*	0.06*	0.06*	0.059*	0.065*	0.065*
204*	0.016*	0.019*	0.019*	0.037*	0.025*	0.028*	0.039*	0.041*	0.041*	0.059*	0.055*	0.054*	0.064*	0.061*	0.064*	0.062*	0.065*	0.068*
221*	0.017*	0.018*	0.016*	0.03*	0.023*	0.036*	0.039*	0.04*	0.04*	0.058*	0.056*	0.055*	0.063*	0.063*	0.064*	0.062*	0.068*	0.069*
238*	0.017*	0.019*	0.018*	0.028*	0.025*	0.029*	0.042*	0.043*	0.042*	0.058*	0.058*	0.059*	0.065*	0.066*	0.067*	0.066*	0.071*	0.07*
255*	0.014*	0.018*	0.016*	0.026*	0.024*	0.022*	0.042*	0.042*	0.04*	0.06*	0.06*	0.057*	0.066*	0.066*	0.068*	0.066*	0.073*	0.071*
272*	0.014*	0.016*	0.016*	0.026*	0.024*	0.024*	0.043*	0.043*	0.041*	0.062*	0.061*	0.057*	0.068*	0.069*	0.07*	0.068*	0.075*	0.072*
289*	0.015*	0.018*	0.016*	0.027*	0.022*	0.024*	0.041*	0.042*	0.045*	0.06*	0.059*	0.058*	0.068*	0.068*	0.073*	0.069*	0.076*	0.073*
306*	0.014*	0.016*	0.015*	0.027*	0.028*	0.02*	0.041*	0.042*	0.049*	0.06*	0.059*	0.06*	0.068*	0.068*	0.07*	0.07*	0.076*	0.075*
323*	0.012*	0.015*	0.014*	0.027*	0.02*	0.022*	0.04*	0.043*	0.051*	0.061*	0.06*	0.058*	0.07*	0.07*	0.072*	0.07*	0.079*	0.078*
340*	0.012*	0.013*	0.013*	0.028*	0.018*	0.018*	0.04*	0.042*	0.046*	0.063*	0.06*	0.06*	0.07*	0.071*	0.074*	0.072*	0.079*	0.076*
357*	0.01*	0.014*	0.012*	0.029*	0.018*	0.019*	0.039*	0.042*	0.044*	0.062*	0.061*	0.061*	0.073*	0.072*	0.074*	0.073*	0.078*	0.078*
374*	0.011*	0.014*	0.012*	0.027*	0.017*	0.02*	0.042*	0.042*	0.051*	0.065*	0.062*	0.062*	0.072*	0.073*	0.076*	0.074*	0.08*	0.079*
391*	0.009*	0.013*	0.011*	0.031*	0.019*	0.018*	0.04*	0.042*	0.052*	0.063*	0.061*	0.062*	0.074*	0.074*	0.078*	0.075*	0.08*	0.081*
408*	0.009*	0.012*	0.01*	0.036*	0.018*	0.016*	0.042*	0.043*	0.041*	0.063*	0.063*	0.062*	0.076*	0.076*	0.079*	0.077*	0.084*	0.083*
425*	0.009*	0.012*	0.007*	0.036*	0.018*	0.017*	0.041*	0.043*	0.041*	0.065*	0.064*	0.065*	0.075*	0.076*	0.078*	0.077*	0.084*	0.083*
442*	0.01*	0.014*	0.01*	0.035*	0.017*	0.019*	0.041*	0.044*	0.043*	0.064*	0.065*	0.064*	0.077*	0.078*	0.08*	0.079*	0.085*	0.084*
459*	0.01*	0.011*	0.009*	0.032*	0.017*	0.016*	0.04*	0.042*	0.046*	0.066*	0.065*	0.064*	0.078*	0.079*	0.08*	0.079*	0.086*	0.084*
476*	0.007*	0.011*	0.009*	0.024*	0.015*	0.017*	0.041*	0.043*	0.048*	0.066*	0.064*	0.063*	0.078*	0.078*	0.08*	0.079*	0.085*	0.086*
493*	0.008*	0.009*	0.008*	0.025*	0.017*	0.016*	0.041*	0.042*	0.048*	0.066*	0.065*	0.066*	0.078*	0.08*	0.084*	0.081*	0.087*	0.088*

○ 500 μM MOCB-CoA

	5			10			30			60			120			200		
0	-0.024*	-0.022*	-0.023*	-0.026*	-0.021*	-0.022*	-0.02*	-0.017*	-0.019*	-0.016*	-0.015*	-0.014*	-0.014*	-0.012*	-0.013*	-0.013*	-0.012*	-0.012*
17	-0.01*	-0.022*	-0.023*	-0.022	-0.017	-0.02	-0.016*	-0.013*	-0.016*	-0.011*	-0.01*	-0.011*	-0.007*	-0.009*	-0.008*	-0.007*	-0.008*	-0.006*
34	-0.011*	-0.022*	-0.019*	-0.023	-0.019	-0.023	-0.014	-0.015	-0.016	-0.009	-0.009	-0.01	-0.006	-0.005	-0.006	-0.006*	-0.006	-0.004
51	-0.01*	-0.022*	-0.022*	-0.021	-0.019	-0.02	-0.014	-0.013	-0.012	-0.007	-0.006	-0.007	-0.002	-0.002	-0.003	-0.001*	-0.00092	-0.001
68	-0.015*	-0.021*	-0.021*	-0.02	-0.017	-0.019	-0.01	-0.01	-0.012	-0.003	-0.004	-0.004	0.001	0.000467	0.002	0.002*	0.004	0.00096667*
85	-0.02*	-0.02*	-0.02*	-0.018	-0.017	-0.019	-0.011	-0.008	-0.01	-0.002	-0.00073	6.67E-05	0.004	0.004	0.004	0.004*	0.004	0.004
102	-0.02*	-0.021*	-0.022*	-0.018*	-0.018*	-0.019*	-0.008	-0.006	-0.009	3.33E-05	0.003	0.000633	0.006	0.006	0.005	0.007	0.008	0.006
119	-0.02*	-0.021*	-0.019*	-0.019*	-0.018*	-0.017*	-0.007	-0.004	-0.008	0.003	0.002	0.002	0.01	0.009	0.006	0.011	0.01	0.01
136	-0.02*	-0.022*	-0.021*	-0.02*	-0.019*	-0.018*	-0.008	-0.004	-0.007	0.003	0.005	0.004	0.011	0.01	0.008	0.011	0.01	0.011
153	-0.021*	-0.021*	-0.022*	-0.019*	-0.017*	-0.017*	-0.007	-0.005	-0.006	0.005	0.007	0.006	0.012	0.011	0.011	0.014	0.012	0.014
170*	-0.02*	-0.022*	-0.021*	-0.019*	-0.016*	-0.019*	-0.007	-0.003	-0.007	0.007	0.006	0.006	0.013	0.014	0.011	0.015	0.015	0.015
187*	-0.007*	-0.025*	-0.022*	-0.019*	-0.016*	-0.019*	-0.006	-0.004	-0.005	0.007	0.008	0.006	0.015	0.015	0.013	0.015	0.016	0.017
204*	-0.013*	-0.023*	-0.021*	-0.019*	-0.018*	-0.017*	-0.005	-0.003	-0.004	0.01	0.01	0.01	0.016	0.018	0.016	0.019	0.018	0.018
221*	-0.021*	-0.022*	-0.022*	-0.017*	-0.017*	-0.017*	-0.004	-0.002	-0.005	0.01	0.012	0.01	0.021	0.019	0.017	0.022	0.02	0.02
238*	-0.018*	-0.022*	-0.021*	-0.017*	-0.018*	-0.018*	-0.002	-0.00078	-0.003	0.012	0.013	0.012	0.022	0.022	0.018	0.022	0.022	0.022
255*	-0.015*	-0.023*	-0.022*	-0.018*	-0.018*	-0.018*	-0.004	-0.00053	-0.003	0.013	0.015	0.013	0.022	0.022	0.022	0.024	0.024	0.023
272*	-0.019*	-0.02*	-0.021*	-0.016*	-0.016*	-0.018*	-0.003	0.001	-0.002	0.014	0.016	0.015	0.026	0.026	0.022	0.028	0.026	0.026
289*	-0.021*	-0.021*	-0.022*	-0.018*	-0.016*	-0.017*	-0.002	0.002	0.00075	0.017	0.016	0.016	0.024	0.026	0.024	0.028	0.027	0.028
306*	-0.022*	-0.021*	-0.021*	-0.017*	-0.016*	-0.013*	-0.00062	0.001	-1.7E-05	0.018	0.019	0.017	0.027	0.028	0.024	0.028	0.028	0.029
323*	-0.022*	-0.022*	-0.021*	-0.017*	-0.017*	-0.016*	-0.00015	0.002	0.00005	0.017	0.019	0.016	0.027	0.028	0.027	0.03	0.029	0.031
340*	-0.014*	-0.022*	-0.021*	-0.018*	-0.017*	-0.013*	0.000917	0.002	-8.3E-05	0.02	0.021	0.018	0.03	0.031	0.028	0.034	0.031	0.032
357*	-0.01*	-0.02*	-0.021*	-0.017*	-0.017*	-0.016*	0.002	0.000983	0.002	0.021	0.021	0.02	0.032	0.03	0.029	0.035	0.032	0.035
374*	-0.01*	-0.023*	-0.022*	-0.018*	-0.018*	-0.018*	0.00065	0.001	0.002	0.02	0.022	0.019	0.031	0.031	0.03	0.034	0.034	0.034
391*	-0.017*	-0.021*	-0.022*	-0.018*	-0.017*	-0.018*	0.002	0.003	0.000667	0.021	0.022	0.019	0.032	0.033	0.031	0.036	0.034	0.035
408*	-0.02*	-0.02*	-0.021*	-0.018*	-0.016*	-0.016*	0.001	0.005	0.004	0.024	0.023	0.022	0.035	0.036	0.035	0.038	0.036	0.038
425*	-0.021*	-0.022*	-0.022*	-0.017*	-0.017*	-0.016*	0.003	0.006	0.004	0.022	0.024	0.022	0.036	0.036	0.035	0.038	0.037	0.037
442*	-0.017*	-0.021*	-0.022*	-0.017*	-0.016*	-0.016*	0.004	0.004	0.004	0.026	0.026	0.024	0.037	0.038	0.036	0.04	0.039	0.041
459*	-0.016*	-0.022*	-0.023*	-0.018*	-0.016*	-0.017*	0.003	0.006	0.003	0.026	0.026	0.024	0.039	0.039	0.036	0.042	0.038	0.042
476*	-0.016*	-0.02*	-0.021*	-0.017*	-0.014*	-0.018*	0.006	0.008	0.006	0.028	0.028	0.026	0.04	0.04	0.038	0.043	0.041	0.043
493*	-0.019*	-0.021*	-0.02*	-0.017*	-0.016*	-0.017*	0.006	0.007	0.004	0.029	0.029	0.026	0.04	0.041	0.038	0.045	0.043	0.043

○ 1000 μM MOCB-CoA

	5			10			30			60			120			200		
0	-0.024*	-0.022*	-0.023*	-0.026*	-0.021*	-0.022*	-0.02*	-0.017*	-0.019*	-0.016*	-0.015*	-0.014*	-0.014*	-0.012*	-0.013*	-0.013*	-0.012*	-0.012*
17	-0.01*	-0.022*	-0.023*	-0.022	-0.017	-0.02	-0.016*	-0.013*	-0.016*	-0.011*	-0.01*	-0.011*	-0.007*	-0.009*	-0.008*	-0.007*	-0.008*	-0.006*
34	-0.011*	-0.022*	-0.019*	-0.023	-0.019	-0.023	-0.014	-0.015	-0.016	-0.009	-0.009	-0.01	-0.006	-0.005	-0.006	-0.006*	-0.006	-0.004
51	-0.01*	-0.022*	-0.022*	-0.021	-0.019	-0.02	-0.014	-0.013	-0.012	-0.007	-0.006	-0.007	-0.002	-0.002	-0.003	-0.001*	-0.00092	-0.001
68	-0.015*	-0.021*	-0.021*	-0.02	-0.017	-0.019	-0.01	-0.01	-0.012	-0.003	-0.004	-0.004	0.001	0.000467	0.002	0.002*	0.004	0.00096667*
85	-0.02*	-0.02*	-0.02*	-0.018	-0.017	-0.019	-0.011	-0.008	-0.01	-0.002	-0.00073	6.67E-05	0.004	0.004	0.004	0.004*	0.004	0.004
102	-0.02*	-0.021*	-0.022*	-0.018*	-0.018*	-0.019*	-0.008	-0.006	-0.009	3.33E-05	0.003	0.000633	0.006	0.006	0.005	0.007	0.008	0.006
119	-0.02*	-0.021*	-0.019*	-0.019*	-0.018*	-0.017*	-0.007	-0.004	-0.008	0.003	0.002	0.002	0.01	0.009	0.006	0.011	0.01	0.01
136	-0.02*	-0.022*	-0.021*	-0.02*	-0.019*	-0.018*	-0.008	-0.004	-0.007	0.003	0.005	0.004	0.011	0.01	0.008	0.011	0.01	0.011
153	-0.021*	-0.021*	-0.022*	-0.019*	-0.017*	-0.017*	-0.007	-0.005	-0.006	0.005	0.007	0.006	0.012	0.011	0.011	0.014	0.012	0.014
170*	-0.02*	-0.022*	-0.021*	-0.019*	-0.016*	-0.019*	-0.007	-0.003	-0.007	0.007	0.006	0.006	0.013	0.014	0.011	0.015	0.015	0.015
187*	-0.007*	-0.025*	-0.022*	-0.019*	-0.016*	-0.019*	-0.006	-0.004	-0.005	0.007	0.008	0.006	0.015	0.015	0.013	0.015	0.016	0.017
204*	-0.013*	-0.023*	-0.021*	-0.019*	-0.018*	-0.017*	-0.005	-0.003	-0.004	0.01	0.01	0.01	0.016	0.018	0.016	0.019	0.018	0.018
221*	-0.021*	-0.022*	-0.022*	-0.017*	-0.017*	-0.017*	-0.004	-0.002	-0.005	0.01	0.012	0.01	0.021	0.019	0.017	0.022	0.02	0.02
238*	-0.018*	-0.022*	-0.021*	-0.017*	-0.018*	-0.018*	-0.002	-0.00078	-0.003	0.012	0.013	0.012	0.022	0.022	0.018	0.022	0.022	0.022
255*	-0.015*	-0.023*	-0.022*	-0.018*	-0.018*	-0.018*	-0.004	-0.00053	-0.003	0.013	0.015	0.013	0.022	0.022	0.022	0.024	0.024	0.023
272*	-0.019*	-0.02*	-0.021*	-0.016*	-0.016*	-0.018*	-0.003	0.001	-0.002	0.014	0.016	0.015	0.026	0.026	0.022	0.028	0.026	0.026
289*	-0.021*	-0.021*	-0.022*	-0.018*	-0.016*	-0.017*	-0.002	0.002	0.00075	0.017	0.016	0.016	0.024	0.026	0.024	0.028	0.027	0.028
306*	-0.022*	-0.021*	-0.021*	-0.017*	-0.016*	-0.013*	-0.00062	0.001	-1.7E-05	0.018	0.019	0.017	0.027	0.028	0.024	0.028	0.028	0.029
323*	-0.022*	-0.022*	-0.021*	-0.017*	-0.017*	-0.016*	-0.00015	0.002	0.00005	0.017	0.019	0.016	0.027	0.028	0.027	0.03	0.029	0.031
340*	-0.014*	-0.022*	-0.021*	-0.018*	-0.017*	-0.013*	0.000917	0.002	-8.3E-05	0.02	0.021	0.018	0.03	0.031	0.028	0.034	0.031	0.032
357*	-0.01*	-0.02*	-0.021*	-0.017*	-0.017*	-0.016*	0.002	0.000983	0.002	0.021	0.021	0.02	0.032	0.03	0.029	0.035	0.032	0.035
374*	-0.01*	-0.023*	-0.022*	-0.018*	-0.018*	-0.018*	0.00065	0.001	0.002	0.02	0.022	0.019	0.031	0.031	0.03	0.034	0.034	0.034
391*	-0.017*	-0.021*	-0.022*	-0.018*	-0.017*	-0.018*	0.002	0.003	0.000667	0.021	0.022	0.019	0.032	0.033	0.031	0.036	0.034	0.035
408*	-0.02*	-0.02*	-0.021*	-0.018*	-0.016*	-0.016*	0.001	0.005	0.004	0.024	0.023	0.022	0.035	0.036	0.035	0.038	0.036	0.038
425*	-0.021*	-0.022*	-0.022*	-0.017*	-0.017*	-0.016*	0.003	0.006	0.004	0.022	0.024	0.022	0.036	0.036	0.035	0.038	0.037	0.037
442*	-0.017*	-0.021*	-0.022*	-0.017*	-0.016*	-0.016*	0.004	0.004	0.004	0.026	0.026	0.024	0.037	0.038	0.036	0.04	0.039	0.041
459*	-0.016*	-0.022*	-0.023*	-0.018*	-0.016*	-0.017*	0.003	0.006	0.003	0.026	0.026	0.024	0.039	0.039	0.036	0.042	0.038	0.042
476*	-0.016*	-0.02*	-0.021*	-0.017*	-0.014*	-0.018*	0.006	0.008	0.006	0.028	0.028	0.026	0.04	0.04	0.038	0.043	0.041	0.043
493*	-0.019*	-0.021*	-0.02*	-0.017*	-0.016*	-0.017*	0.006	0.007	0.004	0.029	0.029	0.026	0.04	0.041	0.038	0.045	0.043	0.043

○ 2000 μM MOCB-CoA

	5			10			30			60			120			200		
0*	0.02	0.019	0.019	0.018	0.021	0.022	0.02	0.023	0.024	0.026	0.028	0.026	0.026	0.026	0.027	0.027	0.027	0.028
17*	0.02	0.021	0.017	0.02	0.021	0.022	0.023	0.024	0.023	0.027	0.028	0.026	0.029	0.03	0.031	0.03	0.031	0.03
34*	0.018	0.021	0.02	0.021	0.022	0.02	0.023	0.025	0.024	0.03	0.029	0.03	0.031	0.031	0.032	0.033	0.033	0.032
51	0.018	0.02	0.019	0.022	0.022	0.02	0.024	0.025	0.026	0.031	0.03	0.03	0.033	0.034	0.035	0.035	0.035	0.034
68	0.021	0.025	0.02	0.021	0.023	0.022	0.025	0.028	0.028	0.031	0.032	0.031	0.036	0.037	0.036	0.038	0.036	0.036
85	0.024	0.022	0.021	0.023	0.025	0.024	0.028	0.027	0.029	0.034	0.034	0.034	0.038	0.039	0.04	0.04	0.04	0.04
102	0.023	0.026	0.02	0.023	0.027	0.025	0.03	0.03	0.028	0.035	0.035	0.035	0.041	0.041	0.041	0.042	0.042	0.042
119	0.02	0.024	0.021	0.021	0.024	0.022	0.027	0.029	0.03	0.036	0.036	0.036	0.041	0.04	0.041	0.043	0.043	0.042
136	0.021	0.024	0.021	0.023	0.024	0.023	0.03	0.032	0.031	0.038	0.04	0.036	0.043	0.042	0.042	0.043	0.046	0.043
153	0.022	0.024	0.021	0.023	0.024	0.024	0.034	0.03	0.031	0.036	0.04	0.039	0.044	0.045	0.044	0.046	0.05	0.046
170	0.022	0.024	0.021	0.023	0.023	0.023	0.03	0.03	0.032	0.039	0.038	0.039	0.046	0.045	0.045	0.047	0.05	0.046
187	0.02	0.027	0.021	0.022	0.026	0.024	0.03	0.031	0.031	0.039	0.04	0.04	0.048	0.046	0.048	0.048	0.05	0.048
204	0.018	0.028	0.021	0.021	0.028	0.024	0.031	0.031	0.035	0.041	0.042	0.043	0.052	0.049	0.049	0.05	0.053	0.05
221	0.022	0.025	0.021	0.023	0.026	0.025	0.032	0.032	0.033	0.042	0.041	0.042	0.048	0.051	0.05	0.049	0.053	0.05
238	0.022	0.027	0.022	0.022	0.028	0.027	0.031	0.034	0.034	0.042	0.044	0.043	0.052	0.052	0.051	0.051	0.054	0.052
255	0.022	0.023	0.023	0.024	0.028	0.024	0.031	0.032	0.033	0.043	0.042	0.043	0.052	0.053	0.052	0.052	0.055	0.052
272*	0.021	0.022	0.023	0.024	0.029	0.025	0.034	0.035	0.037	0.046	0.044	0.045	0.054	0.055	0.053	0.056	0.056	0.054
289*	0.02	0.022	0.022	0.024	0.027	0.024	0.034	0.033	0.036	0.044	0.044	0.046	0.053	0.054	0.054	0.054	0.056	0.054
306*	0.019	0.024	0.02	0.023	0.026	0.024	0.032	0.034	0.034	0.044	0.045	0.045	0.055	0.056	0.054	0.054	0.056	0.055
323*	0.024	0.024	0.023	0.024	0.026	0.024	0.034	0.033	0.037	0.046	0.046	0.046	0.057	0.057	0.055	0.058	0.058	0.056
340*	0.025	0.024	0.023	0.024	0.026	0.024	0.035	0.035	0.036	0.046	0.048	0.048	0.06	0.058	0.057	0.059	0.058	0.059
357*	0.026	0.023	0.023	0.026	0.028	0.024	0.034	0.036	0.036	0.047	0.048	0.048	0.06	0.059	0.058	0.059	0.061	0.059
374*	0.024	0.022	0.024	0.023	0.026	0.025	0.039	0.036	0.037	0.049	0.049	0.049	0.059	0.06	0.058	0.06	0.06	0.06
391*	0.022	0.021	0.022	0.025	0.028	0.026	0.042	0.036	0.038	0.049	0.05	0.05	0.06	0.06	0.059	0.06	0.061	0.062
408*	0.022	0.022	0.023	0.025	0.026	0.026	0.038	0.038	0.038	0.05	0.051	0.05	0.06	0.061	0.061	0.063	0.062	0.063
425*	0.024	0.022	0.024	0.025	0.027	0.028	0.037	0.036	0.038	0.052	0.053	0.051	0.062	0.064	0.06	0.063	0.063	0.063
442*	0.022	0.023	0.023	0.024	0.025	0.025	0.034	0.038	0.038	0.051	0.052	0.052	0.062	0.062	0.062	0.063	0.062	0.062
459*	0.023	0.021	0.022	0.025	0.024	0.026	0.038	0.038	0.039	0.052	0.051	0.053	0.063	0.063	0.061	0.065	0.064	0.063
476*	0.025	0.022	0.022	0.023	0.026	0.024	0.04	0.037	0.037	0.052	0.051	0.051	0.064	0.063	0.062	0.064	0.064	0.064
493*	0.023	0.022	0.022	0.026	0.025	0.025	0.043	0.038	0.039	0.052	0.052	0.055	0.066	0.065	0.065	0.065	0.067	0.064

- Proben des Sequenzierlaufs

Probe	Trimmen der Sequenzen								Alignment		
	Sequenzen Insgesamt	passend zu 5' Adapter	passend zu 3' Adapter	zu kurz	zu viele N	geringe Komplexität	verbleibende Sequenzen (Auswahl) bestanden	% bestanden	zugeordnete Sequenzen	nicht zugeordnete Sequenzen	% zugeordnet
DMSO_1h_A	50.49E+06	NA	NA	0	88.33E+03	372.39E+03	50.03E+06	99.11	94.28E+06	4.51E+06	95.43
DMSO_1h_B	33.65E+06	NA	NA	0	58.43E+03	138.92E+03	33.46E+06	99.43	63.51E+06	2.74E+06	95.86
DMSO_1h_C	49.93E+06	NA	NA	0	83.21E+03	184.16E+03	49.67E+06	99.47	95.22E+06	3.22E+06	96.73
Herboxiden_1h_A	40.35E+06	NA	NA	0	90.55E+03	567.66E+03	39.72E+06	98.44	74.72E+06	3.48E+06	95.55
Herboxiden_1h_B	50.96E+06	NA	NA	0	84.78E+03	302.38E+03	50.57E+06	99.25	96.60E+06	3.39E+06	96.61
Herboxiden_1h_C	33.66E+06	NA	NA	0	57.49E+03	142.00E+03	33.47E+06	99.42	63.69E+06	2.53E+06	96.18
Psoromsäure_1h_A	49.29E+06	NA	NA	0	79.96E+03	538.51E+03	48.68E+06	98.75	93.10E+06	2.91E+06	96.97
Psoromsäure_1h_B	57.48E+06	NA	NA	0	96.66E+03	99.69E+03	57.29E+06	99.67	109.27E+06	4.46E+06	96.08
Psoromsäure_1h_C	39.11E+06	NA	NA	0	66.96E+03	231.92E+03	38.82E+06	99.26	74.24E+06	2.50E+06	96.75
DMSO_6h_A	52.40E+06	NA	NA	0	79.72E+03	381.71E+03	51.96E+06	99.16	98.31E+06	4.14E+06	95.96
DMSO_6h_B	51.78E+06	NA	NA	0	63.98E+03	223.85E+03	51.50E+06	99.46	97.90E+06	3.96E+06	96.12
DMSO_6h_C	35.53E+06	NA	NA	0	43.15E+03	213.20E+03	35.28E+06	99.29	67.89E+06	1.82E+06	97.39
Herboxiden_6h_A	46.76E+06	NA	NA	0	78.94E+03	598.00E+03	46.11E+06	98.61	86.71E+06	3.95E+06	95.64
Herboxiden_6h_B	44.80E+06	NA	NA	0	56.12E+03	157.77E+03	44.59E+06	99.54	84.17E+06	4.02E+06	95.44
Herboxiden_6h_C	35.31E+06	NA	NA	0	43.51E+03	89.66E+03	35.18E+06	99.63	67.37E+06	2.29E+06	96.72
Psoromsäure_6h_A	41.32E+06	NA	NA	0	53.77E+03	469.58E+03	40.81E+06	98.76	77.27E+06	2.97E+06	96.30
Psoromsäure_6h_B	42.71E+06	NA	NA	0	58.58E+03	390.09E+03	42.27E+06	98.97	80.39E+06	3.06E+06	96.34
Psoromsäure_6h_C	42.77E+06	NA	NA	0	55.26E+03	395.80E+03	42.33E+06	98.97	80.99E+06	2.56E+06	96.94