
ENTWICKLUNG VON ASSAYS ZUR UNTERSUCHUNG CHEMISCH- INDUZIERTER TROCKENSTRESSTOLERANZ

Dissertation

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

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät II der
Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg



von

Herrn Dipl.-Ing. (FH) Torsten Geißler
Geboren am 06.12.1983 in Leipzig

Gutachter:

1. Professor Dr. Ludger A. Wessjohann (Halle / Saale)
2. Professor Dr. Jürgen Scherkenbeck (Wuppertal)

Halle / Saale, 14.08.2012

Datum der Verteidigung: 10.04.2013

I have no idols. I admire work, dedication and competence.

Ayrton Senna (1960-1994)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Professor Dr. L. A. Wessjohann für seine fordernde aber auch fördernde Art sowie für das in mich gesetzte Vertrauen, ohne das diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Für die Übernahme des Zweitgutachtens möchte ich mich bei Professor Dr. J. Scherkenbeck in aller Form bedanken.

Für deren ständige Diskussionsbereitschaft sowie Hilfe in wissenschaftlichen als auch administrativen Fragen möchte ich mich bei Dr. Norbert Arnold, PD Dr. Wolfgang Brandt und Professor Dr. Bernhard Westermann bedanken.

Für die Übernahme des Mentoriats bedanke ich mich bei Professor Dr. E. Peiter.

Für die gute Zusammenarbeit im Verbundprojekt möchte ich mich auch bei Peter-Paul Heym, Dagmar Rissel, Wiebke Zschesche, Dr. Heike Hahn, Professor Dr. K. Humbeck und Professor Dr. H.-J. Niclas bedanken.

Zu ganz besonderem Dank für ihre molekularbiologische Unterstützung bin ich Dr. Silke Pienkny verpflichtet sowie weiterhin Juliane Ziegler und Ulrike Godzenski für die Mitarbeit beim Screening sowie Katharina Wolf für ihre Unterstützung bei synthetischen Arbeiten.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Robert Rennert für die Diskussionen und Unterstützung bezüglich der Proteinassays bedanken.

Für die Hilfe in allen wissenschaftlichen Belangen möchte ich mich auch bei Julia Kufka, Sebastian Stark, Jeanette Keim, Michael Henze, Julia Mülbradt, Dr. Martin Dippe, Benjamin Weigel und Ramona Heinke bedanken. Besonderen Dank aber auch für die schönen Stunden abseits der Wissenschaft...

Weiterhin möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern der Abteilung Natur- und Wirkstoffchemie bedanken, die es einem wirklich schwer machen loszulassen.

Für ihre ständige Unterstützung und ihr Verständnis möchte ich mich in ganz besonderer Form bei meiner Frau Katrin bedanken.

Für das Vertrauen und die ständige Hilfsbereitschaft während der ganzen Zeit bin ich vor allem meiner Familie und meinen Freunden dankbar.

Dem Land Sachsen-Anhalt sowie den Stickstoffwerken Piesteritz möchte ich für die finanzielle Unterstützung sowie für die Bereitstellung der Testsubstanzen danken.

Abstract

Drought spells are one of the main reasons for today's yield losses in agriculture. Due to prospected climate change the number and severity of those drought spells will potentially rise. To reduce famines and to feed future generations of a growing world population, crops with increased drought stress tolerance are of vital importance. One approach to solve these problems is the application of plant growth regulators that increase plant's stress tolerance. In this course robust assay systems are required, which allow high-throughput analysis of compound libraries. In search for useful compounds, biochemical assays are fast but limited in scope, whereas whole-plant assays are slow, require large amounts of compounds, and are usually not concentration-related. Therefore a fast, low volume whole-plant assay using the fast growing duckweed *Lemna minor* was developed, which allows dose-dependent evaluation. The ability to transfer the obtained results to crop plants was shown using biomarker analysis. During an initial screening of a compound library containing 92 substances 4-amino-1,8-naphthalimide, 6-chloronicotinic acid and thidiazurone were identified as potent drought stress tolerance enhancers. To gain insight into the mode of action of identified compounds, a screening route was established focusing on inhibitors of *Arabidopsis thaliana* Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (*At*PARP-1), which are known to enhance drought stress tolerance. In the first step the *At*PARP-1 protein was heterologously expressed and purified to homogeneity for the first time. To screen for inhibitors, a protein assay was established. For the estimation of absorption and metabolizing effects a cellular assay based on a transgenic *Saccharomyces cerevisiae* strain, expressing the *At*PARP-1 construct was established. It could be demonstrated that, as known for the yeast strain expressing human PARP-1, *At*PARP-1 production leads to a growth deficit, which can be rescued by PARP-inhibitors. Thus a cellular *At*PARP-1 assay was established by employing the yeast strain in a growth inhibition assay. Using the established screening route composing the protein assay, the yeast assay and the developed *in vivo* Lemna assay, a screening of a compound library of 121 substances was performed. These screened compounds were preselected by *in silico* analysis. In the course of this screening using the protein assay 52 new *At*PARP-1 inhibitors were identified. The most active compound showed an IC_{50} of ≈ 80 nM. In the yeast assay 33 compounds were also shown to be cell permeable and sufficiently metabolically stable. By *in vivo* analysis using the developed Lemna assay seven compounds revealed a drought stress tolerance inducing activity. Overall, in this study 55 new *At*PARP-1 inhibitors were identified, of which two possess lead structures which have not been reported yet. Additionally 10 compounds were identified as new drought stress tolerance enhancers.

Zusammenfassung

Trockenzeiten zählen bereits heute zu den Hauptgründen für Ernteauffälle und damit verbundener Hungersnöte. Aufgrund der weltweiten Klimaveränderungen wird es vermutlich in den nächsten Jahrzehnten zu einer Ausweitung dieser Trockenperioden kommen. Vor dem Hintergrund einer steigenden Weltbevölkerung ist es daher wichtiger denn je, die Trockenstresstoleranz von Kulturpflanzen zu steigern und damit für konstantere Erträge zu sorgen. Ein Ansatz in diesem Zusammenhang ist die Applikation von Pflanzenwachstumsregulatoren, die die Trockenheitstoleranz steigern. Auf der Suche nach solchen Substanzen ist es wichtig, robuste Assaysysteme zu entwickeln, die eine Hochdurchsatzanalyse der Testverbindungen ermöglichen. Biochemische und zelluläre Systeme sind jedoch oftmals durch einen Mangel an Targetproteinen begrenzt oder es fehlt die Relevanz für eine spätere Anwendung. In der vorliegenden Arbeit wurde daher ein kleinstmengen-tauglicher *in vivo*-Assay auf Basis der schnell wachsenden Wasserlinse *Lemna minor* entwickelt, der eine konzentrationsabhängige Auswertung entsprechend der Dosis-Wirkungs-Beziehung erlaubt. Durch Biomarkeranalysen konnte bestätigt werden, dass das entwickelte Modelltestsystem auf Kulturpflanzen übertragbar ist. Bei der Untersuchung von 92 Verbindungen konnten die Substanzen 4-Amino-1,8-naphthalimid, 6-Chlornikotinsäure und Thidiazuron als Trockenstresstoleranz-induzierende Substanzen identifiziert werden. Um gleichzeitig Anhaltspunkte zum Wirkmechanismus von aktiven Verbindungen zu erhalten, wurde eine Screeningroute, basierend auf Inhibitoren der Poly(ADP-Ribose)polymerase-1 aus *Arabidopsis thaliana* (*At*PARP-1) etabliert, da bekannt ist, dass diese Inhibitoren die Trockenstresstoleranz erhöhen. Hierzu sollte zunächst ein Protein-Assay zur Identifizierung der Inhibitoren dienen. Dazu wurde erstmalig das *At*PARP-1-Protein löslich exprimiert und in einem zuvor etablierten Assaysystem getestet. Zum Ausschluss möglicher Aufnahme- bzw. Metabolisierungseffekte wurde ein weiterer Assay auf Basis eines transgenen Hefestamms etabliert. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Stamm aufgrund der Expression des *At*PARP-1-Proteins ein Wachstumsdefizit zeigt, welches durch PARP-Inhibitoren aufgehoben werden kann. Mittels der etablierten Screeningroute bestehend aus dem Protein-Assay, dem Hefe-Assay sowie dem entwickelten Lemna-Assay wurden 121 Substanzen untersucht, welche zuvor durch *in silico* Studien ausgewählt wurden. Von diesen Substanzen konnten 52 als *At*PARP-1-Inhibitoren klassifiziert werden, wobei die aktivste Substanz einen IC_{50} -Wert von ≈ 80 nM aufweist. Im nachfolgenden Hefe-Assay konnte für 33 Substanzen zusätzlich eine ausreichende Zellpermeabilität bzw. metabolische Stabilität nachgewiesen werden. Die *in vivo* Analyse mittels *L. minor* zeigte, dass sieben der Substanzen zu einer Erhöhung des Wachstums unter Trockenstress führen. Insgesamt konnten in dieser Arbeit 55 neue *At*PARP-1-Inhibitoren und 10 Substanzen identifiziert werden, die potentiell die Trockenstresstoleranz von Kulturpflanzen verbessern.

Inhaltsverzeichnis

1. Allgemeiner Teil

1.1 Trockenstress	1
1.1.1 Trockenstress als abiotischer Stressfaktor	1
1.1.2 Parameter zur Beschreibung von Trockenstress bei Pflanzen	2
1.1.3 Einfluss von Trockenheit auf das Pflanzenwachstum	4
1.1.3 Zusammenhänge zwischen Trockenstress und oxidativem Stress	8
1.1.4 Trockenstresstoleranz.....	11
1.1.4.1 Adaptationsstrategien.....	11
1.1.4.2 Molekulare Mechanismen der Trockenstresstoleranz	11
1.1.4.3 Trockenstresstoleranz durch pflanzeigene Metaboliten	13
1.1.4.4 Trockenstresstoleranz durch Deregulation von Signalwegen	17
1.1.4.5 Trockenstresstoleranz durch Pflanzenwachstums-regulatoren.....	19
1.1.4.6 Trockenstresstoleranz durch symbiotische Pilze.....	21
1.1.5 Assays zur Untersuchung von Trockenstress.....	22
1.2 ADP-Ribose-Metabolismus.....	24
1.2.1 NAD ⁺ -Biosynthese	24
1.2.2 ADP-Ribose	24
1.2.2.1 Bildung von Poly(ADP-Ribose)	27
1.2.3 Biochemische Bedeutung der ADP-Ribosylierung.....	29
1.2.4 Bedeutung der ADP-Ribosylierung im pflanzlichen Organismus	30
1.2.5 PARP-Inhibitoren und PARP-Pharmakophor.....	32
1.3 Zielstellung.....	37

2. Spezieller Teil

2.1	Entwicklung eines Ganzpflanzenassays zur Untersuchung von Trockenstresstoleranz	39
2.1.1	Optimierung des Wachstumsmediums	41
2.1.2	Optimierung der Osmolytenkonzentration	42
2.1.3	Optimierung des Kulturvolumens	43
2.1.4	Untersuchung von Substanzbibliotheken	44
2.2	Validierung des entwickelten Assays	50
2.2.1	Pflanzenzellassay	50
2.2.2	Wurzelkrümmungsassay	51
2.2.3	Untersuchung der Übertragbarkeit auf Landpflanzen	52
2.2.4	Untersuchung von Substanzbibliotheken	56
2.2.5	Zusammenfassung	58
2.3	Proteinchemischer PARP-Assay	58
2.3.1	Expression von <i>AtPARP-1</i>	59
2.3.2	Validierung des PARP-Assays	60
2.4	Zellulärer PARP-Assay	61
2.5	Untersuchung von Substanzbibliotheken	64
2.5.1	Abgeleitete Struktur-Aktivitätsbeziehungen	66
2.5.2	Ergebnisse des Hefe-Assays	69
2.5.3	Ergebnisse des Lemna-Assays	71
2.5.4	Zusammenfassung	75
2.6	Synthese	75

3. Experimenteller Teil

3.1 Chemikalien	78
3.2 Biochemische Testsysteme	78
3.2.1 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	78
3.2.2 Proteinreinigung	80
3.2.3 SDS – Polyacrylamid – Gelelektrophorese (SDS - PAGE)	82
3.2.4 Proteinkonzentrationsbestimmung	83
3.2.5 Bestimmung der Enzymaktivität	83
3.3 Zelluläre Testsysteme	84
3.3.1 Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	84
3.3.2 Pflanzenzellassay.....	86
3.4 Ganzpflanzentests	87
3.4.1 Lemna-Assay	87
3.4.2 Geotropismus-Assay	88
3.5 Statistik	89
3.6 Synthese	90
3.6.1 2-Acetamidobenzamid (52)	90
3.6.2 2-(2-Methoxyacetamido)benzamid (53).....	90
3.6.3 N-(2-Carbamoylphenyl)-2-(hydroxymethyl)benzamid (54)	91
3.6.4 2-Methylchinazolin-4(3 <i>H</i>)-on (55)	92
3.6.5 2-(Methoxymethyl)chinazolin-4(3 <i>H</i>)-on (56)	92
3.6.6 3-(4-Oxo-3,4-dihydrochinazolin-2-yl)acrylsäure (57)	93
3.6.7 4-(4-Oxo-3,4-dihydrochinazolin-2-yl)butansäure (58).....	93
3.7 Analytik	94
3.7.1 Dünnschichtchromatografie (DC)	94
3.7.2 Massenspektrometrie	95
3.7.3 NMR-Spektroskopie	95

4. Anhang

5. Lebenslauf

6. Eidesstattliche Erklärung

7. Literaturverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

3-AB	3-Aminobenzamid
4-ANI	4-Amino-1,8-naphtalimid
5PC	Δ^1 -Pyrrolin-5-carbonsäure
6-CNA	6-Chlornikotinsäure
AA	Ascorbinsäure / Ascorbat
ABA	Abscisinsäure
ADP	Adenosindiphosphat
ADPR	ADP-Ribose
AiF	Apoptose induzierender Faktor ("apoptosis inducing factor")
ATP	Adenosintriphosphat
<i>At</i> PARP-1	<i>Arabidopsis thaliana</i> Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1
DHA	Dehydroascorbinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure („desoxyribonucleic acid“)
DMSO	Dimethylsulfoxid
eEF2	eukaryontischer Elongationsfaktor 2
GB	Glycinbetain
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
<i>Hs</i> PARP-1	<i>Homo sapiens</i> Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1
LEA	in der späten Embryogenese angereichert („late embryogenesis abundant“)
mADPR	monomere ADP-Ribose
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure („messenger ribonucleic acid“)
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
mART	mono-ADP-Ribosyltransferase
MDHA	Monodehydroascorbinsäure
NAD(P) ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid(phosphat)
pADPR	polymere ADP-Ribose
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARG	Poly(ADP-Ribose)-Glykohydrolase
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PEG	Polyethylenglykol
PWR	Pflanzenwachstumsregulator

Abkürzungsverzeichnis

RNAi	Ribonukleinsäure-Interferenz („ribonucleic acid interference“)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“)
RT	Raumtemperatur
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphat carboxylase/-oxygenase
RWC	relativer Wassergehalt („relative water content“)
SDS	Natriumdodecylsulfat („sodium dodecylsulfate“)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Wichtigste Parameter ausgewählter Trockenstressassays	23
Tabelle 2: Strukturformeln und Testergebnisse (Protein-, Lemna-Assay) der synthetisierten Amide.....	76
Tabelle 3: Strukturformeln und Testergebnisse (Protein-, Lemna-Assay) der synthetisierten Chinazolinone	77
Tabelle 4: Medien zur Kultivierung von <i>E. coli</i>	79
Tabelle 5: Verwendete Puffer	81
Tabelle 6: Puffer für die SDS-PAGE Analyse	82
Tabelle 7: Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE Analyse	82
Tabelle 8: Puffer für die Analyse der Enzymaktivität	84

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zelluläre und makroskopische Veränderungen von Pflanzen bei Trockenheit	3
Abbildung 2: Veränderungen der Pflanzenphysiologie durch Trockenstress	5
Abbildung 3: Folgen von Wasserverlust auf Proteine und Membranen	6
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Stoffwechselwege zur Detoxifikation von reaktiven Sauerstoffradikalen	10
Abbildung 5: Darstellung der Abscisinsäure-abhängigen Trockenstressantwort.....	13
Abbildung 6: Anabolismus und Katabolismus von L-Prolin.....	15
Abbildung 7: Biosynthese von Glycin-Betain	16
Abbildung 8: Enzymkatalysierte Reaktionen im Metabolismus von ADP-Ribose-Polymeren.....	26
Abbildung 9: Schematische Darstellung von HsPARP-1	27
Abbildung 10: Schematische Darstellung der wichtigsten Interaktionen bei der Bildung von Poly(ADP-Ribose).....	29
Abbildung 11: Mögliche Konformere des Nikotinamidteils von NAD ⁺ bei der Bindung am Protein	34
Abbildung 12: Inhibitoren mit geschlossener Amidstruktur (A) und Minimalpharmakophor für HsPARP1 (B).....	34
Abbildung 13: Leitstrukturen von HsPARP-1 Inhibitoren	35
Abbildung 14: HsPARP-1 Inhibitoren, die an der Zn-Finger-Domäne binden.....	36
Abbildung 15: Übergangszustandsinhibitoren sowie potentiell irreversible Inhibitoren	36
Abbildung 16: spezifische Wachstumsgeschwindigkeiten der Wasserlinsen <i>Lemna gibba</i> und <i>Lemna minor</i> in verschiedenen Medien	41
Abbildung 17: Untersuchung der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeiten von <i>L. minor</i> (A) und <i>L. gibba</i> (B) bei verschiedenen Wasserpotentialen des Mediums ...	43
Abbildung 18: Wachstumsgeschwindigkeiten von <i>L. minor</i> Pflanzen unter ungestressten Bedingungen (A) sowie unter Trockenstress (B)	44
Abbildung 19: Strukturformeln von Cyclosulfamuron (17), 4-Amino-1,8-naphtalimid (18), 6-Chlornikotinsäure (19), Thidiazuron (20) Imidacloprid (21)	45
Abbildung 20: Wachstumsgeschwindigkeiten von <i>L. minor</i> unter Normalbedingungen (A) oder unter Trockenstress (B) bei verschiedenen Konzentrationen an 4-Amino-1,8-naphtalimid.....	46
Abbildung 21: Wachstumsgeschwindigkeiten von <i>L. minor</i> unter Trockenstress bei verschiedenen Konzentrationen Thidiazuron.....	47

Abbildung 22: Wachstumsschwindigkeiten von <i>L. minor</i> unter Trockenstress (A) oder unter Normalbedingungen (B) bei verschiedenen Konzentrationen 6-Chlornikotinsäure.....	48
Abbildung 23: Wachstumsgeschwindigkeiten von <i>L. minor</i> unter Normalbedingungen (B,D) oder unter Trockenstress (A,C) bei verschiedenen Konzentrationen Nikotinsäure (22; A,B) bzw. Nikotinamid (23; C,D)	49
Abbildung 24: Durch oxidativen Stress verursachter Zelltod von <i>A. thaliana</i> -Zellen	50
Abbildung 25: Wurzelkrümmungsassay.....	51
Abbildung 26: Bestimmung des Prolingehaltes	52
Abbildung 27: Bestimmung des Chlorophyllgehaltes.....	53
Abbildung 28: Bestimmung des Ascorbatgehaltes	54
Abbildung 29: Bestimmung des Glutathiongehaltes	56
Abbildung 30: Untersuchung der hauseigenen-Substanzbibliothek	57
Abbildung 31: SDS-PAGE der Proteinreinigung des AtPARP-1	59
Abbildung 32: Untersuchung von gereinigtem AtPARP-1.....	60
Abbildung 33: Bestimmung der relativen IC ₅₀ -Werte für 4-Amino-1,8-naphtthalimid (18) und PJ-34 (33)	61
Abbildung 34: Wachstumskurven für Hefen mit leerem Vektor bzw. PARP-Konstrukten....	63
Abbildung 35: Bestimmung der IC ₅₀ -Werte für 6-(5H)-Phenanthridinon (9) und 3-Aminobenzamid (1a)	64
Abbildung 36: Screeningroute	65
Abbildung 37: vermutete Struktur-Aktivitätsbeziehungen	67
Abbildung 38: Einfluss des variablen Restes auf die Aktivität gegenüber AtPARP-1	68
Abbildung 39: Neu identifizierte Grundgerüste für AtPARP-1 Inhibitoren.....	69
Abbildung 40: Strukturformeln und IC ₅₀ -Werte des zellulären Hefe-Assay der aktivsten Verbindungen	69
Abbildung 41: Unterschiede der Aktivitäten von Protein- und Hefe-Assay	70
Abbildung 42: Strukturformeln und Aktivitätswerte von Inhibitoren, die eine AtPARP-1-Selektivität aufweisen.....	71
Abbildung 43: Wachstumsgeschwindigkeiten von <i>L. minor</i> unter Trockenstress, behandelt mit den gezeigten Substanzen.....	73
Abbildung 44: Wachstumsgeschwindigkeiten von <i>L. minor</i> unter Trockenstress, behandelt mit den gezeigten Substanzen.....	74
Abbildung 45: Reaktionsschema zur Bildung von Chinazolinonen.....	76
Abbildung 46: Vektorkarte mit Insertionssequenz.....	79

Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung Wasserpotentials	2
Formel 2: Berechnung des relativen Wassergehaltes	4
Formel 3: Regressionsmodell nach Sonnleitner und Chmiel (2011) zur Bestimmung der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit μ	88
Formel 4: Berechnung des R_F -Wertes	94

1

Allgemeiner Teil

1.1 Trockenstress

1.1.1 Trockenstress als abiotischer Stressfaktor

Weltweit ist Pflanzenstress einer der bedeutendsten Faktoren, die die Landwirtschaft behindern. In den letzten Jahrzehnten gelang es Züchtern den Ertrag vieler Kulturpflanzen zu verbessern, wobei diese gesteigerte Produktivität hauptsächlich auf eine generell erhöhte Stresstoleranz der Pflanzen gegenüber abiotischem Stress zurückzuführen ist (Tollenaar und Lee 2002). Allerdings besteht noch ein zusätzliches Ertragspotential von 60-80 %, was durch eine Minimierung von abiotischen Stressfaktoren wie z. B. Frost, UV-Licht, Hitze oder Trockenheit ausgeschöpft werden könnte (Bray *et al.* 2002). Dabei führt vor allem eine unzureichende Wasserversorgung zu den stärksten Einbußen in der pflanzlichen Produktivität. Dieses Phänomen wird häufig auch als Trockenstress – oder ferner als Wasserstress – bezeichnet, wobei der Zustand Höherer Pflanzen, bei dem der transpiratorische Wasserverlust nicht mehr durch ausreichende Wasseraufnahme durch die Rhizosphäre kompensiert werden kann, gemeint ist. (Boyer 1982).

Prognostizierte klimatische Veränderungen lassen vermuten, dass es nicht nur in Deutschland, sondern in vielen Regionen der Erde, zu einer Verringerung der Niederschlagsmengen kommen wird. Wenn man diese Tatsache vor dem Hintergrund einer wachsenden Weltbevölkerung und dem damit gesteigerten Trinkwasser- und Nahrungsmittelbedarf betrachtet, wird klar, dass nur eine gesteigerte Trockenstresstoleranz der Kulturpflanzen die zukünftige Nahrungsmittelnachfrage decken kann. Daher ist es von fundamentaler Bedeutung, die Reaktionen von Pflanzen auf Trockenheit zu kennen und zu verstehen.

1.1.2 Parameter zur Beschreibung von Trockenstress bei Pflanzen

Wie alle Moleküle kann man auch Wasser im thermodynamischen Sinne mit seinem chemischen Potential beschreiben. Es wird häufig das Wasserpotential ψ_w genutzt, wobei es sich mathematisch betrachtet um den Quotienten aus chemischem Potential und Molvolumen handelt (Kramer und Boyer 1995). Als Referenzsystem wird das Potential von reinem Wasser herangezogen, welches unter Standardbedingungen als Null definiert ist. ψ_w ist daher eine Differenzgröße und wird in Druckeinheiten (z. B. MPa) angegeben. Somit lässt sich durch Bilanzierung leicht die Flussrichtung des Wassers im System Boden/Pflanze bestimmen. Vereinfacht gesagt, setzt sich ψ_w aus dem Teilpotential der gelösten Stoffe ψ_s , (auch osmotisches Potential) und dem Teilpotential ψ_p zusammen, welches durch physikalische Kräfte der Umgebung auf das Wasser erzeugt wird (auch hydrostatisches Potential oder Turgorpotential).

Formel 1: Berechnung Wasserpotentials

$$\psi_w[\text{MPa}] = \psi_s[\text{MPa}] + \psi_p[\text{MPa}]$$

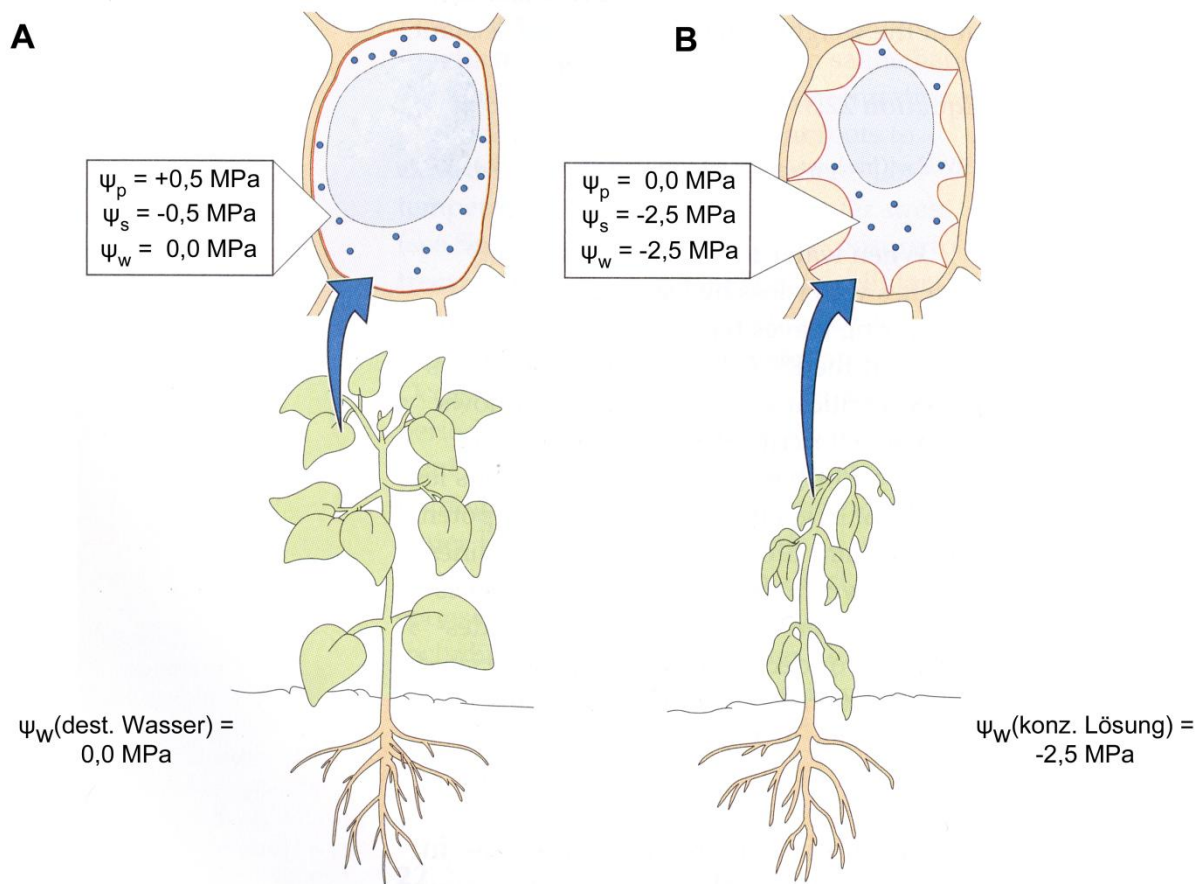


Abbildung 1: Zelluläre und makroskopische Veränderungen von Pflanzen bei Trockenheit; modifiziert nach Bray *et al.* (2002)

Wasser fließt dabei immer spontan vom hohen zum niedrigen Potential bzw. zum Zustand niedrigerer freier Energie. Das heißt, dass Pflanzen dem Boden kein Wasser entziehen können, solange das Wasserpotential in der Wurzel höher ist als das des umliegenden Bodens. Befindet sich eine Pflanzenzelle z. B. in destilliertem Wasser ($\psi_w = 0 \text{ MPa}$), wird sie anschwellen, da das negative osmotische Potential der Zelle dafür sorgt, dass Wasser einströmt. Dieser Prozess wird solange anhalten, bis die Plasmamembran gegen die Zellwand drückt und einen positiven Turgordruck hervorruft, so dass sich äußeres und inneres Wasserpotential ausgleichen (Abbildung 1A). Befindet sich eine Pflanzenzelle in einer Lösung, die z. B. ein Wasserpotential ψ_w von $-2,5 \text{ MPa}$ bewirkt, fließt das Wasser aus der Zelle in die umgebende Lösung, bis der Turgordruck null ist und sich die Plasmamembran nach innen wölbt (Plasmolyse). Da es jedoch gleichzeitig zu einer Aufkonzentration der gelösten Stoffe in der Zelle kommt, sinkt das osmotische Potential in der Zelle, so dass sich inneres und äußeres Potential ausgleichen (Abbildung 1B).

Damit es trockenheitstoleranten Pflanzen gelingt, auch bei niedrigen äußeren Wasserpotentialen Wasser aus der Umgebung aufzunehmen, haben sie Mechanismen

entwickelt um ihr intrazelluläres osmotisches Potential zu regulieren. Dieser Prozess wird als osmotische Anpassung bezeichnet und führt zu einer vermehrten Bildung von sogenannten kompatiblen Soluten. Hierbei handelt es sich um sehr gut wasserlösliche Substanzen wie Zucker oder Aminosäuren, die selbst bei hohen physiologischen Konzentrationen (bis zu 500 mM) keine negativen Auswirkungen auf den Metabolismus haben (Loescher und Everard 2000). Aufgrund dieser möglichen Anpassung geben Messungen des pflanzlichen Wasserpotentials nicht immer den Stresszustand der Pflanze wider. Daher wird auch häufig der relative Wassergehalt (RWC) der Pflanze angegeben (Formel 2), um eine Aussage über den Hydratationszustand der Pflanze treffen zu können.

Formel 2: Berechnung des relativen Wassergehaltes

$$\text{RWC [\%]} = \frac{\text{Probengewicht} - \text{Trockengewicht}}{\text{Sättigungsgewicht} - \text{Trockengewicht}} \times 100$$

Dabei wird neben dem Trocken- und dem eigentlichen Probengewicht auch das Sättigungsgewicht des Pflanzenmaterials bestimmt. Letzteres wird ermittelt, indem die Probe in destilliertem Wasser bis zur Gewichtskonstanz quellen gelassen wird. Wenn sich Wasserverlust und Wasseraufnahme der Pflanze ausgleichen, liegt der RWC typischerweise bei 85-95 %. Unterhalb dieses Wertes ist davon auszugehen, dass die Pflanze sich in einem Stresszustand befindet. In Abhängigkeit der Spezies kommt es bei einem RWC-Wert von ca. 50 % zum Absterben der Pflanze.

1.1.3 Einfluss von Trockenheit auf das Pflanzenwachstum

Pflanzen sind in der Lage abiotische Stressfaktoren wie Trockenheit zu erkennen und reagieren darauf mit Veränderungen in Stoffwechsel, Wachstum und Entwicklung. Diese Reaktionen werden durch Stressrezeptoren an regulatorische Kreisläufe weitergegeben, was unter anderem dazu führt, dass diverse Transkriptionsfaktoren die Biosynthese von Enzymen anregen bzw. hemmen, und damit zur Produktion von Metaboliten führen, die die Stresstoleranz der Pflanze erhöhen können. Weitere kurz- oder langfristige Veränderungen im pflanzlichen Metabolismus, welche von Trockenheit hervorgerufen werden, sind zusammenfassend in Abbildung 2 dargestellt.

Auf makroskopischer Ebene führt Trockenheit zunächst zum Wachstumsstopp der Pflanzen. Jedoch hängt dies sehr stark von der Intensität, der Dauer sowie der

Geschwindigkeit des Auftretens der Trockenheit ab (Bray *et al.* 2002). Leichte bis moderate Trockenheit führt zwar dazu, dass Blätter und Spross nicht mehr wachsen, jedoch kommt es weiterhin zu einem z. T. verstärkten Wurzelwachstum (Spollen *et al.* 1993). Wie stark das Wachstum der oberirdischen Pflanzenteile gehemmt wird, hängt ferner auch vom Entwicklungsstadium sowie von der jeweiligen Pflanzenspezies ab. Man geht davon aus, dass das verlangsamte Spross- und Blattwachstum der Pflanze dazu dient, Nährstoffe zu sparen um sich selbst zu erhalten bzw. diese für eine spätere Erholungsphase bereitzustellen.

Auch viele Parameter, die sich auf den Ertrag von Nutzpflanzen auswirken, werden durch Trockenstress beeinflusst. Der Ertrag ist jedoch von einer Vielzahl physiologischer Prozesse abhängig, die sich gegenseitig in sehr komplexer Weise beeinflussen können. Im Weizen-Roggen-Hybrid *Triticale* zum Beispiel führt Trockenstress vor der Anthese zu einer schnelleren Blüte, was den Ertrag positiv beeinflusst. Nach der Anthese verkürzt er jedoch die Kornwachstumsperiode, was den Ertrag um ca. 50 % mindert (Estrada-Campuzano *et al.* 2008).

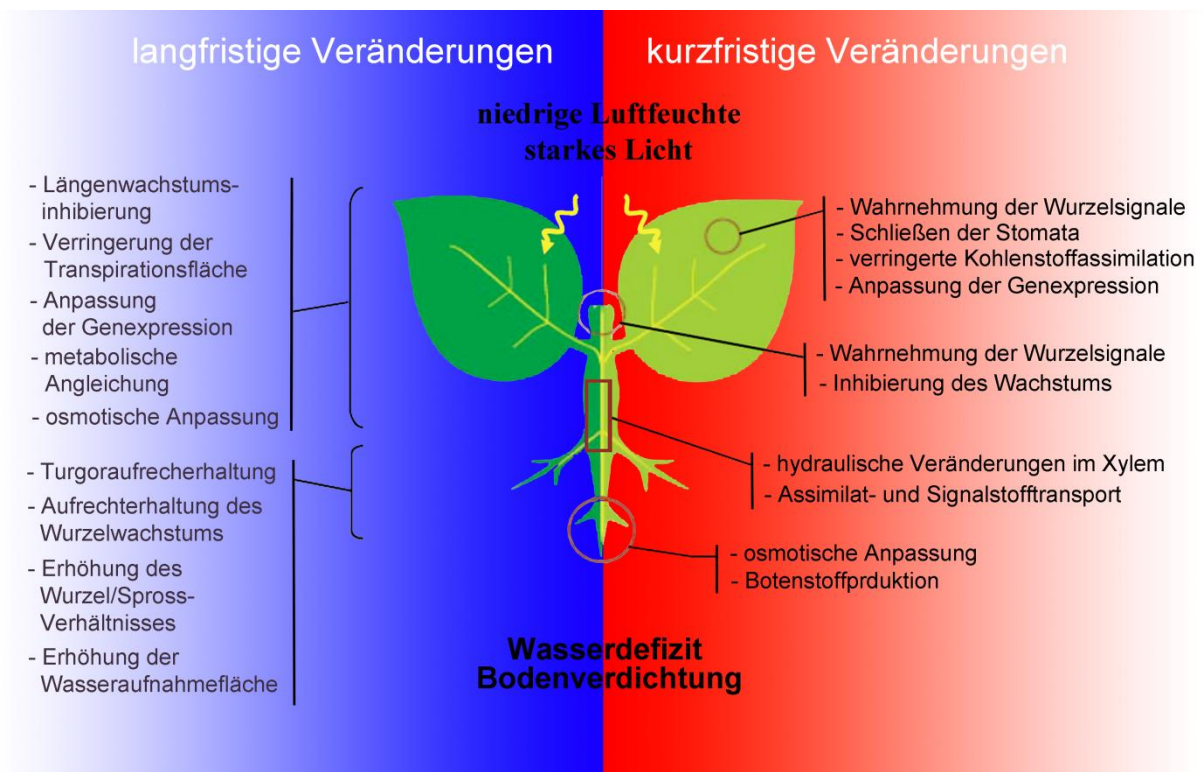


Abbildung 2: Veränderungen der Pflanzenphysiologie durch Trockenstress; modifiziert nach Chaves *et al.* (2003)

Die reduzierte Wasserverfügbarkeit unter Trockenstress führt weiterhin zu einer verringerten Nährstoffaufnahme, wobei vor allem Stickstoff und Phosphor betroffen sind. Der Grund dafür ist vermutlich, dass weniger Energie zur Assimilation von $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, PO_4^{3-} und SO_4^{2-} zur Verfügung steht, da diese Ionen durch aktiven Transport importiert werden müssen (Grossman und Takahashi 2001). Darüber hinaus verringert Trockenstress die Mobilität des Wassers innerhalb der Pflanze. Das Schließen der Stomata – um weiteren Wasserverlust durch Transpiration zu vermeiden – führt zudem zu einem verringerten Transpirationssog, weshalb vermutet wird, dass auch die passive Aufnahme von Nährstoffen gestört ist (Farooq *et al.* 2009).

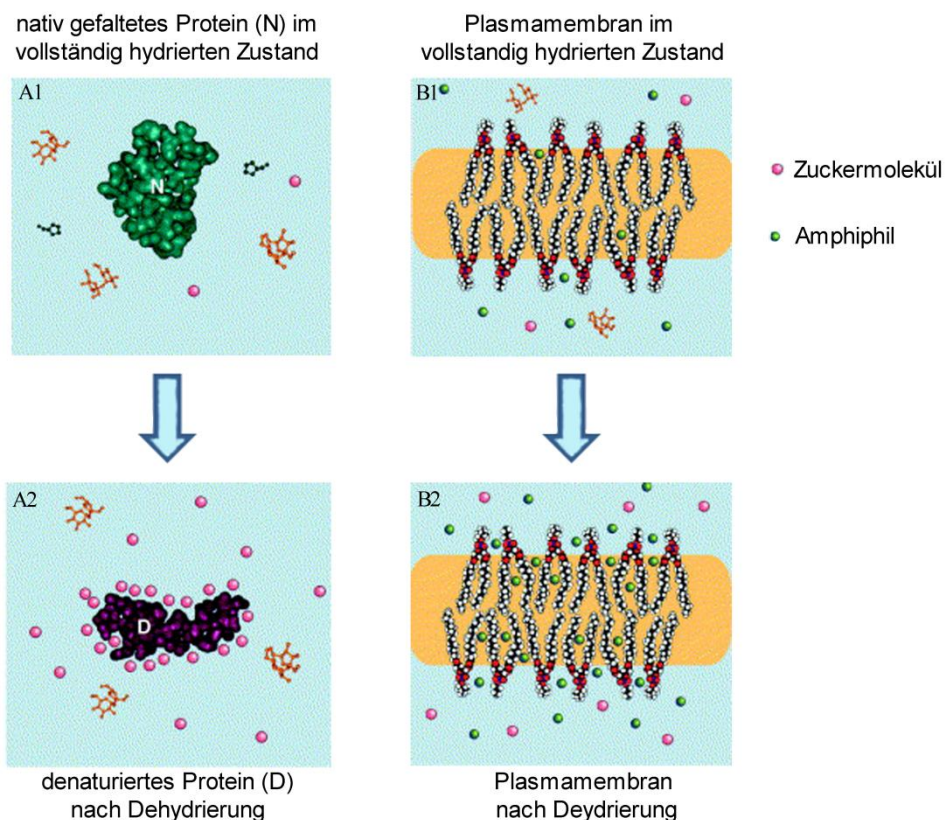


Abbildung 3: Folgen von Wasserverlust auf Proteine und Membranen modifiziert nach Hoekstra 2001; Durch Wasserverlust in der Zelle kommt es zur Denaturierung von Proteinen, wobei Zuckermoleküle als Wasserersatz wirken können (A1, A2), sowie zur Einlagerung von amphiphilen Metaboliten in die Membran, was zu einer zeitweisen Desintegration führt.

Durch den Wasserverlust kommt es auf zellulärer Ebene zu einer Konzentration der Zellbestandteile. Dadurch wird der Zellinhalt viskoser und die Wahrscheinlichkeit von molekularen Interaktionen steigt, was z. B. Proteinaggregation oder –denaturierung (Abbildung 3) sowie Membranfusionen zur Folge haben kann (Hoekstra *et al.* 2001).

Weiterhin diffundieren mehr amphiphile Metaboliten in die Zellmembran, da ihr Verteilungsgleichgewicht erhalten werden muss. Dies führt zumindest zeitweise zum Verlust der Membranintegrität, wodurch Zellbestandteile in den intrazellulären Raum entweichen können (Golovina *et al.* 1998).

Zusätzlich zu den bereits genannten Auswirkungen von Trockenstress auf die Pflanzenphysiologie sinkt die Photosyntheseleistung der Pflanze (Farooq *et al.* 2009). Verantwortlich hierfür sind:

- a) eine limitierte CO₂-Verfügbarkeit als Konsequenz der verstärkten Stomata-Schließung
- b) eine Störung der metabolischen Aktivität durch direkte Inhibierung biochemischer Prozesse (Lawlor 1995)
- c) eine verringerte Blattfläche durch verstärktes Einrollen der Blätter um Transpirationsverluste zu vermeiden
- d) eine verfrühte Seneszenz (Ahmad *et al.* 2005)

Seit Beginn dieses Jahrhunderts wird in der Literatur beschrieben, dass nicht die Schädigung der Photosyntheseproteine durch Wasserverlust der Hauptgrund für die erniedrigte Photosynthese ist, sondern die limitierte CO₂-Verfügbarkeit (Cornic und Massacci 1996; Yokota *et al.* 2002). Aufgrund dessen oder durch pflanzeigene Inhibitoren, die vermehrt unter Trockenstress gebildet werden (Parry *et al.* 2002), kommt es zu einer verringerten Aktivität des Enzyms Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase (Rubisco), welches für die CO₂-Fixierung verantwortlich ist. In Trockenphasen wirkt die Rubisco aufgrund ihrer Unspezifität und des fehlenden Substrates CO₂ hauptsächlich als Oxygenase. Hierdurch wird das in höheren Konzentrationen toxische 2-Phosphoglyconat gebildet. Dieses Molekül muss über einen Prozess, der insgesamt neun Enzyme im Peroxisom und Mitochondrium involviert, detoxifiziert werden. Da in diesem energieaufwändigen Stoffwechselweg Sauerstoff verbraucht wird und Kohlendioxid entsteht, wird dieser Prozess als Photorespiration bezeichnet. Beim Abbau von 2-Phosphoglyconat wird weiterhin auch Wasserstoffperoxid als reaktive Sauerstoffspezies (ROS) koproduziert (Heldt 2005). Die verstärkte Photorespiration ist jedoch nicht der einzige Prozess bei dem unter Trockenheit vermehrt ROS gebildet werden (Bartels und Sunkar 2005).

1.1.3 Zusammenhänge zwischen Trockenstress und oxidativem Stress

Die Bildung von ROS führt im Allgemeinen zu Schäden an zahlreichen zellulären Strukturen wie Membranen, Proteinen und DNA. Die Gesamtheit dieser Schäden wird als oxidativer Stress bezeichnet. Oxidativer Stress ist in aller Regel ein sekundärer Stress, der sowohl durch biotischen als auch abiotischen Primärstress hervorgerufen werden kann. Als Entstehungsort für ROS kommen im pflanzlichen Organismus hauptsächlich die Chloroplasten und Mitochondrien in Frage. Unter Trockenstress kommt es in den Chloroplasten zu einem Mangel an Nikotinamiddinukleotidphosphat (NADP^+ ; Munne-Bosch *et al.* 2005). Daher müssen in der Lichtreaktion die Elektronen des reduzierten Ferredoxins auf andere Akzeptoren, wie z. B. Sauerstoff transferiert werden, was zur Produktion von ROS führt. In den Mitochondrien kommt es aufgrund einer erhöhten zellulären Atmung ebenfalls zu einer verstärkten Bildung von ROS bei Trockenheit (Tiwari *et al.* 2002).

Diese ROS umfassen Superoxidanionen (O_2^-), Hydroxylradikale (OH^\cdot), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Alkoxyradikale (RO^\cdot) und Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$). ROS können mit Proteinen, Lipiden oder Desoxyribonukleinsäuren (DNA) reagieren und dadurch die zellulären Funktionen beeinträchtigen (Smirnov 1993). Die deutlichsten Veränderungen, verursacht durch oxidativen Stress, können in dem Prozess der Lipidperoxidation beobachtet werden. Dieser Prozess führt zu Schäden an den Membranen und zum Abbau von Lipiden. Als Startreaktion abstrahiert ein Hydroxylradikal (OH^\cdot) ein Wasserstoffatom von einer mehrfach ungesättigten Fettsäure, was zur Bildung eines Fettsäureradikals (R^\cdot) führt. Dieses kann sehr schnell mit molekularem Sauerstoff zum Peroxylradikal (ROO^\cdot) weiterreagieren. Die erneute Abstraktion eines Wasserstoffatoms von einer weiteren Fettsäure durch das Peroxylradikal führt zur Bildung eines Lipidhydroperoxids (ROOH) und startet damit die Kettenreaktion erneut. Eine weitere Folge des Auftretens von ROS ist z. B. auch die Verseifung von Phospholipiden, was zur Freisetzung von Fettsäuren und zur Ausbildung von Gelphasen in den Membranen führt (Mckersie *et al.* 1990). Zusätzlich kann oxidativer Stress auch die Denaturierung von Proteinen oder DNA-Strangbrüche bewirken.

Pflanzen haben eine Reihe von Schutz- und Reparaturmechanismen entwickelt, die unter normalen Umständen dafür sorgen, dass oxidative Schäden minimiert werden. Diese werden in zwei Untergruppen unterteilt:

- a) Enzymkaskaden, die direkt mit ROS reagieren und sie damit detoxifizieren (z. B. Superoxiddismutase, Katalase, Ascorbatperoxidase)
- b) Enzyme und Kosubstrate, die durch ROS oxidierte Antioxidantien wieder regenerieren (Glutathion, Glutathionreduktase, Dehydroascorbatreduktase)

Superoxiddismutasen reagieren mit Superoxidanionen unter Bildung von Wasserstoffperoxid. Hierdurch wird zwar die mögliche Bildung von Hydroxylradikalen verhindert, jedoch kann auch Wasserstoffperoxid als relativ starkes Oxidans z. B. Thiole oxidieren. Dies ist vor allem wichtig, da einige wichtige Regulationsmechanismen auf dem Gleichgewicht zwischen der reversiblen Ausbildung von Disulfidbrücken in sensorischen Proteinen beruhen. So entscheidet z. B. der Redoxzustand von Thioredoxinen sowie einiger Calvin-Zyklus-Enzyme über die Aktivierung der Photosynthese bzw. der Zellatmung (Buchanan und Luan 2005; Kaiser 1979).

In tierischen Organismen wird Wasserstoffperoxid hauptsächlich durch Katalase abgebaut (Alberts *et al.* 2008), in pflanzlichen Organismen kommt dieses Enzym jedoch nur in Peroxisomen vor. Da der Großteil an ROS jedoch in Chloroplasten gebildet wird, bauen im pflanzlichen Organismus hauptsächlich Peroxidasen Wasserstoffperoxid ab. Diese Enzyme kommen sowohl im Cytosol als auch in Chloroplasten vor. In der Regel verwenden diese Peroxidasen Ascorbat (AA) als Reduktionsmittel, anders als bei Wirbeltieren, bei denen Peroxidasen hauptsächlich reduziertes Glutathion (GSH) als Kosubstrat verwenden (Meister 1994). Durch die Oxidation des AA entsteht zunächst das kurzlebige Radikal Monodehydroascorbat (MDHA), welches entweder durch nicht-enzymatische Disproportionierung mit sich selbst reagiert und dabei Dehydroascorbat (DHA) und AA bildet (Abbildung 4), oder es findet eine enzymatische Regenerierung unter Verwendung von Cytochrom b, reduziertem Ferredoxin oder NADP^+ statt (Scandalios 1997). Die Reduktion von DHA findet durch gleichzeitige Oxidation von zwei Molekülen GSH statt, wodurch dimeres oxidiertes Glutathion (GSSG) gebildet wird (Abbildung 4). Durch die Aktivität der Glutathionreduktase kann unter Oxidation von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ die Disulfidbrücke des GSSG wieder gespalten werden. Trotz der Tatsache, dass Glutathion und Ascorbat durch dieses System eng verknüpft sind, konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass beide Moleküle spezifische, voneinander unabhängige Funktionen v. a. in der Signaltransduktion erfüllen (Bashandy *et al.* 2010; Frottin *et al.* 2009). So wird vermutet, dass Glutathion z. B.

1.1.4 Trockenstresstoleranz

1.1.4.1 Adaptationsstrategien

Da es sich bei Trockenstress um ein häufiges Phänomen handelt, haben Pflanzen Mechanismen entwickelt, die es ihnen erlauben, unter diesen widrigen Bedingungen zu überleben. Klassischerweise unterscheidet man drei Strategien, sich an Trockenheitsphasen anzupassen: Toleranz, Vermeidung und Flucht (Levitt 1972). Viele Wüstenpflanzen zum Beispiel sind xerophytisch, d. h. ihre morphologischen Charakteristika (z. B. verdickte Epidermis, versenkte Spaltöffnungen) machen sie tolerant gegenüber längeren Dürreperioden. Ein Vermeidungsmechanismus ist zum Beispiel die Ausbildung tiefer Wurzelsysteme, die es den sogenannten Phreatophyten erlaubt, tiefliegende Grundwasserschichten für sich nutzbar zu machen. Die Fluchtstrategie wird von sogenannten Ephemeren genutzt, die ihren Lebenszyklus vor Beginn der Trockenphase im Habitat vollenden. Diese Pflanzen weisen dabei ein hohes Niveau an Anpassungsfähigkeit bezüglich ihres Entwicklungszustandes auf, da sie auf frühe Anzeichen von Trockenstress reagieren und ihren Lebenszyklus vollenden, bevor es zu einem massiven Stress kommt. Dabei werden meist Überdauerungsformen wie z. B. Samen (Therophyten) oder Zwiebeln (Geophyten) ausgebildet. Erstere Strategie beruht vor allem auf einer erfolgreichen Vermehrung der Pflanze vor dem Auftreten des Trockenstresses. Um dies zu gewährleisten, legen die Pflanzen bevorzugt Nährstoffreserven an, um diese vor Beginn der Trockenperiode für die Samen- bzw. Fruchtproduktion zu nutzen. Dieses Verhalten kann man vor allem bei Getreide sowie einigen Hülsenfrüchten beobachten (Gebbing und Schnyder 1999; Rodrigues *et al.* 1995). All diese Strategien schließen sich jedoch gegenseitig nicht aus und es existieren auch Pflanzen, die verschiedene Strategien in unterschiedlicher Ausprägung kombinieren können.

1.1.4.2 Molekulare Mechanismen der Trockenstresstoleranz

Zur Erforschung der molekularen Mechanismen der Trockenstresstoleranz wurden in der Vergangenheit hauptsächlich drei verschiedene Systeme verwendet:

- a) Pflanzen oder Pflanzenteile, die starke Austrocknung überstehen können
- b) Mutanten bekannter Modellpflanzen, v. a. *Arabidopsis thaliana* L. Heyn
- c) Nutzpflanzen

Einige Samen, Moose und Farne, aber vor allem Wiederauferstehungspflanzen wie *Craterostigma plantagineum* Hochst., zeigen eine hohe Resistenz gegenüber Trockenheit.

Dabei konnte bereits eine Austrocknung des Gewebes auf einen RWC von 10 % und damit das vollständige Abschalten der metabolischen Aktivität beobachtet werden. Dieser Prozess wird als Anhydrobiose bezeichnet (Ingram und Bartels 1996). Eine der Hauptideen aus der molekularen Analyse von Samen solcher Pflanzen war die Identifikation von Proteinen, die in der späten Embryogenese (LEA) gebildet werden (Dure *et al.* 1981). Diese LEA-Proteine sind jedoch entgegen ihres Namens nicht nur für dieses Entwicklungsstadium charakteristisch. Vielmehr dominieren Transkripte der LEA-Proteine die mRNA-Population in ausgetrockneten Geweben und verschwinden bei erneuter Verfügbarkeit von Wasser (Roberts *et al.* 1993). Es wird vermutet, dass diese Proteine eine chaperonähnliche Aktivität besitzen und daher Proteine und Membranen stabilisieren, um sie vor Aggregation zu schützen (Goyal *et al.* 2005).

Durch die Forschung an Modellpflanzen wie *A. thaliana* konnte vor allem der Metabolismus des Phytohormons Abscisinsäure (ABA) geklärt werden. Diese Substanz spielt eine wichtige Rolle bei vielen Anpassungsreaktionen in Bezug auf Trockenheit (Saez *et al.* 2006; Yang *et al.* 2006; Yoshida *et al.* 2006). Generell werden in *A. thaliana* zwei Stoffwechselwege in der Trockenstressantwort unterschieden: ein ABA-abhängiger und ein ABA-unabhängiger Weg. Der unmittelbare Rezeptor, der den osmotischen Zustand der Zelle an eine Signalkaskade weiterleitet und beide Stoffwechselwege aktiviert, ist noch nicht bekannt. Es wird jedoch vermutet, dass eine membrangebundene Histidinkinase vorhanden ist, die durch erhöhtes osmotisches Potential aktiviert werden kann (Urao *et al.* 1999).

Beim ABA-unabhängigen Weg, kommt nach der Aktivierung von Phospholipase C durch die putative Histidinkinase zur Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (Mahajan und Tuteja 2005). Der dabei gebildete sekundäre Botenstoff Inositol-1,4,5-triphosphat bewirkt die Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen, wodurch nachgelagerte Kinasen und Phosphatasen aktiviert werden. Dies führt letztendlich zur Expression trockenheitsassoziierter Gene, für die ein charakteristisches cis-Element zur Bindung von Transkriptionsfaktoren bekannt ist. Dieses Element wird im Allgemeinen als Dehydratations-responsives Element bezeichnet und gilt als zentraler Modulator der ABA-unabhängigen Stressantwort (Beck *et al.* 2007).

Bei der ABA-abhängigen Signalkaskade (Abbildung 5) wird ABA zunächst von einem Rezeptorkomplex gebunden, der aus einem Pyrabactin-Resistenz- (PYR), Pyrabactin-Resistenz-ähnlichen Protein (PYL) und einer regulatorischen Einheit (RCAR) besteht. Im gebundenen Zustand interagiert dieser Proteinkomplex mit einer Mg^{2+} - oder Mn^{2+} -abhängigen Serin/Threonin-Phosphatase vom Typ 2C und inaktiviert diese (Ma *et al.* 2009; Park *et al.* 2009). Hierdurch kommt es zur Phosphorylierung und Aktivierung

nachgelagerter Kinasen, die ihrerseits zur Aktivierung weiterer Proteine, wie z. B. NADPH-Oxidasen (*AtRbohF*), Ionenkanälen (*SLAC1*, *KAT1*) sowie Transkriptionsfaktoren (*ABI5*, *AREB1/2*) führen (Kim *et al.* 2010). Diese Transkriptionsfaktoren können an charakteristische cis-Elemente (ABA-responsive Elemente, ABRE) in der Promotorregion von ABA-induzierten Genen binden, was letztendlich zur Expression trockenheitsassoziierter Gene führt.

Interessanterweise kann es auch durch ROS zu einer Inaktivierung der Typ 2C Phosphatasen kommen, was sonst nur durch ABA möglich ist. Daher kann es auch ohne ABA zur Trockenstressantwort kommen (Meinhard und Grill 2001).

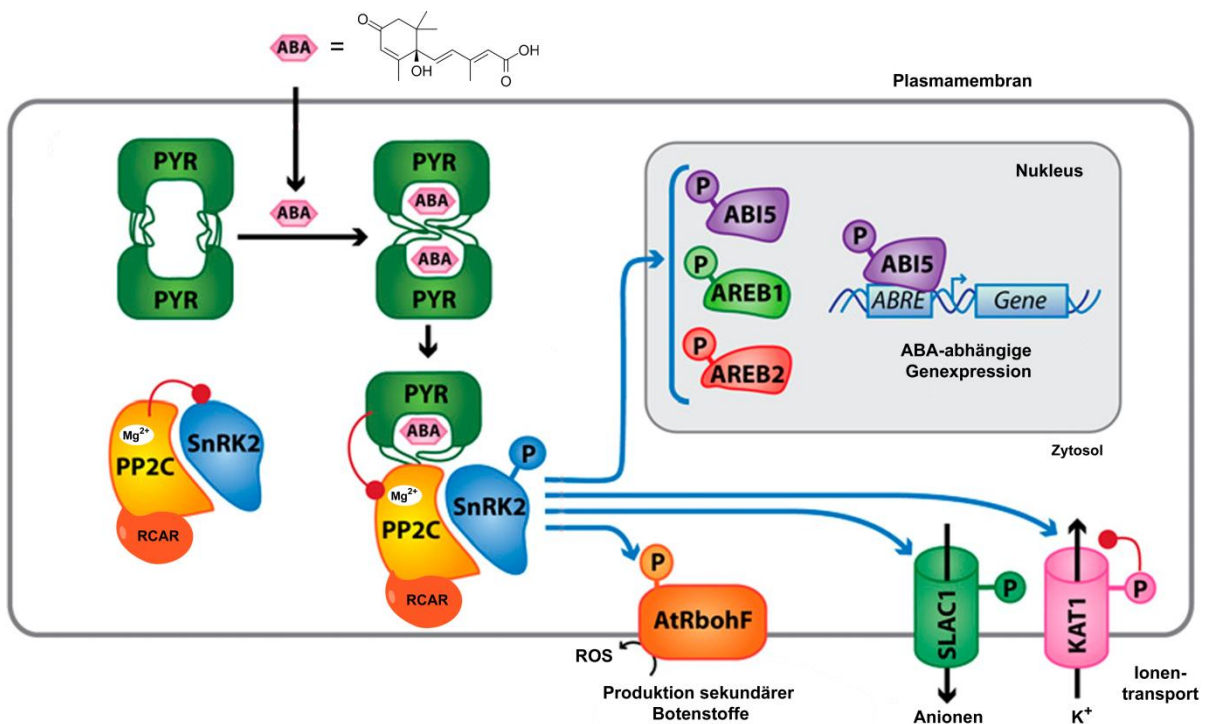


Abbildung 5: Darstellung der Abscisinsäure-abhängigen Trockenstressantwort; ABA - Abscisinsäure, PYR - Pyrabactin-Resistenz-Protein, PP2C - Phosphatase Typ 2C, SnRK2 - SNF1-verwandte Proteinkinase 2, RCAR - regulatorische Einheit des Abscisinsäure Rezeptors, AREB1/2 - Abscisinsäure responsives Bindeelement, ABI5 (Abscisinsäure insensitiv 5) - Transkriptionsfaktor, *AtRbohF* - NAD(P)H Oxidase, *SLAC1* (*slow anion current activation*) - Anionentransmembrantransporter, *KAT1* - Kationentransmembrantransporter modifiziert nach Hubbard *et al.* 2010

1.1.4.3 Trockenstresstoleranz durch pflanzeigene Metaboliten

Die Trockenstressantwort der Pflanze führt letztendlich zur Bildung von Proteinen und Metaboliten, die die Pflanze vor Schäden schützen sollen. Am deutlichsten wird dies durch die Akkumulation von osmotisch wirksamen Substanzen, sogenannten Osmolyten bzw.

kompatiblen Soluten. Hierzu gehören hauptsächlich Polyalkohole wie Zucker sowie Verbindungen, die Zwitterionen bilden können, wie Aminosäuren und Betaine. Die Funktion dieser kompatiblen Solute liegt hauptsächlich in der Aufrechterhaltung des Turgors durch Erhöhung des osmotischen Potentials. Es werden aber zunehmend weitere Rollen diskutiert (Serraj und Sinclair 2002).

Zu den bekanntesten und am weitesten verbreiteten Osmolyten zählt die Aminosäure L-Prolin, welche nicht nur im Pflanzenreich diese Funktion besitzt (Delauney und Verma 1993). Für diesen Metaboliten kann es durch Stress zu einer Steigerung des Gehaltes um den Faktor 100 kommen (Verbruggen und Hermans 2008). Neben der Funktion als kompatibles Solut wird vermutet, dass L-Prolin auch als Radikalfänger wirken kann (Smirnoff und Cumbes 1989). Der Gehalt an L-Prolin in der Pflanzenzelle wird dabei hauptsächlich durch ein Gleichgewicht aus Anabolismus und Katabolismus gesteuert (Abbildung 6). L-Prolin kann entweder aus L-Glutamat oder aus L-Ornithin gebildet werden, wobei v. a. unter Stress die L-Glutamat-abhängige Biosynthese eine Rolle spielt (Delauney und Verma 1993). Dabei wird aus L-Glutamat unter Verbrauch von NADPH und Adenosintriphosphat (ATP) zunächst L-Glutamat- γ -semialdehyd gebildet, welcher spontan zur Δ^1 -Pyrrolin-5-carbonsäure (5PC) zyklisiert. Durch Reduktion des Imins unter Verbrauch von weiterem NADPH kann L-Prolin gebildet werden. Für diese Reaktionsfolge werden in *A. thaliana* die Enzyme 5PC-Synthetase und 5PC-Reduktase verwendet (Abbildung 6).

Der Abbau von Prolin erfolgt in ähnlicher Art über die zweifache Oxidation von L-Prolin: im ersten Schritt durch die Prolindehydrogenase zur 5PC und anschließend von der 5PC zum L-Glutamat durch die 5PC-Dehydrogenase. Bei der Biosynthese des L-Prolins ist die Aktivität der 5PC-Synthetase der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, weshalb eine Überexpression des zugehörigen Gens zu einer erhöhten Prolinkonzentration und damit zu höherer Trockenstresstoleranz führt (Zhu *et al.* 1998). Eine erhöhte Trockenstresstoleranz durch vermehrte Prolinakkumulation konnte sowohl für *A. thaliana*, Tabak, Reis als auch für Sojabohnen gezeigt werden (Hong *et al.* 2000; Nanjo *et al.* 1999; Roosens *et al.* 2002).

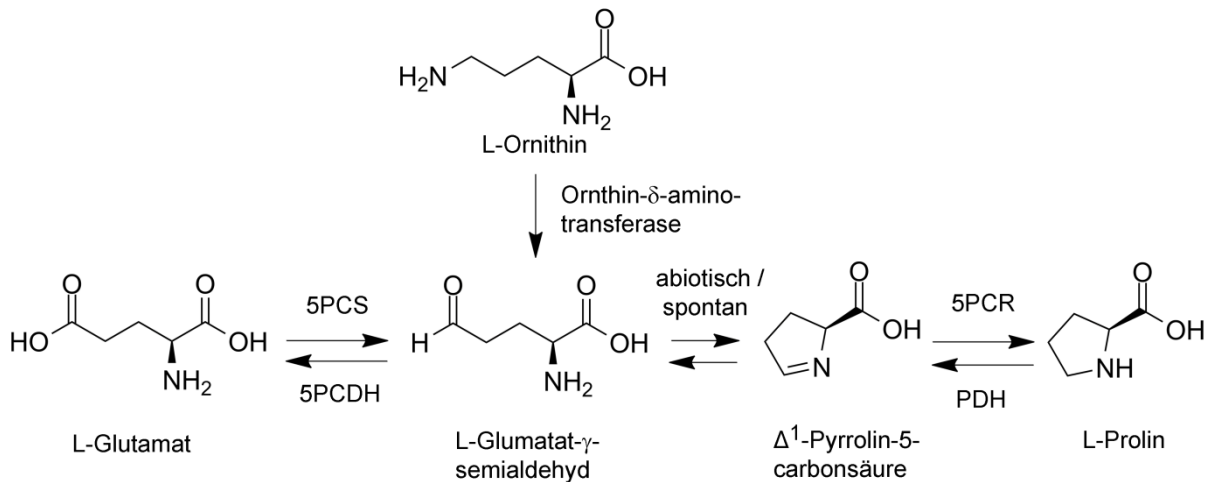


Abbildung 6: Anabolismus und Katabolismus von L-Prolin; 5PCS - Δ^1 -Pyrrolin-5-carbonsäure-Synthetase; 5PCDH - Δ^1 -Pyrrolin-5-carbonsäure-Dehydrogenase; 5PCR - Δ^1 -Pyrrolin-5-carbonsäure-Reduktase; PDH - L-Prolindehydrogenase; modifiziert aus Delauney und Verma (1993)

Ein weiterer Vertreter der pflanzlichen Osmolyten ist das vollständig N-methylierte Glycinderivat Glycinbetain (GB), welches in halotoleranten Spezies der Süßgräser (Poaceae), Korbblütler (Compositae) und Fuchsschwanzgewächse (Amaranthaceae) vermehrt unter Trockenstress gebildet wird (Rhodes *et al.* 2002). Biosynthetisch wird GB durch zweifache Oxidation von Cholin gebildet (Abbildung 7). Dabei wird als Zwischenstufe durch eine ferredoxinabhängige Monooxygenase zunächst der entsprechende Betainaldehyd gebildet und nachfolgend, unter Verbrauch von NAD^+ , durch eine Betainaldehyddehydrogenase zum GB weiteroxidiert (Rhodes *et al.* 2002). GB wird ausschließlich in Plastiden gebildet und durch seine zwitterionische Natur kann es wie L-Prolin als „Wasserersatz“ wirken und Makromoleküle stabilisieren (Chen und Murata 2008). Weiterhin wird vermutet, dass GB zur Aktivierung bzw. Stabilisierung radikalfangender Enzyme beiträgt, da es selbst nicht als Radikalfänger wirken kann, jedoch für eine Verminderung der ROS sorgt (Park *et al.* 2004). In Pflanzen, die kein GB produzieren (*A. thaliana*, *Hordeum vulgare*, *Triticum aestivum*) konnte gezeigt werden, dass eine durch Überexpression der entsprechenden Gene gesteigerte Biosynthese zu einer erhöhten Toleranz in Bezug auf Kälte- bzw. Salzstress führt, die Trockenstresstoleranz allerdings nicht beeinflusst wird (Chen und Murata 2008). Die entsprechenden Pflanzen zeigen jedoch nur eine geringe Erhöhung des GB-Gehaltes, was auf eine Limitierung des Substrates Cholin zurückzuführen ist (Nuccio *et al.* 1998).

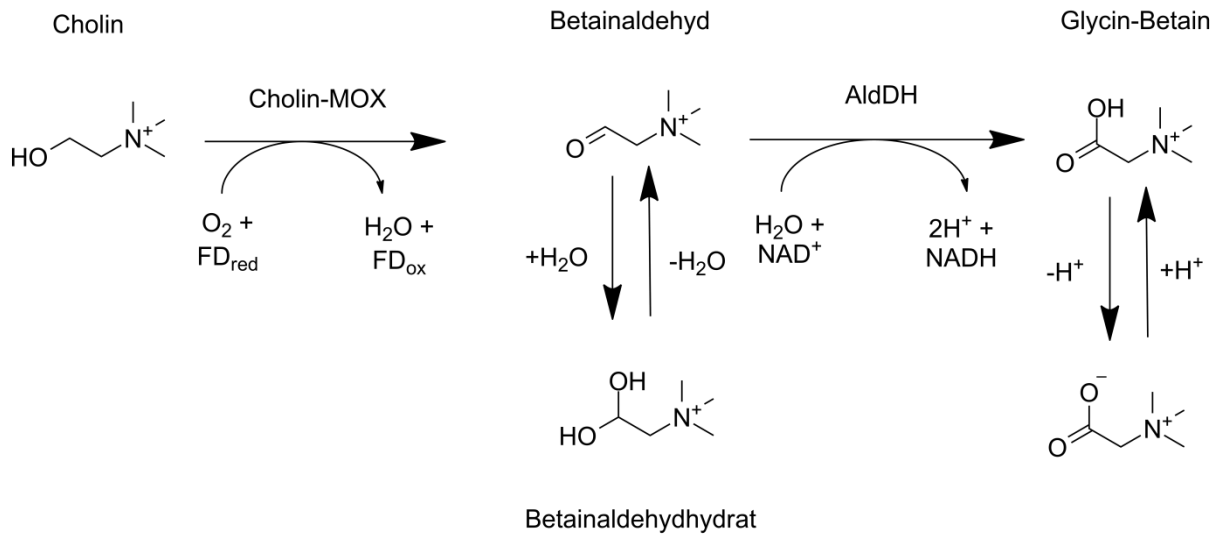


Abbildung 7: Biosynthese von Glycin-Betain; Cholin-MOX - Cholinmonooxygenase; FD - Ferredoxin; AldDH - Betainaldehyddehydrogenase; NAD - Nikotinamid-adeninindinukleotid

Zuckerosmolyten werden ebenfalls vermehrt unter Trockenstress gebildet. Diese umfassen sowohl einfache Hexosen (Glucose), Disaccharide (Saccharose, Trehalose), Zuckeralkohole (Mannitol), aber auch ungewöhnliche 8-Kohlenstoffzucker (Octulosen). Die Biosynthese dieser Zucker ist hauptsächlich mit dem Abbau von Stärke assoziiert. Dabei ist der z. Zt. am besten untersuchte Zuckerosmolyt Trehalose. Es ist bekannt, dass Trehalose auch in Insekten und Niederen Pflanzen bei der Dehydrierung eine Rolle spielt (Benoit *et al.* 2009; Higo *et al.* 2006). Jedoch zeigen Höhere Pflanzen, mit Ausnahme der vollständig trockenstressresistenten Wiederaufstehungspflanzen, nur geringe Mengen Trehalose. Allerdings konnte bereits in vielen Pflanzenspezies (Tomate, Tabak, Reis) gezeigt werden, dass eine verstärkte Synthese von Trehalose, z. B. durch die Überexpression der Trehalosephosphat synthase, zu einer höheren Trockenstresstoleranz führt (Garg *et al.* 2002; Goddijn und van Dun 1999; Romero *et al.* 1997).

Auch Polyamine können als Osmolyten wirken und spielen eine Rolle in der Trockenstressantwort. Diese aliphatischen stickstoffhaltigen Verbindungen mit einer Kettenlänge von 4-10 C-Atomen werden in Pflanzen durch Umwandlung der Aminosäuren Arginin (Spermin, Spermidin) oder Ornithin (Putrescin) gewonnen. Durch Überexpression der Biosynthesegene in Reis konnte nur eine leichte Erhöhung der Spermin- und Spermidinkonzentration gezeigt werden, was jedoch zu einer erhöhten Trockenstresstoleranz führt (Capell *et al.* 2004).

1.1.4.4 Trockenstresstoleranz durch Deregulation von Signalwegen

Zur Kontrolle der Biosynthese aller Osmolyten und damit der Trockenstresstoleranz der Pflanze, wird ein sehr fein abgestimmtes Signalnetzwerk benötigt. Bestimmte Signale führen dabei über die Expression von Genen zu einer erhöhten Trockenstresstoleranz. Hierdurch produzierte Proteine können unter anderem LEA-Proteine, antioxidativ wirkende Proteine oder Chaperone sein (Hruz *et al.* 2008). Eine hohe Trockenstresstoleranz ist jedoch meist nicht mit einem einzelnen Gen assoziiert, vielmehr wird für ein solch komplexes Merkmal das Zusammenspiel vieler Genprodukte benötigt (Bartels und Sunkar 2005). Aus diesem Grund führt die Induktion oder Überexpression eines einzelnen Trockenheits-responsiven Gens meist nicht zu einer erhöhten Trockenstresstoleranz der Pflanze.

Es existieren jedoch Beispiele, bei denen die Deregulation gesamter Stoffwechselwege durch Überexpression z. B. von Transkriptionsfaktoren zu einer erhöhten Trockenstresstoleranz geführt hat. So zeigen *A. thaliana*-Pflanzen, die die ABA-responsiven Transkriptionsfaktoren *ABF2*, *ABF3* oder *ABF4* (*ABA responsive element binding factor*) überexprimieren, eine verringerte Transpiration durch schnelleres Schließen der Stomata und eine höhere Toleranz gegen Hitze, Kälte, Trockenheit sowie oxidativen Stress (Fujita *et al.* 2005; Kang *et al.* 2002; Kim *et al.* 2004). Dies konnte zusätzlich an transgenen Reiskeimlingen bestätigt werden, die *AtABF4* überexprimieren (Oh *et al.* 2005).

Ähnliche Ergebnisse konnten auch mit den nicht durch ABA aktivierten, dehydratationsresponsiven Transkriptionsfaktoren *DREB* (*dehydration responsive element binding*) erzielt werden. So führt die Überexpression von *DREB1A* aus *A. thaliana* in Reis zu einer erhöhten Trockenstresstoleranz. Dies ist jedoch sehr stark vom verwendeten Promotor abhängig. Wurde der Transkriptionsfaktor unter dem konstitutiven Promotor *OsActin1* exprimiert, konnte keine erhöhte Toleranz gegen Trockenstress festgestellt werden. Unter dem ebenfalls konstitutiven Promotor *ZmUbi* war zwar eine erhöhte Trockenstresstoleranz zu beobachten, jedoch zeigte sich in Abhängigkeit der verwendeten Reissorte eine Wachstumsinhibierung der nicht gestressten Kontrollpflanzen. Nur die Expression unter dem stressinduzierten Promotor *OsHVA22p* zeigte eine leicht erhöhte Trockenstresstoleranz ohne negative Effekte unter Normalbedingungen (Xiao *et al.* 2009). Auch für andere *DREBs* konnte durch Überexpression eine hohe Trockenstresstoleranz erzielt werden, jedoch zeigen die Pflanzen unter Normalbedingungen ebenfalls häufig Wachstumsdefekte (Hsieh *et al.* 2002), weshalb nur eine geringere Expression mithilfe eines stressinduzierbaren Promotors und damit einer geringeren Trockenstresstoleranz für eine Anwendung in der Landwirtschaft sinnvoll ist.

Neben der Kontrolle der Transkription, ist eine Deregulation der Trockenstressantwort auch auf Proteinebene möglich, z. B. über posttranslationale Modifikationen. So können Mutanten, z. B. mit einer veränderten Proteinphosphorylierung, eine höhere Trockenstresstoleranz aufweisen. Dies ist vor allem darin begründet, dass sowohl viele Transkriptionsfaktoren als auch Proteine nur durch Phosphorylierung aktiviert werden (Furihata *et al.* 2006). Vor allem mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK) sind Ziel intensiver Studien, da sie in vielen abiotischen Stressprozessen involviert sind (Hua *et al.* 2006). Die bedeutende Rolle der MAP-Kinasen in der Vermittlung von Trockenstresstoleranz wird zudem durch die Beobachtung unterstützt, dass die Überexpression einer MAPK aus *Nicotiana tabacum* in *Zea mays* zu einer erhöhten Resistenz gegen Trockenstress führt. Dabei beruht die erhöhte Toleranz vermutlich auf der dauerhaften Aktivierung einer Stresskaskade, die normalerweise durch oxidativen Stress induziert wird (Shou *et al.* 2004).

Weiterhin führt auch die Überexpression anderer Kinasen, wie z. B. der SnRK2.8 (*SNF1-related protein kinase 2.8*) aus *A. thaliana* zu trockenstresstoleranteren Pflanzen, da diese Kinasen in der Lage sind, ABA-abhängige Transkriptionsfaktoren durch Phosphorylierung zu aktivieren. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass durch Überexpression von SnRK2.8 auch ABA-unabhängige Transkriptionsfaktoren wie *DREB1* induziert werden (Umezawa *et al.* 2004).

Da vor allem eine veränderte Expression der ABA-Rezeptoren und ihrer unmittelbaren Interaktionspartner für eine höhere Trockenstresstoleranz verantwortlich sein könnte, wurden bereits viele Homologe der Proteinphosphatase 2C ausgeschaltet, da es sich hier um einen Negativregulator der ABA-Signaltransduktion handelt. Dies führte in *A. thaliana* wie erwartet zu einem verminderten Wasserbedarf und höherer ABA-Sensitivität, jedoch konnte in anderen Pflanzenspezies eine hohe Redundanz dieser Rezeptoren gezeigt werden, so dass eine effiziente Pflanzenschutzstrategie sehr aufwändig wäre (Yang *et al.* 2010).

Eine andere Möglichkeit die Transkription von Genen zu vermindern, ist die sogenannte RNA-Interferenz (RNAi). Unter Anwendung dieser Technik konnte die Trockenstresstoleranz als auch der Ertrag von Rapspflanzen gesteigert werden, bei denen eine der Untereinheiten von ERA1 (*enhanced response to ABA 1*) ausgeschaltet wurde (Wang *et al.* 2005; Wang *et al.* 2009). Bei ERA1 handelt es sich um eine Proteinfarnesyltransferase, die an der Stomataöffnung beteiligt ist und als Negativregulator der ABA-vermittelten Trockenstressantwort fungiert (Cutler *et al.* 1996; Pei *et al.* 1998). Die *era1* Knockout-Mutante zeigt pleiotrope Wachstumsabnormalitäten, wohingegen bei

Pflanzen mit einem *ERA1*-RNAi-Konstrukt, welches unter Kontrolle eines stressresponsiven Promotors steht, keine Wachstumsdefizite zu beobachten sind (Wang *et al.* 2005).

Viele abiotische Stresse, wie auch Trockenstress, bedingen die Akkumulation von ROS, die z. B. zu Schäden am Erbmateriale führen können. Dadurch kommt es zur Aktivierung von Poly(ADP-Ribose)-polymerasen (PARP; Amor *et al.* 1998; Doucet-Chabeaud *et al.* 2001), die den Energiehaushalt der Pflanzen negativ beeinflussen (De Block *et al.* 2005). Durch Blockierung der PARP-Aktivität mittels genetischer Methoden lässt sich die Trockenstresstoleranz der Pflanzen positiv beeinflussen. Dies wird jedoch genauer im Kapitel 1.2 betrachtet.

1.1.4.5 Trockenstresstoleranz durch Pflanzenwachstumsregulatoren

Neben genetischen Methoden zur Erhöhung der Trockenstresstoleranz ist auch die Applikation von sogenannten Pflanzenwachstumsregulatoren (PWR) möglich. Dies ist vor allem sinnvoll, wenn transgene Pflanzen zwar über eine erhöhte Trockenstresstoleranz verfügen, aber unter Normalbedingungen Wachstumsdefizite oder andere pleiotrope Effekte gegenüber den Wildtyppflanzen zeigen (Jansen *et al.* 2009; Wang *et al.* 2005). Da Pflanzenschutzmittel i. d. R. nur eine begrenzte Wirkungsdauer aufweisen, lässt sich der gewünschte Trockenstresstoleranzeffekt sehr präzise steuern. Ein weiterer Grund für die Nutzung von PWR ist die sehr geringe Akzeptanz der Konsumenten für gentechnisch veränderte Lebensmittel. So gaben 1999 52 % der befragten deutschen Verbraucher an, dass sie Gentechnik in der Landwirtschaft als Bedrohung empfinden (Becker 1999). Die Besorgnis über gentechnisch veränderte Lebensmittel war dementsprechend sogar höher als gegenüber Kernkraft (39 %). Dieser Trend setzt sich nicht nur in Deutschland fort. So zeigen sich 66 % der Europäer (Deutschland 71 %) beunruhigt über gentechnisch veränderte Lebensmittel (European Food Safety Authority 2010). In jedem Falle besteht bei genetischen Modifikationen von Nutzpflanzen immer das Potential einer allergischen Reaktion des Konsumenten (Nordlee *et al.* 1996).

Es sind nicht viele Vertreter der PWR bekannt, die die Trockenstresstoleranz erhöhen. Es konnte bisher gezeigt werden, dass Fungizide mit einer 1,2,4-Triazol-Struktur (z. B. Paclobutrazol, Uniconazol, Triademefon) zu einer erhöhten Stresstoleranz gegenüber Kälte, Trockenheit, Ozon und Hitze in vielen Kulturpflanzen wie Rettich, Tomate, Soja und Erbse führen (Fletcher und Hofstra 1988). Ursprünglich wurden diese Substanzen als Pflanzenschutzmittel gegen phytopathogene Arten der Pilzgattung *Rhynchosporium*,

Fusarium und *Septoria* entwickelt (Schulz und Scheinpflug 1988). Diese Substanzen inhibieren die 14 α -Demethylase, die eine Rolle in der Biosynthese von Ergosterol spielt, welches essentiell für die Synthese der Plasmamembran des Pilzes ist (Vanden Bosche 1988). Außerdem binden diese Substanzen an weitere Stoffwechselproteine der Pflanzen und gelten deshalb als Multitargeteffektoren. So werden auch die Cytochrom-P450 Oxygenasen inhibiert, welche die Gibberillinvorstufe *ent*-Kauren umsetzen. Das führt dazu, dass das vegetative Wachstum inhibiert wird und die Pflanzen keine Apikaldominanz mehr zeigen. Bei einer dauerhaften Behandlung kommt es daher zu einem zwergartigen und buschigen Wachstum (Rademacher 2000). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass diese Substanzen neben ihrem negativen Einfluss auf das Wachstum auch einen positiven Effekt aufweisen, indem sie durch Hemmung der Ethylenbiosynthese zu einer verzögerten Seneszenz führen. Dadurch kommt es zu einem geringeren Chlorophyllabbau, weshalb die mit Triazol-PWR behandelten Pflanzen einen sogenannten „Greening-Effekt“ zeigen (Hofstra *et al.* 1989). Weiterhin konnte auch eine kurzfristige Erhöhung des ABA-Levels beobachtet werden, was vermutlich dazu führt, dass Stomatazellen geschlossen werden und so die erhöhte Toleranz gegenüber Trockenstress und Ozon erklärbar wird. (Fletcher und Hofstra 1988).

Strobilurine bilden eine weitere Substanzklasse, die eine positive Wirkung auf die pflanzliche Produktivität unter Trockenstress hat. Vertreter dieser Stoffgruppe sind ebenfalls als Fungizide bekannt und leiten sich ursprünglich aus den Sekundärmetaboliten des Basidiomyceten *Strobilurus tenacellus* ab (Anke *et al.* 1977). Ihre fungizide Eigenschaft beruht auf der Unterbrechung der Elektronenübertragung zwischen den Cytochromkomplexen b und c₁ in der mitochondrialen Zellatmung. Diese Wirkung beruht auf der β -Methoxyacrylsäureestereinheit der Strobilurine (Bartlett *et al.* 2002). Strobilurine führen bereits unter Normalbedingungen bei Weizen zu höherer Stoffwechselaktivität und damit verbunden zu höheren Erträgen (Beck 2005). Als Mechanismus hierfür wird eine Veränderung des Phytohormongleichgewichts vermutet. Es konnte gezeigt werden, dass Pflanzen, die mit Strobilurinen behandelt wurden, höhere Cytokinin- und niedrigere Ethylenmengen produzieren (Grossmann und Retzlaff 1997). Dies führt zu einer verzögerten Seneszenz, einem längeren Erhalt von Chlorophyll und daher ebenfalls zu einem „Greening-Effekt“. Ein erhöhter Ertrag sowie höhere CO₂-Aufnahme wurde auch unter Trockenstress nachgewiesen und es wird vermutet, dass Strobilurine zu einer generell erhöhten Stresstoleranz führen. Andererseits wird auch vermutet, dass dieser Effekt hauptsächlich durch den niedrigeren Pathogendruck gegenüber den Kontrollpflanzen verursacht wird. Jedoch zeigen mit Strobilurinen behandelte Pflanzen auch dann eine höhere

Photosyntheseleistung, wenn die Kontrollpflanzen mit einem anderen Fungizid behandelt wurden (Beck 2005).

Ein weiterer PWR mit wachstumssteigernden Eigenschaften unter Trockenstress ist Imidacloprid (Gaucho[®], Confidor[®]), welches eigentlich als Insektizid zugelassen ist (Thielert 2006). Die insektizide Wirkung der Substanz beruht wie bei allen Neonikotinoiden auf einer agonistischen Bindung an nikotinerge Acetylcholinrezeptoren der Insekten. Da diese Rezeptoren eine wichtige Rolle in der Nervenreizweiterleitung spielen, kommt es zur Überstimulation der Insektennerven und zu Lähmungen und Tod (Matsuda *et al.* 2001). Die Trockenstresstoleranz induzierende Wirkung konnte bereits bei Ackerschmalwand, Gerste, Melone, Pfeffer, Baumwolle und Tomate nachgewiesen werden (Thielert 2006). Durch Chlorophyllfluoreszenzmessungen an Baumwollpflanzen konnte weiterhin eine erhöhte Quanteneffizienz des Photosystems II nach Behandlung mit Imidacloprid festgestellt werden (Thielert 2006). Für die Stresstoleranz induzierende Wirkung ist noch kein Mechanismus bekannt, jedoch wird vermutet, dass das Hauptabbauprodukt 6-Chlornikotinsäure (Rouchaud *et al.* 1996) dafür verantwortlich ist (Thielert 2006). In diesem Kontext wird auch ein mögliches Zusammenspiel mit dem Enzym PARP diskutiert (De Block *et al.* 2005).

1.1.4.6 Trockenstresstoleranz durch symbiotische Pilze

Eine weitere Möglichkeit eine gesteigerte Trockenstresstoleranz bei Pflanzen zu erzeugen, ist die Kolonialisierung dieser durch symbiotische Pilze. Hier zeigen vor allem mykorrhizierende Pilze eine starke Erhöhung der Toleranz gegenüber einer Reihe von abiotischen Stressfaktoren wie Salzstress (Rabie 2005), Trockenstress (Ruiz-Lozano 2003) oder Hitzestress (Redman *et al.* 2002). Dies geschieht nicht nur durch Vergrößerung der Wurzeloberfläche, sondern auch durch Sekretion spezifischer Metaboliten. So konnte z. B. die Kokultivierung von *Dichanthelium lanuginosum* mit dem Endophyten *Curvularia protuberata* die Toleranz der Pflanze gegenüber Temperaturen von bis zu 65°C erhöhen (Redman *et al.* 2002). Diese Wirkung konnte bereits an einer Reihe von Kulturpflanzen wie Mais, Hirse und Ackerbohne gezeigt werden (Aroca *et al.* 2007; Cho *et al.* 2006; Subramanian und Charest 1999). Die Effekte beruhen dabei meist auf der Bildung von Gibberellinen durch den Symbionten, die das Streckungswachstum der Pflanze fördern (Hamayun *et al.* 2009). Weiterhin existieren auch viele Studien zur Erhöhung der abiotischen Stresstoleranz durch endophytische Pilze. Der bekannteste Vertreter ist hier *Piriformospora indica*. Da dieser Endophyt auch die Modellpflanze *A. thaliana* kolonialisiert, existieren bereits zahlreiche Untersuchungen bezüglich der Veränderungen des Transkriptoms,

Proteoms und Metaboloms (Zuccaro *et al.* 2011). Die genaue Ursache des verstärkten Wachstums unter normalen als auch unter Stressbedingungen (Waller *et al.* 2005) ist jedoch noch nicht geklärt. Es wird vermutet, dass auch in diesem Fall vom Pilz sekretierte Metaboliten, ähnlich den von Rhizobakterien sekretierten Nod-Faktoren, eine große Rolle spielen (Oelmüller *et al.* 2009).

1.1.5 Assays zur Untersuchung von Trockenstress

Im Allgemeinen gibt es nur eine geringe Diversität an systematischen Prüfmethode(n) (Assays), mit denen man den Effekt chemischer Substanzen auf die Trockenstresstoleranz bei Pflanzen messen kann. Meist handelt es sich hier um Feldexperimente, bei denen die Substanzapplikation mehr oder weniger ungezielt erfolgt. Die dadurch erzeugte Variation wird jedoch durch die hohe Anzahl an Versuchspflanzen wieder gemittelt. Im folgenden Abschnitt soll ein Einblick in die bereits beschriebenen Versuche gegeben werden. Die wichtigsten Parameter dieser Assays sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Insgesamt zeigen die in der Literatur beschriebenen Untersuchungsmethoden, dass für die Trockenstressinduktion hauptsächlich verringerte Wasserzufuhr oder Medien mit künstlich verringertem Wasserpotential genutzt werden. Alle Untersuchungen nutzen nur eine (oder wenige) in großer Menge verfügbare Substanz(en). Die Applikation der Substanz(en) erfolgt dabei sehr unterschiedlich (Blätter, Wurzel, Infusion), wobei zudem nicht immer eine genau definierte Substanzmenge verwendet wird. Auch die benutzten Quantifizierungsparameter unterscheiden sich stark. Meist werden der Chlorophyll-, Carotenoidgehalt, der relative Wassergehalt oder Chlorophyllfluoreszenzparameter untersucht. Zusätzlich wird auch eine Bestimmung der Aktivitäten von Enzymen beschrieben, die am Abbau reaktiver Sauerstoffradikale beteiligt sind. Für die Untersuchung von Substanzbibliotheken oder die Identifizierung von Leitstrukturen sind die aufgeführten Untersuchungsmethoden bzw. Assay-Systeme jedoch nicht geeignet, da der Zeitbedarf und die benötigte Substanzmenge insgesamt zu groß sind.

Tabelle 1: Wichtigste Parameter ausgewählter Trockenstressassays

Pflanze	Substanz- applikation	Trockenstress- erzeugung	untersuchte Parameter	Literatur
<i>Phillyrea angustifolia</i>	Gießwasser	keine Wässerung für 3 Monate	- Stammdurchmesser	Fernandez <i>et al.</i> 2006
<i>Glycine max</i>	Aufsprühen	Reduktion des Boden-RWC auf 35 %	- Blattwasserpotential - Chlorophyllgehalt - Quantenausbeute des Photosystems II - CO ₂ -Aufnahmerate	Zhang <i>et al.</i> 2007
<i>A. thaliana</i>	Aufsprühen	keine Wässerung für 10 Tage	- Phaseinsäuregehalt - Abscisinsäuregehalt	Saito <i>et al.</i> 2006
<i>Hordeum vulgare</i>	Gießwasser	Reduktion des Boden-RWC auf 25 %	- Chlorophyllgehalt - Superoxiddismutase-Aktivität	Mascher <i>et al.</i> 2005
<i>Pinus strobus</i>	Xyleminfusion	keine Wässerung für 11 Tage	- Wasserpotential der Pflanze	Islam <i>et al.</i> 2003
<i>Triticum aestivum</i>	Lösung im Nähragar	Senkung des osmotischen Potentials von Agar auf -0,6 MPa	- Anzahl der gekeimten Samen - Zahl und Länge der Wurzeln - Trockengewicht	Ren <i>et al.</i> 2007
<i>Zea mays</i>	Aufsprühen, hydroponische Nährlösung	Zugabe von PEG 8000 zur hydroponischen Nährlösung	- Chlorophyllgehalt - Peroxidase- und Katalaseaktivität	Todorov <i>et al.</i> 1998
<i>Zea mays</i> Kallus	Lösung in Nähragar	Kultivierung im Medium mit PEG 8000	- Malondialdehydgehalt - H ₂ O ₂ -Gehalt - Ascorbatgehalt - Carotenoidgehalt	Li und van Staden 1998

1.2 ADP-Ribose-Metabolismus

Wie bereits im Abschnitt 1.1.4.4 beschrieben, hat der Metabolismus von ADP-Ribose (ADPR) große Auswirkungen auf die Trockenstresstoleranz bei Pflanzen (De Block *et al.* 2005). Dabei ist noch nicht bekannt, ob dabei der Verbrauch des Substrates NAD^+ oder die Aktivität der Biosyntheseenzyme für diesen Effekt verantwortlich sind. Beides soll im folgenden Abschnitt näher betrachtet werden.

1.2.1 NAD^+ -Biosynthese

NAD^+ ist als Substrat aller ADP-Ribosyltransferasen für die Biosynthese von ADPR essentiell. Neben dieser Funktion sind NAD^+ und die verwandten Pyridinnukleotide auch von zentraler Bedeutung bei zahlreichen Redoxprozessen, in der ROS-Homöostase (Mittler *et al.* 2004) sowie beim Schutz vor abiotischen Stressfaktoren wie Hitze-, Salz-, UV- und Trockenstress (Chai *et al.* 2005; Chai *et al.* 2006). Die Stoffwechselwege der Pyridinnukleotide sind dabei am besten für *A. thaliana* aufgeklärt. In Pflanzen kann NAD^+ über verschiedene Wege synthetisiert werden. Die wichtigsten sind dabei die *de novo* Synthese aus Asparaginsäure und der Recycling-Weg. Die *de novo* Synthese ist dabei mit 5 mol ATP pro mol NAD^+ der energieaufwändigere Stoffwechselweg. Neben Redoxreaktionen wird NAD^+ auch für die Bildung von zyklischer ADPR, pADPR sowie zur Proteindeacetylierung benötigt (De Block *et al.* 2005; Frye 1999; Malavasi *et al.* 2008). Da bei diesen Prozessen Nikotinamid gebildet wird, kann dieses in einem Rückgewinnungsprozess wieder zu NAD^+ umgewandelt werden. Solange Nikotinamid vorhanden ist, findet bevorzugt der Recycling-Weg statt, da hier nur 3 Moleküle ATP benötigt werden (De Block *et al.* 2005).

1.2.2 ADP-Ribose

ADPR wurde in den 60er Jahren als Metabolit im Kern von Hühnerleberzellen entdeckt (Chambon *et al.* 1963). Seit dieser Zeit wurde der Prozess der ADP-Ribosylierung vor allem im tierischen System sehr genau untersucht, in Pflanzen erfuhr er jedoch nur wenig Aufmerksamkeit. Die ADP-Ribosylierung ist eine ubiquitäre Stoffwechselreaktion und konnte bereits in allen untersuchten eukaryontischen Organismen mit Ausnahme von *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen werden (D'Amours *et al.* 1999). Dabei wird pADPR oder monomere ADP-Ribose (mADPR) gebildet, welche auf Akzeptorproteine übertragen wird. Diese Reaktion wird durch PARP bzw. durch

mono-ADP-Ribosyltransferasen (mART) katalysiert, wobei NAD^+ als Substrat dient (Abbildung 8). Dabei wird die erste ADPR-Einheit meist auf das Carboxylat eines Glutamatrestes eines Akzeptorproteins übertragen (Smith 2001). Jedoch konnte auch die Übertragung auf Arginin-, Lysin-, Aspartat- und Cysteinreste gezeigt werden (Corda und Di Girolamo 2003; Messner *et al.* 2010; Okazaki und Moss 1999; Rosenthal *et al.* 2011). Diese Art der ADP-Ribosylierung wird als Heteromodifikation bezeichnet. Im Gegensatz dazu kann PARP aber auch selbst als Akzeptorprotein dienen (Automodifikation). Die ADP-Ribosylierung kann dabei sowohl linear als auch verzweigt ablaufen. Die Größe der verzweigten Polymere kann dabei bis zu 200 ADPR-Einheiten umfassen (D'Amours *et al.* 1999). Es wurde sogar postuliert, dass die pADPR eine helikale Sekundärstruktur ähnlich der von DNA aufweist (Minaga und Kun 1983). Die Länge der Polymere variiert jedoch sehr, je nach Stress und Akzeptorprotein, wobei die längsten Polymere auftreten, wenn PARP selbst als Substrat dient (Meyer *et al.* 2006). Die Gegenspieler der PARP sind die Poly(ADP-ribose)-Glykohydrolasen (PARG), die pADPR zu mADPR hydrolysieren (Abbildung 8). Der letzte ADPR-Rest, welcher direkt am Protein gebunden ist, wird jedoch nicht durch PARG hydrolytisch, sondern von ADP-Ribosyl-Proteinlyasen unter Bildung des ungewöhnlichen Saccharids ADP-3'-desoxypentos-2'-ulose gespalten (Oka *et al.* 1984).

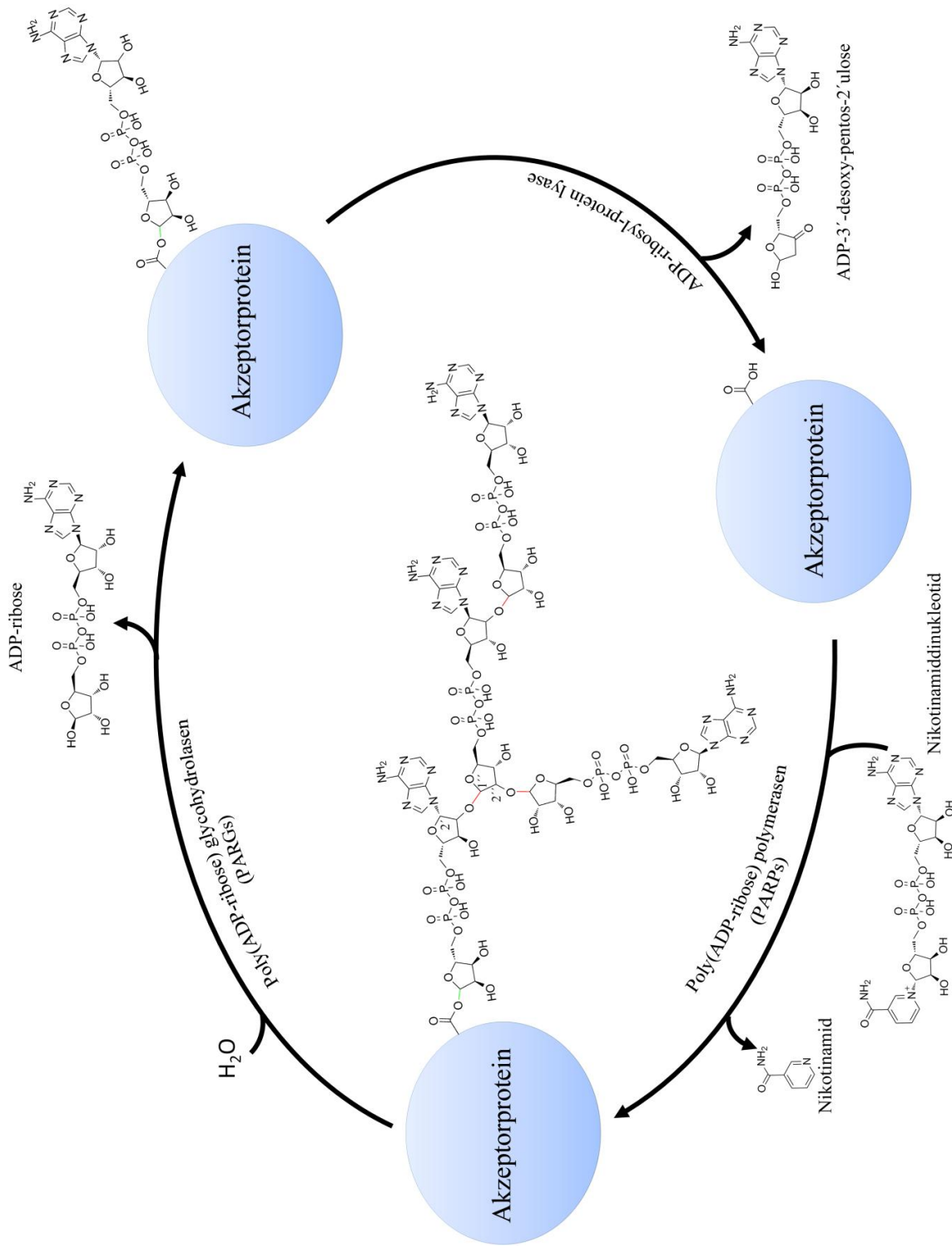


Abbildung 8: Enzymkatalysierte Reaktionen im Metabolismus von ADP-Ribose-Polymeren; rot gekennzeichnete Bindungen werden durch PARP gebildet sowie durch PARG gespalten; grün gekennzeichnete Bindungen werden durch PARP gebildet und durch ADP-ribosyl proteinlyasen gespalten

1.2.2.1 Bildung von Poly(ADP-Ribose)

Homo sapiens PARP-1 (*HsPARP-1*)

PARP-1 ist das Enzym, welches in tierischen Organismen für >90% der Poly(ADP-Ribosyl)ierung verantwortlich ist. Über Sequenzhomologievergleiche konnten allein im Genom des Menschen 18 Mitglieder der PARP-Superfamilie identifiziert werden, die eine potentielle katalytische Domäne zur Poly(ADP-Ribosyl)ierung tragen. Davon wurden bereits sieben biochemisch charakterisiert. PARP-1, welches als erster Vertreter entdeckt wurde, ist ausgiebig untersucht. Es handelt sich um ein 113 kDa großes Metalloenzym, welches aus drei Domänen aufgebaut ist (Abbildung 9). Am N-Terminus befindet sich die DNA-Bindedomäne, bestehend aus zwei Zinkfinger-Strukturen (Petrucco 2003). Diese Domäne enthält auch ein Kernlokalisierungssignal sowie eine Caspase-3-Schnittstelle. Die vom N-Terminus gesehene zweite Domäne besitzt die Automodifikationsstellen, an denen PARP-1 sich selbst ADP-ribosyliert. Weiterhin besitzt diese Domäne ein Motiv zur Interaktion mit anderen kernlokalisierten Proteinen. Die kleinste Domäne nahe dem C-Terminus ist die katalytisch aktive Domäne, von der bereits zahlreiche Kristallstrukturen bekannt sind (Ruf *et al.* 1996). Die katalytische Domäne bildet dabei den am höchsten konservierten Bereich, sowie eine charakteristische β - α -loop- β - α -Faltung (Amé *et al.* 2004). Durch einen Vergleich aller eukaryontischen PARP-Sequenzen wurde ein besonders hoch konservierter Bereich aus 50 Aminosäuren (859-908) identifiziert, welcher für die enzymatische Aktivität essentiell ist. Dieser Bereich wird als PARP-Signatur bezeichnet (Schreiber *et al.* 2006). Funktionell spielt PARP-1 eine große Rolle bei der DNA-Reparatur. PARP-1 defiziente Mausmodelle zeigen eine höhere Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung sowie gegenüber DNA-alkylierenden Wirkstoffen. Interessant ist jedoch, dass diese Mäuse ebenfalls eine höhere Toleranz gegenüber einer Reihe von inflammatorischen Prozessen zeigen (Shall und de Murcia 2000).

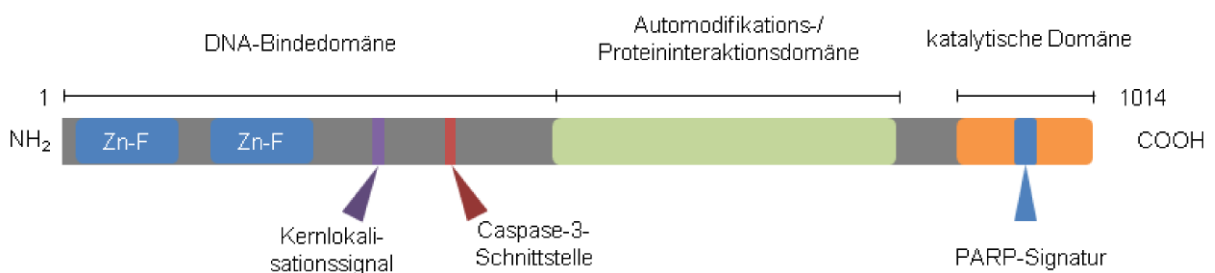


Abbildung 9: Schematische Darstellung von *HsPARP-1*; gekennzeichnet sind die DNA-Bindedomäne mit zwei Zn-Fingern (Zn-F), dem Kernlokalisierungssignal und der Caspase-Schnittstelle, die Automodifikationsdomäne und die katalytische Domäne

Mechanismus

Da für die pADPR-Bildung mehrere Moleküle NAD^+ verwendet werden, kommt es mechanistisch durch einen nukleophilen Angriff der Adeninribose des folgenden NAD^+ -Moleküls zur $\alpha(1'' \rightarrow 2')$ -Verknüpfung zwischen einer Adeninribose und der entsprechenden Nikotinamidribose des ersten ADPR-Restes (Abbildung 10). Man unterscheidet dabei die ADPR, die bereits mit dem Proteinsubstrat verknüpft ist und in der sogenannten Akzeptorbindungsstelle fixiert ist und die ADPR, die zur Verlängerung der Kette in der Donorbindestelle stabilisiert wird. Im *HsPARP-1* besitzt Glu988 dabei die Funktion der katalytisch aktiven Aminosäure. Dieser Aminosäure-Rest ist in allen bekannten mARTs und PARPs konserviert. Dabei wird vermutet, dass dieser Rest als einzige Base in der Umgebung die 2'-Hydroxylgruppe der Akzeptorribose deprotoniert, wodurch diese ausreichend nukleophil für einen Angriff auf die anomere Position (1'') der Donor-Ribose wird (Marsischky *et al.* 1995). Weiterhin wird vermutet, dass auch eine Polarisierung der Donor-Ribose an der 2''-Position den Angriff erleichtert (Ruf *et al.* 1998). Der Mechanismus der Reaktion wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Da es bei der Reaktion zur Inversion der Konfiguration am anomeren Zentrum kommt, wurde zunächst auf einen $\text{S}_{\text{N}}2$ -Mechanismus geschlossen (Scheuring und Schramm 1995). Untersuchungen zum sekundären kinetischen Isotopeneffekt der Reaktion zeigten jedoch eine sp^3 - zu sp^2 -Umwandlung des anomeren Kohlenstoffatoms, was darauf schließen lässt, dass ein Oxocarbenium-Ion bei der Reaktion entsteht und es sich somit um einen $\text{S}_{\text{N}}1$ -Mechanismus handeln müsste (Scheuring und Schramm 1997). Viele andere Glykosidspaltungen verlaufen ebenfalls nach dem $\text{S}_{\text{N}}1$ -Mechanismus (Müller-Steffner *et al.* 1996), weshalb dieser Reaktionsmechanismus als wahrscheinlicher gilt.

Als weitere Reaktion neben der linearen Verknüpfung zwischen Adeninribose und Nikotinamidribose katalysiert PARP auch eine Verzweigung, die zur $\alpha(1''' \rightarrow 2'')$ -Verknüpfung zwischen zwei Nikotinamidribosen führt (Abbildung 8). Bei der Verzweigung handelt es sich jedoch nur um eine Nebenreaktion, die nur alle 30-50 ADPR-Reste eingeführt wird (Miwa und Sugimura 1984).

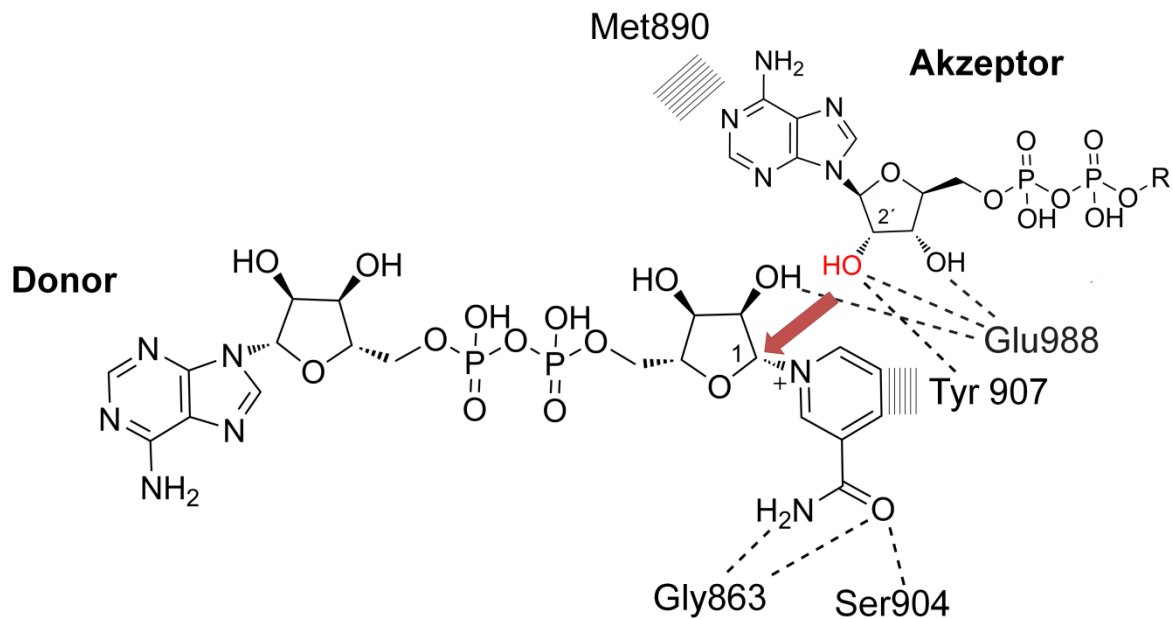


Abbildung 10: Schematische Darstellung der wichtigsten Interaktionen bei der Bildung von Poly(ADP-Ribose) zwischen HsPARP-1 und dem Substrat NAD⁺; dargestellt ist der nukleophile Angriff bei der Elongationsreaktion (Pfeil); Querbalken zeigen unpolare Kontakte und gestrichelte Linien zeigen Wasserstoffbrücken; modifiziert nach Ruf (1998)

1.2.3 Biochemische Bedeutung der ADP-Ribosylierung

Wie bereits aus vielen tierischen Systemen bekannt ist, spielt die ADP-Ribosylierung in zahlreichen Stoffwechselfvorgängen, wie z. B. DNA-Reparatur, Chromatinmodifikation, Transkriptionsregulation sowie Zelltod eine Rolle. Der Prozess der ADP-Ribosylierung wird im Allgemeinen als posttranslationale Modifikation betrachtet. Analog zur Phosphorylierung wird durch ADP-Ribosylierung kurzfristig die Aktivität der modifizierten Proteine verändert, was der Regulation von zellulären Prozessen dient. PARP-Proteine binden z. B. an Doppelstrangbrüche der DNA und können nachfolgend eine Reihe von Proteinen ADP-ribosylieren, die ihrerseits wieder DNA-Reparaturmechanismen aktivieren (Gagné *et al.* 2003). Eine weitere Bedeutung besitzt PARP für die Initiierung von Zelltod. Es konnte gezeigt werden, dass es bei Mäusen durch Behandlung mit DNA-methylierenden Agentien zur Aktivierung von PARP und eines Caspase-unabhängigen Zelltodes kommt (Yu *et al.* 2002). Bewirkt wird dieser durch Freisetzung des Apoptose induzierenden Faktors (*apoptosis inducing factor*, AiF) aus dem Intramembranraum der Mitochondrien. Der AiF stellt ein pro-apoptotisches Flavoprotein dar und gilt als einer der stärksten Auslöser für Apoptose (Chiarugi und Moskowitz 2002). Bei PARP-defizienten Mäusen kommt diese Art von Zelltod nicht vor. Inwieweit PARP an der Translokation des AiF beteiligt ist, ist bisher unbekannt.

Weitere Bedeutung besitzt PARP für die Regulation der Transkription. Diese regulatorische Aktivität wird über zwei Mechanismen ausgeübt: a) die Teilnahme von PARP an der Bildung von Aktivator- bzw. Repressorkomplexen, die an Promotorregionen von Genen binden oder b) eine Modifikation der Chromatinstruktur. Ersteres konnte in humanen Zellkulturen am Beispiel von Retinsäure-Rezeptoren gezeigt werden, wobei eine höhere PARP-Aktivität zu einer Aktivierung der Transkription führte (Pavri *et al.* 2005). Weiterhin kann PARP verschiedene Histone modifizieren, was dazu führt, dass diese stärker negativ geladen sind. Dadurch sinkt die Affinität der Histone gegenüber DNA und es kommt zur Auflösung der Nukleosomen. Durch diesen Prozess werden Teile der DNA leichter zugänglich, wodurch die transkriptionelle Aktivität der entsprechenden Gene steigt (Huletsky *et al.* 1989).

1.2.4 Bedeutung der ADP-Ribosylierung im pflanzlichen Organismus

Eine PARP-Aktivität in Pflanzen konnte erstmals 1976 in Keimlingen von *Allium cepa* nachgewiesen werden (Payne und Bal). Kurz darauf erfolgte die Charakterisierung einer pflanzlichen PARP-Aktivität in Kernextrakten aus Weizensamen hinsichtlich des Temperatur- und pH-Optimums. In derselben Studie wurde auch der erste PARP-Inhibitor 3-Aminobenzamid (3-AB) identifiziert (Whitby und Whish 1977; Whitby und Whish 1978), wobei auch Nikotinamid und Desoxythymidin diese Aktivität blockieren.

Durch Sequenzvergleiche konnten im *A. thaliana*-Genom die neun potentiellen PARP-Gene *PARP1* (AtPARP-1; At4g02390), *PARP2* (At2g31320), *PARP3* (At5g22470), *RCD1* (*Radical-Induced Cell Death One*; At1g32230) sowie *SRO1-5* (*Similar to RCD One 1-5*) identifiziert werden. Weitere Homologe sind aus *Oryza sativa* (3), *Zea mays* (3), *Populus trichocarpa* (3) und *Hordeum vulgare* (1) bekannt. Eine biochemische Charakterisierung der Proteine liegt bisher nur für AtPARP-1 und das *Zea mays* PARP vor (Babiychuk *et al.* 1998; De Block *et al.* 2005). Weiterhin konnte für *RCD1* sowie alle SRO-Proteine keine NAD⁺-Bindung bzw. ADP-Ribosylierung gezeigt werden. Es wird vermutet, dass es sich bei RCD1 um eine mART handelt (Jaspers *et al.* 2010).

Wie auch für tierische PARPs gezeigt, ADP-ribosylieren pflanzliche PARPs ihre entsprechenden Histone, was den Schluss nahelegt, dass pflanzliche PARPs ähnliche Substratspezifitäten aufweisen wie tierische PARPs (Willmitzer 1979). Daher ist zu vermuten, dass sich pflanzliche PARPs in ihrer Funktion nur wenig von den tierischen

Orthologen unterscheiden. Eine weitere Gemeinsamkeit zwischen tierischen und pflanzlichen PARP-Proteinen ist die Induktion der PARP-Aktivität durch genotoxische Agentien, wie Methylmethansulfonat (Hunt und Gray 2009). In Pflanzen ist eine Rolle von PARPs weiterhin in vielen anderen Prozessen wie z. B. der homologen Rekombination sowie der Entwicklung von Tracheiden postuliert (Puchta *et al.* 1995). Da sowohl für *Zea mays* PARP (Chen *et al.* 1994) als auch für *At*PARP-1 (Doucet-Chabeaud *et al.* 2001) eine Bindung an DNA gezeigt werden konnte, ist zu vermuten, dass auch in pflanzlichen Organismen PARP-Proteine eine Rolle in der DNA-Reparatur spielen. Diese Hypothese wird durch die gezeigte Induktion der Expression von *At*PARP-1 und *At*PARP-2 durch UV-Licht, ionisierende Strahlung sowie ROS unterstützt (Doucet-Chabeaud *et al.* 2001). Weiterhin zeigen *A. thaliana*-Mutanten wie *bru1-1* (*brushy 1-1*), bei denen verstärkt DNA-Schäden auftreten, eine dauerhafte Akkumulation von *At*PARP-2-Transkripten (Takeda *et al.* 2004). Entgegen aller Erwartungen zeigen Pflanzen, bei denen mittels der RNAi-Technik *At*PARP-1 oder *At*PARP-2 ausgeschaltet wurde, jedoch eine höhere Resistenz gegenüber DNase I induzierten DNA-Strangbrüchen (De Block *et al.* 2005). Ähnliche Effekte konnten auch mit den PARP-Inhibitoren 3-AB oder Nikotinamid erreicht werden, wobei Raps- sowie Tabakzellkulturen eine höhere Toleranz gegenüber durch Hitzestress induziertem Zelltod aufwiesen (Tian *et al.* 2000; Amor *et al.* 1998). Dieser Effekt ist damit zu erklären, dass PARP zwar an der DNA-Reparatur beteiligt ist, jedoch bei großen Schäden überaktiviert wird und große Mengen des Substrates NAD⁺ verbraucht. Dies führt letztendlich zu respiratorischem Stress und zur Apoptose (Chiarugi 2002; De Block *et al.* 2005; Du *et al.* 2003).

Auf Ganzpflanzenebene wirkt sich das Ausschalten der PARP-Aktivität auch auf den Phänotyp der Pflanzen unter Trockenstress aus. So zeigen unter Laborbedingungen sowohl *A. thaliana*- als auch *Glycine max*-Pflanzen, bei denen einzelne PARP-Gene mittels der RNAi-Technik ausgeschaltet wurden, eine erhöhte Toleranz gegenüber Licht-, Hitze- und Trockenstress. Unter Feldbedingungen zeigten PARP-defiziente Mais- und Rapspflanzen bis zu 40 % mehr Ertrag im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollpflanzen (De Block *et al.* 2005). Dies ist damit zu erklären, dass unter Stress - durch ROS vermittelt - ebenfalls vermehrt DNA-Schäden auftreten, die zur PARP-Überaktivierung führen.

Als Mechanismus für die erhöhte Toleranz PARP-defizienter Pflanzen ist jedoch auch die Induktion von ABA-abhängigen Signalwegen denkbar, da gezeigt werden konnte, dass die entsprechenden PARP-Mutanten verstärkt ABA produzieren sowie erhöhte Transkriptmengen ABA-abhängiger Gene aufweisen (Vanderauwera *et al.* 2007). Da für die tierischen PARP-Proteine bekannt ist, dass sie in der Lage sind, Chromatin-assoziierte

Proteine wie Histone oder Topoisomerasen zu modifizieren, könnte PARP vermutlich auch in Pflanzen an der transkriptionalen Regulation beteiligt sein.

Im Allgemeinen ist PARP als Zielprotein für die Pflanzenschutzmittelentwicklung besonders interessant, da aufgrund der verringerten ROS-Produktion in RNAi-PARP-Pflanzen eine bessere Toleranz gegenüber mehreren abiotischen Stressfaktoren wie Hitze-, Trocken-, Lichtstress auftritt. Zudem treten diese Stressfaktoren meist nicht vereinzelt sondern in Kombination auf. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass RNAi-PARP-Pflanzen unter Normalbedingungen ein geringeres Wachstum als die Wildtyp-Pflanzen aufweisen (Jansen *et al.* 2009). Daher ist die Nutzung von Substanzen zur temporären Inhibition der PARP-Enzyme sinnvoller als eine dauerhafte genetische Blockierung.

1.2.5 PARP-Inhibitoren und PARP-Pharmakophor

Pathophysiologische Anwendungen

Da PARP eine entscheidende Rolle in der tierischen DNA-Reparatur spielt, ist es nicht überraschend, dass Inhibitoren entwickelt wurden, um die Wirkung von Chemo- und Strahlungstherapien bei Krebspatienten zu unterstützen. In tierischen Organismen konnte dieser Zelltod steigernde Effekt von PARP-Inhibitoren sowohl bei ionisierender Strahlung als auch für die meisten DNA schädigenden Substanzen in zahlreichen *in vitro*- als auch *in vivo*-Studien bestätigt werden (Delaney *et al.* 2000; Miknyoczki *et al.* 2003; Tentori *et al.* 2002; Weltin *et al.* 1997). Besonders interessant ist jedoch die Applikation von PARP-Inhibitoren für erbliche Brustkrebsarten, bei denen eine Mutation in *BRCA 1/2* (*Breast cancer 1/2*) auftritt. Bei diesen Krebsarten können DNA-Schäden nicht durch homologe Rekombination repariert werden, sondern müssen durch die PARP-abhängige Basenexzisionsreparatur repariert werden (Hegan *et al.* 2010). Durch Blockierung von PARP ist in diesen Krebsarten keine DNA-Reparatur mehr möglich. Eine PARP-Inhibierung könnte bei vielen inflammatorisch bedingten sowie neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimer und Parkinson zu positiven Effekten führen (Abeti *et al.* 2011; Soos *et al.* 2004). Weiterhin wird die Anwendung von PARP-Inhibitoren bei Diabetes oder Arthritis vorgeschlagen und es wird vermutet, dass PARP-Inhibitoren sogar antiretroviral wirken (Virag und Szabo 2002).

Inhibitoren und Pharmakophor

Aufgrund dieser vielseitigen, sich noch entwickelnden Anwendungsgebiete ist die Suche nach PARP-Inhibitoren seit langer Zeit in den Fokus der wissenschaftlichen und industriellen Forschung/Entwicklung gerückt. Die ersten PARP-Inhibitoren Thymidin und Nikotinamid wurden 1971 im Labor vom Hellmuth Hiltz identifiziert. Systematischere Untersuchungen des chemischen Raumes ergaben, dass vor allem Benzamide, die in 3-Position mit einem Elektronendonator substituiert sind, eine höhere Aktivität als die bisher bekannten Inhibitoren besitzen (Sestili *et al.* 1990). In einem Screening von weit über 100 Substanzen verschiedenster Strukturklassen, darunter bi- und trizyklische Lactame, wurden von Banasik (1992) erstmals potente submikromolare Inhibitoren identifiziert. Dadurch konnte das PARP-Pharmakophor erweitert und neu definiert werden (Abbildung 12B). Dieses umfasst insgesamt drei Punkte: ein aromatisches System, welches mit dem Tyr907 über π - π -Wechselwirkungen interagieren kann, einen Wasserstoffbrückenakzeptor, der mit Ser904 und Gly863 Wasserstoffbrücken ausbildet sowie ein Wasserstoffbrückendonator, welcher ebenfalls mit Gly863 eine Wasserbrücke ausbilden kann (Peukert und Schwahn 2004). Diese Interaktionen bildet auch der Nikotinamidrest des Substrates NAD^+ aus. Daher binden alle Inhibitoren mit einem solchen Strukturmotiv in diesem Teil des aktiven Zentrums. Dieses Bindemotiv konnte bereits in mehreren Kokristallisationsstudien mit Inhibitoren nachgewiesen werden (Iwashita *et al.* 2005; Kinoshita *et al.* 2004; Miyashiro *et al.* 2009).

Um die Anforderungen des Pharmakophors nach einem Wasserstoffbrückenakzeptor und -donor in kurzem Abstand zueinander zu erfüllen, werden häufig - analog zum Substrat - Amide genutzt. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich durch Einschränkung der freien Rotation der Amidgruppe höhere Aktivitäten erreichen lassen. Diese Tatsache wird auch durch *ab initio* Berechnungen am Carboxamid von NAD^+ unterstützt. Hier konnte gezeigt werden, dass die *syn*-Konformation zwischen Carbonylsauerstoff und der C2-C3-Bindung des Aromaten mit ca. 2 kcal/mol (8,4 kJ/mol) gegenüber der *anti*-Konformation bevorzugt ist (Hong und Goldstein 1992). Da die *syn*-Konformation jedoch vermutlich nicht gebunden wird, ist eine Fixierung der Amidgruppe in der *anti*-Konformation sinnvoll (Abbildung 11).



Abbildung 11: Mögliche Konformere des Nikotinamidteils von NAD⁺ bei der Bindung am Protein

Diese Fixierung lässt sich in einem bicyklischen System erreichen, wie z. B. Dihydroisochinolin (**2**; Abbildung 12A), welches einen entsprechenden Lactamring enthält. Jedoch existieren auch hochpotente PARP-Inhibitoren, die ein offenkettiges Carboxamid aufweisen. Bei diesen Substanzen wird die Fixierung der Amidgruppe durch eine intramolekulare Wasserstoffbrücke zu einem anellierten Imidazol-, Indol- oder Furanring (**3,12**; Abbildung 12,12) erreicht. Substitutionen der Benzamidinhibitoren an den Positionen 4,5 und 6 wirken sich im Allgemeinen negativ auf die Aktivität aus, da die Enzymtasche auf dieser Seite durch die Aminosäurereste Lys903 und Ala898 begrenzt wird (Abbildung 12).

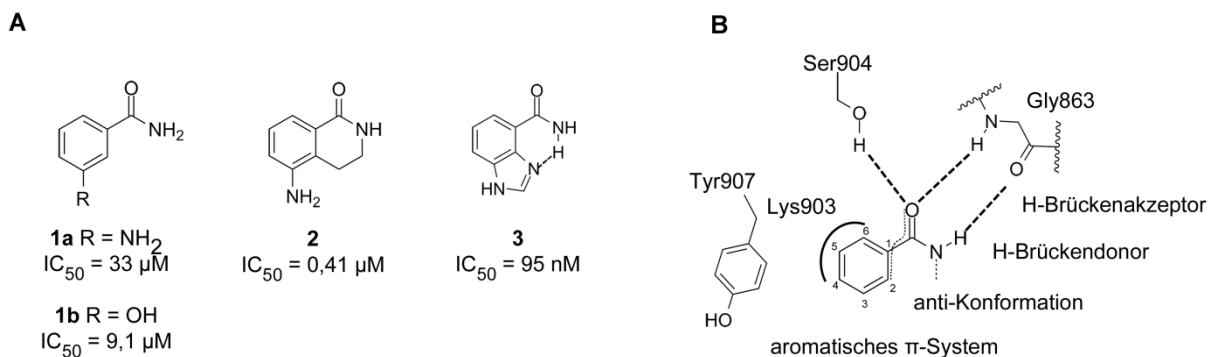


Abbildung 12: Inhibitoren mit geschlossener Amidstruktur (A) und Minimalpharmakophor für HsPARP1 (B)

Nach der Entdeckung von PARP als ein therapeutisches Krebsziel erfolgte eine rasante Entwicklung von Inhibitoren, so dass heute ca. 33 verschiedene Leitstrukturen bekannt sind. Eine ausführliche Beschreibung all dieser Grundgerüste findet sich in Ferraris (2010). Diese umfassen sowohl aromatische als auch gesättigte Chinazolinone (**4,5**), di-, tri- und tetrazyklische Phthalazinone (**6, 7, 8**), tri- und tetrazyklische Phenanthridinone (**9, 10, 11**) als auch Benzimidazol- bzw. Benzoxazolcarboxamide (**12**; Abbildung 13). Neben der Suche nach Leitstrukturen erfolgte auch eine Optimierung der Substitutionsmuster. Dabei wurde nicht nur die enzymatische Aktivität betrachtet, sondern auch die zelluläre Aktivität sowie physikochemische Parameter. Dabei zeigen hauptsächlich Chinazolinone und

Phthalazinone, die in 2- oder 4-Position substituiert sind, eine gute Aktivität im nanomolaren Bereich (Cockcroft *et al.* 2006; Iwashita *et al.* 2005; Loh *et al.* 2005). Vor allem große aromatische Substituenten wirken sich positiv auf die Aktivität aus (Hattori *et al.* 2004), da diese sehr gut mit dem überwiegend hydrophoben Rest der Bindetasche interagieren können.

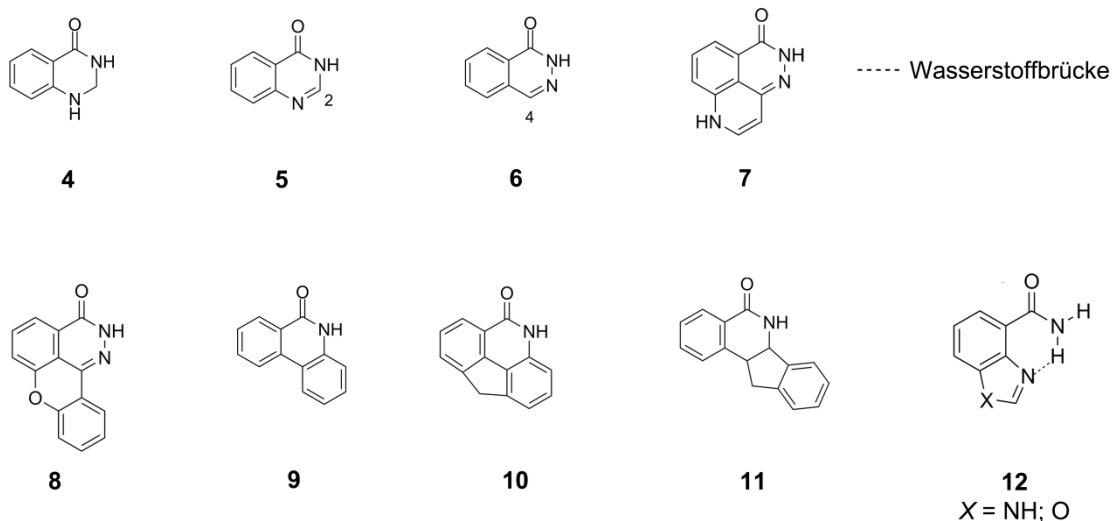


Abbildung 13: Leitstrukturen von HsPARP-1 Inhibitoren, die die Nikotinamidbindestelle nutzen; Daten aus Ferraris *et al.* 2010

Die einzigen bekannten PARP-Inhibitoren, die nicht die Nikotinamidbindestelle des Enzyms besetzen, wurden in der Gruppe von Ernest Kun entdeckt (**13**, **14**; Abbildung 14). Diese nicht-kompetitiven Inhibitoren wirken an der DNA-Bindedomäne und führen zur Dissoziation des essentiellen Zinkatoms vom Rest des Proteins (Buki *et al.* 1991). Hierfür wird der Rest des Arg34 benötigt, was durch Mutagenese-Studien bestätigt wurde (Ferraris 2010). Durch Dissoziation des Zinkatoms verliert PARP die Fähigkeit zur DNA-Bindung, die zu einer Aktivierung notwendig ist. Die zelluläre Wirkung der Substanzen ist jedoch noch nicht vollständig geklärt, da bekannt ist, dass **13** (Abbildung 14) *in vivo* zum Nitrosoderivat reduziert wird (Mendeleyev *et al.* 1995), welches möglicherweise auch zu einer kovalenten Modifikation von PARP führt.

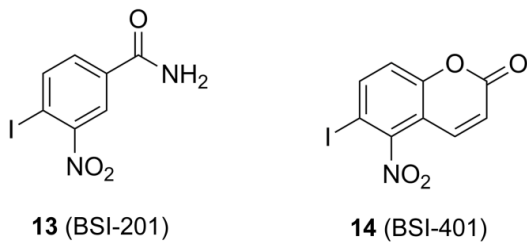


Abbildung 14: HsPARP-1 Inhibitoren, die an der Zn-Finger-Domäne binden

Nach der Induced-Fit Theorie stabilisiert ein Enzym nicht das Substrat, sondern den Übergangszustand der Reaktion (Koshland 1958). Die meisten bisher entwickelten Inhibitoren imitieren jedoch hauptsächlich einen Teil des Substrates NAD⁺. Wie bereits in Abschnitt 1.2.1.1 diskutiert, ist der Mechanismus der PARP-Reaktion nicht eindeutig geklärt. Auf Grundlage der Theorie des S_N1-Mechanismuses wurden die Inhibitoren **15a** und **15b** (Abbildung 15) entwickelt (Zhou *et al.* 2004), die jedoch nur eine schwache Aktivität im mehrstelligen mikromolaren Bereich zeigen. Weiterhin wurden Inhibitoren synthetisiert, die potentiell irreversibel im aktiven Zentrum von PARP binden. Die höchste Aktivität zeigte dabei das Derivat **16**, welches einen Oxiranring besitzt, der potentiell vom Nucleophil angegriffen wird (Watson *et al.* 1998). Um die Theorie einer irreversiblen Inhibition zu bestätigen, werden jedoch enzymkinetische Untersuchungen benötigt.

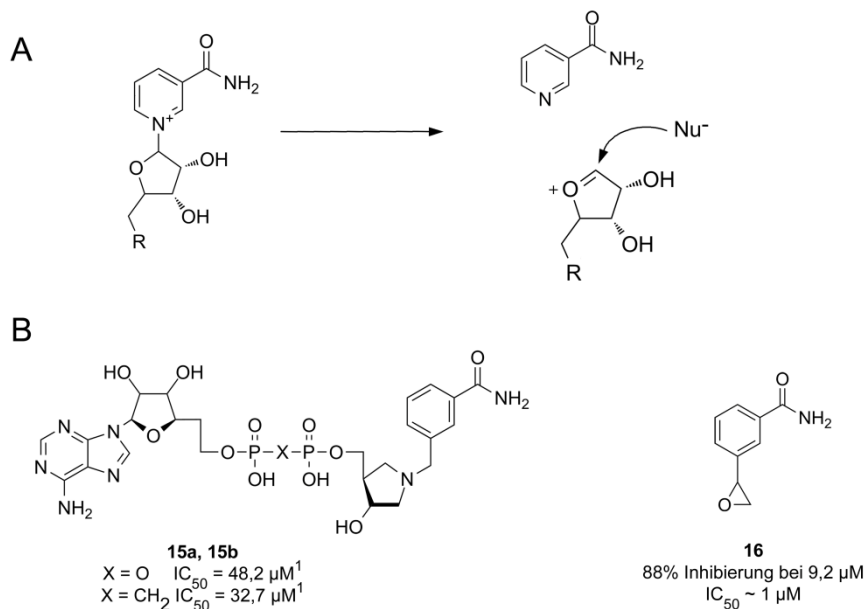


Abbildung 15: Übergangszustandsinhibitoren sowie potentiell irreversible Inhibitoren für HsPARP-1
 A: Darstellung des Übergangszustandes der PARP-Reaktion bei S_N1-Mechanismus;

B: Übergangszustandsinhibitoren (**15a**, **15b**) nach Zhou *et al.* (2004) sowie potentiell irreversibler Inhibitor (**16**) nach Watson *et al.* (1998)¹ gemessen am Diphterientoxin

PARP-Inhibitoren bei Pflanzen

Für pflanzliche Systeme werden Inhibitoren hauptsächlich als Kontrollen für Knockout-Pflanzen verwendet, so dass in der Literatur systematische Untersuchungen zu pflanzlichen PARP-Inhibitoren fehlen. So konnten bisher nur 3-AB (**1a**), 3-Methoxybenzamid sowie Nikotinamid als Inhibitoren für pflanzliche PARPs identifiziert werden (Chen *et al.* 1994; Doucet-Chabeaud *et al.* 2001). Da diese Substanzen jedoch unspezifisch wirken (Grozinger *et al.* 2001), ist es möglich, dass nicht alle Beobachtungen auf eine reine PARP-Inhibierung zurückgeführt werden können. Studien mit PARP-Knockdown-Pflanzen liefern jedoch sehr eingeschränkt brauchbare Informationen, da hier meist nur ein *PARP*-Gen betrachtet wird und eine funktionelle Redundanz der PARPs nicht ausgeschlossen werden kann. Es ist jedoch aufgrund der starken speziesübergreifenden Homologie der PARP-Proteine möglich, dass auch Inhibitoren des humanen PARP-1 an pflanzliche Enzyme binden können, und umgekehrt.

1.3 Zielstellung

Durch den Klimawandel kommt es bereits heute zu kurz- bis mittelfristigen Dürreperioden. Aufgrund von Langzeitprognosen ist zu erwarten, dass diese sowohl an Intensität als auch an Dauer zunehmen werden. Dadurch wird die Pflanzenproduktion weltweit limitiert und es kommt zu erheblichen Ertragseinbußen im Bereich von 50-80 %. Vor dem Hintergrund einer wachsenden Weltbevölkerung sowie sinkender Anbauflächen kommt es daher zwangsläufig zu Lebensmittelpreissteigerungen und Hungersnöten. Da es auch aufgrund des steigenden Trinkwasserbedarfs zunehmend zu einer Verknappung des Rohstoffs Wasser kommen wird, kommt eine verstärkte Bewässerung von Kulturpflanzen selten in Frage. Viele Pflanzen besitzen jedoch noch beträchtliche Ertragsreserven, die aufgrund von Stress nicht ausgeschöpft werden können. Daher führt vor allem eine höhere Stresstoleranz von Pflanzen, insbesondere gegenüber Trockenheit, zu wachsenden Erträgen. Klassische Züchtungsansätze haben gezeigt, dass Trockenstresstoleranz nicht mit einem einzelnen Gen assoziiert ist, was die Erzeugung von trockenstresstoleranten Pflanzen mittels Züchtung sehr aufwändig und arbeitsintensiv macht. Die gezielte Veränderung von trockenstresstoleranzassoziierten Merkmalen durch genetische Modifikation ist in Deutschland immer noch sehr wenig akzeptiert, weshalb dies zumindest derzeit nicht marktkonform ist. Die Nutzung von Substanzen, die regulatorisch auf das Pflanzenwachstum wirken, ist daher eine gute Alternative zur Erhöhung der Trockenstresstoleranz. Eine

systematische Suche nach Substanzen mit dieser Aktivität erfordert robuste Testsysteme, die zur Untersuchung großer Substanzbibliotheken geeignet ist. Bei Ganzpflanzentests wird die Testsubstanz häufig aufgesprüht oder mit dem Gießwasser appliziert. Dies führt dazu, dass große Mengen (mehrere Milligramm) benötigt werden sowie eine konzentrationsabhängige Auswertung nicht möglich ist. Bei Tests an Keimlingen ist eine konzentrationsabhängige Applikation zwar möglich, jedoch besitzen diese Systeme den Nachteil, dass das Entwicklungsstadium der Pflanzen häufig keine Relevanz für die spätere Applikation der Substanz in Feldversuchen hat. Ein Ziel dieser Arbeit war daher, die Entwicklung eines Ganzpflanzentestsystems, welches die konzentrationsabhängige Applikation von Substanzen in geringen Mengen erlaubt und unabhängig von Entwicklungsstadium der Pflanze ist.

Biochemische und zelluläre Testverfahren haben den Vorteil, dass sie nur wenig Zeit sowie geringe Substanzmengen benötigen. Jedoch fehlt bei diesen Assays häufig der Bezug zur Ganzpflanze, so dass bei späterer Testung der Substanz möglicherweise keine Aktivität mehr vorhanden ist. Weiterhin muss immer ein validiertes Targetprotein vorhanden sein. Aus diesem Grund ist es vorteilhaft einen kombinierten Ansatz sowohl aus biochemischen und zellulären Assays als auch *in vivo* Tests an Ganzpflanzen durchzuführen. Es ist bekannt, dass die Anwendung einiger PARP-Inhibitoren zu verbesserter Trockenstresstoleranz führt. Da auch in Pflanzen verschiedene PARP-Isoformen vorhanden sind, ist die Nutzung von Inhibitoren gegenüber einem genetischen Knockout-Ansatz sinnvoll, da so eine mögliche funktionelle Redundanz umgangen werden kann. Daher war ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Etablierung einer Screeningroute zur Identifizierung von Substanzen, die die Trockenstresstoleranz bei Pflanzen erhöhen. Dabei sollen biochemische und zelluläre Assays zur Identifizierung von PARP-Inhibitoren genutzt werden, die nachfolgend im entwickelten Ganzpflanzenassay verifiziert werden sollen. Es wird erwartet, auf diesem Weg Substanzen zu identifizieren, die die Trockenstresstoleranz bei Pflanzen erhöhen, und Einblick in deren Wirkungsweise zu erlangen.

2

Spezieller Teil

2.1 Entwicklung eines Ganzpflanzenassays zur Untersuchung von Trockenstresstoleranz

Zur Untersuchung der pflanzlichen Trockenstresstoleranz wurden bereits viele verschiedene Testverfahren beschrieben (Tabelle 1, Abschnitt 1.1.5). Zur systematischen Suche nach Substanzen, die die Trockenstresstoleranz erhöhen, ist jedoch keines der bisher publizierten Testsysteme geeignet. Daher war eines der Ziele der vorliegenden Arbeit die Entwicklung eines Testsystems, welches folgende Kriterien erfüllt:

- Ganzpflanzentest, der möglichst unabhängig vom Entwicklungsstadium der Pflanze ist
- Möglichkeit der konzentrationsabhängigen Auswertung der Ergebnisse (Dosis-Wirkungs-Effekt)
- reproduzierbare Trockenstressbedingungen
- Verbrauch von geringen Mengen der Testsubstanz
- möglichst kurze Inkubationszeiträume

Für die Entwicklung des Assays wurden als Testorganismen die Wasserlinsen-Arten *Lemna minor* L. (Kleine Wasserlinse) und *Lemna gibba* L. (Buckelige Wasserlinse) ausgewählt. Diese Pflanzen besitzen aufgrund ihrer Lebensweise verschiedene Vorteile. Da sie sich ab einer Tageslänge von 16 h nur noch durch Knospung vermehren, entstehen aus einer Mutterpflanze genetisch identische Klone. Weiterhin knospen diese Klone zu unterschiedlichen Zeitpunkten aus, wodurch sich eine zufällige Verteilung aller Entwicklungsstadien in einer Population ergibt. Mit einer Verdopplungszeit von ca. 55 Stunden sind *Lemna* spp. zudem eine der am schnellsten wachsenden Pflanzenarten. Aufgrund der geringen Größe sowie der Möglichkeit der Kultivierung auf flüssigen und festen Medien ist eine konzentrationsabhängige Applikation der Testsubstanzen im Mikrotiterplattenformat möglich. Weiterhin wurden *Lemna* spp. bereits als Testorganismen für ökotoxikologische Untersuchungen von Substanzen sowie Gewässerproben verwendet (OECD 221, EG 440/2008 C.26, DIN EN ISO 20079). Da es aufgrund der natürlichen Größenvariation der Wasserlinsen nicht möglich ist, bei replikativen Versuchen eine konstante Anfangsmenge an Pflanzenmaterial einzusetzen, wurde die Wachstumsgeschwindigkeit als Vergleichsparameter gewählt. Unter optimalen Bedingungen zeigen *Lemna* spp. kein lineares Wachstum, sondern besitzen ähnlich zum Wachstum von Mikroorganismen eine exponentielle Wachstumsphase. Daher wurde, wie bei ökotoxikologischen Untersuchungen nach DIN EN ISO 20079, die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit μ nach dem Monod-Modell (1949) berechnet. Dieser Wert entspricht dem Anstieg der logarithmierten Fläche der Wasserlinsen, d.h. ein Wert von $0,2 \text{ d}^{-1}$ entspricht einer Steigerung der Fläche der Wasserlinsen um den Faktor $e^{(0,2 \cdot t)}$. Aus der spezifischen Wachstumsrate lassen sich zudem weitere Parameter wie die Verdopplungszeit berechnen. Diese beträgt im Beispiel für eine Wachstumsrate von $\mu = 0,2 \text{ d}^{-1}$ ungefähr 3,5 Tage. Voraussetzung für eine solche Auswertung ist jedoch, dass die Anfangsmenge an Wasserlinsen nicht mit der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit korreliert, was mit Hilfe einer linearen Regressionsanalyse gezeigt werden konnte ($R^2 = 0,09$; Daten nicht gezeigt).

Zur Trockenstresssimulation wurde hochmolekulares Polyethylenglykol (Molekulargewicht = 6000; PEG 6000) verwendet, da diese Substanz eine sehr hohe Wasserlöslichkeit aufweist und als Osmolyt wirkt, wodurch das Wasserpotential der Lösung herabgesetzt wird. PEG 6000 interagiert im Gegensatz zum häufig verwendeten Mannitol nicht mit dem pflanzlichen Metabolismus. Mannitol und andere Zuckeralkohole werden im Vergleich zu PEG 6000 in erheblicher Menge sowohl in den symplastischen als auch in den apoplastischen Raum aufgenommen, wodurch es zu einer Erhöhung des intrazellulären osmotischen Potentials kommt (Hohl und Schopfer 1991). Um jedoch den Realzustand einer

Austrocknung durch Luft zu simulieren, muss diese Aufnahme verhindert werden, damit es zu einer gleichmäßigen Austrocknung des Symplasten und des Apoplasten kommt (Hohl und Schopfer 1991). Daher sind quantitative Aussagen über eine Trockenheitstoleranz mit Mannitol nicht möglich. PEG 6000 hingegen kann aufgrund seines hohen Molekulargewichts weder in die Zellen noch in den intrazellulären Raum aufgenommen werden und kann daher die Effekte von Bodenaustrocknung besser abbilden. Ein weiterer Vorteil von PEG gegenüber Mannitol besteht darin, dass es nicht toxisch für Wurzeln ist (Kopischke 2007). Nachfolgend soll die Optimierung der Assaybedingungen hinsichtlich verschiedener Parameter (Testorganismus, Wachstumsmedium, Trockenstresslevel, Kultivierungsvolumen) detaillierter beschrieben werden.

2.1.1 Optimierung des Wachstumsmediums

Da sowohl *L. gibba* als auch *L. minor* bereits in ökotoxikologischen Testsystemen verwendet wurden, sollte zunächst untersucht werden, welcher Organismus in Kombination mit welchem Medium das beste Wachstum zeigt. Dazu wurden die drei Standardmedien „Swedish Standard medium“ (SIS; DIN EN ISO 20079), AAP-Medium sowie Steinberg-Medium (OECD 221) untersucht. Als Kultivierungszeitraum wurden 7 Tage ausgewählt, analog zur DIN EN ISO 20079, da dieser Zeitraum eine signifikante Unterscheidung zwischen gestressten und ungestressten Pflanzen zulässt. Da sowohl *L. gibba* als auch *L. minor* die höchsten spezifischen Wachstumsgeschwindigkeiten in Steinberg Medium aufwiesen (Abbildung 16), wurde dieses Medium für alle weiteren Tests ausgewählt.

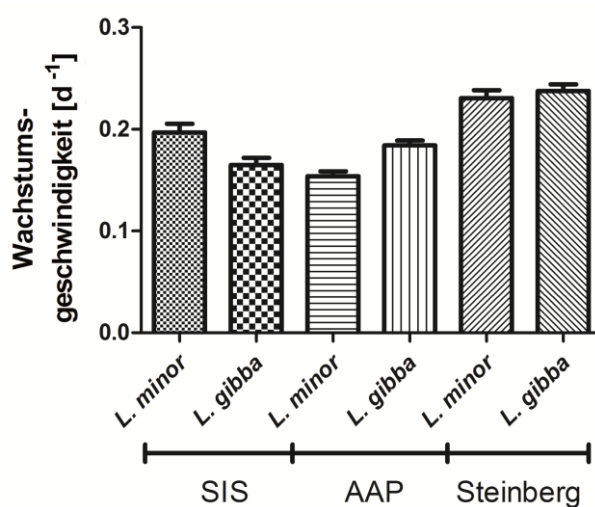


Abbildung 16: spezifische Wachstumsgeschwindigkeiten der Wasserlinsen *Lemna gibba* und *Lemna minor* in verschiedenen Medien über 7 Tage, ausgehend von 2 - 3-sprossigen Pflanzen; Daten repräsentieren Mittelwerte ± Standardfehler

2.1.2 Optimierung der Osmolytenkonzentration

Je nach Intensität des Trockenstresses treten verschiedene Reaktionen der Pflanze auf, welche zur Auswertung genutzt werden können. So werden Bioassays in der Literatur beschrieben, bei denen die Überlebensfähigkeit der Pflanzen unter starkem Trockenstress untersucht wird (Maruyama *et al.* 2008; Mckersie *et al.* 2000). Ziel des hier beschriebenen Tests war jedoch, Substanzen zu identifizieren, die die Vitalität bzw. das Wachstum von Pflanzen unter schwachem Trockenstress bzw. bei kurzen Trockenheitsperioden verbessern. Daher sollte zunächst untersucht werden, bei welcher „Trockenstress-Dosis“ bzw. PEG 6000-Konzentration eine ausreichende Differenzierung zwischen gestressten und nicht gestressten Pflanzen zu beobachten ist (dynamischer Bereich), jedoch keine Chlorosen bzw. Nekrosen der gestressten Pflanzen auftreten. Um eine Vergleichbarkeit der erhaltenen Werte mit Literaturdaten zu gewährleisten, wurde das Wasserpotential des umgebenden Mediums als beschreibender Parameter für Trockenstress ausgewählt.

Dabei zeigte sich erwartungsgemäß sowohl für *L. gibba* als auch *L. minor* eine sinkende Wachstumsgeschwindigkeit bei steigender PEG-Konzentration / steigendem Trockenstress (Abbildung 17). Für alle weiteren Untersuchungen wurde ein Wasserpotential von -0,3 MPa ausgewählt. Hier konnte der größte dynamische Bereich erzielt werden (Abbildung 17), ohne dass sich nekrotische Läsionen bildeten, welche ab einem Wasserpotential von -0,4 MPa zu beobachten waren (Daten nicht gezeigt).

Grundsätzlich sind sowohl *L. minor* als auch *L. gibba* für die Untersuchung der Trockenstresstoleranz geeignet. Bei den Messungen mit *L. minor* traten jedoch geringere Standardfehler bzgl. der Wachstumsgeschwindigkeit auf, weshalb diese Pflanzenart für alle weiteren Untersuchungen verwendet wurde.

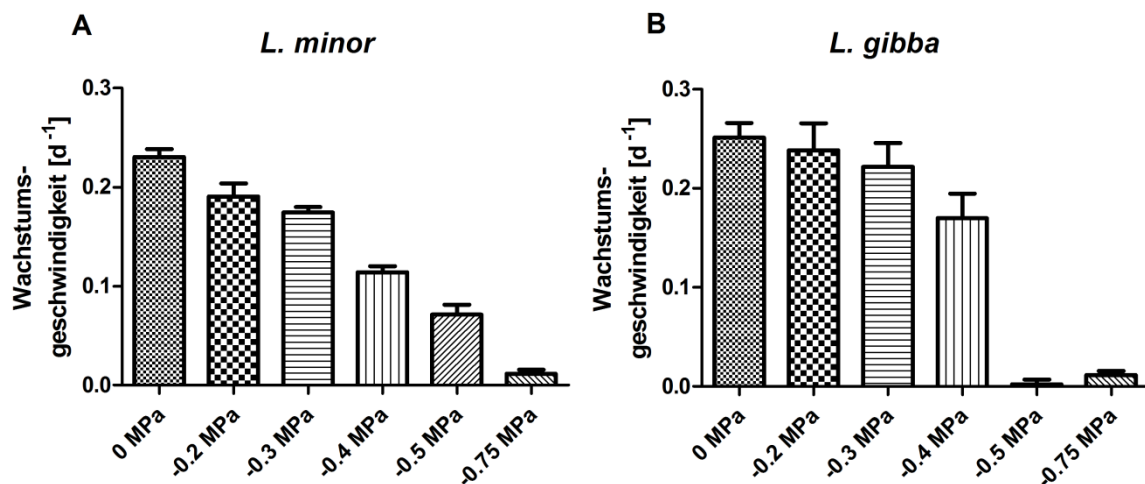


Abbildung 17: Untersuchung der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeiten von *L. minor* (A) und *L. gibba* (B) bei verschiedenen Wasserpotentialen des Mediums über 7 Tage, ausgehend von 2 - 3-sprossigen Pflanzen; Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardfehler

2.1.3 Optimierung des Kulturvolumens

Da sowohl für das Pflanzenwachstum, den Probendurchsatz des Assays als auch für die benötigten Probenmengen maßgebend war, in welchem Volumen der Test stattfinden sollte, wurden verschiedene Mikrotiterplatten mit 6 (\varnothing 33 mm; 10 mL), 12 (\varnothing 23 mm; 5 mL), 24 (\varnothing 16 mm; 2 mL) und 48 (\varnothing 11 mm; 1 mL) Kavitäten untersucht. Aufgrund des sehr geringen Durchmessers von nur 7 mm wurden 96-Well-Platten von Beginn an ausgeschlossen, da hier nur ca. eine Pflanze mit 3 Sprossgliedern Platz gefunden hätte. Zur Überprüfung, dass die Pflanzen nicht durch Nährstoff- oder Platzmangel gestresst waren, wurden die erhaltenen Wachstumsgeschwindigkeiten mit einem Kontrollexperiment verglichen, welches analog zur DIN EN ISO 20079 in mit 300 mL Medium gefüllten 400 mL-Bechergläsern durchgeführt wurde (Abbildung 18). Weiterhin wurde darauf geachtet, dass die Pflanzen bis zum Ende der Kultivierungsperiode nicht an die Ränder der Kavitäten stoßen. Dabei konnte gezeigt werden, dass bei den Mikrotiterplatten mit 6, 12 sowie 24 Kavitäten keine Unterschiede zur standardmäßigen Kultivierung in Bechergläsern auftraten (Abbildung 18). Nur bei Mikrotiterplatten mit 48 Kavitäten konnte eine Wachstumsinhibierung beobachtet werden. Dies ist möglicherweise auf einen Nährstoffmangel zurückzuführen, da den Pflanzen nur 1 mL Medium zur Verfügung stand. Da ein möglichst kleinstmengenfähiger Assay entwickelt werden sollte, wurden im Folgenden ausschließlich Mikrotiterplatten mit 24 Kavitäten verwendet.

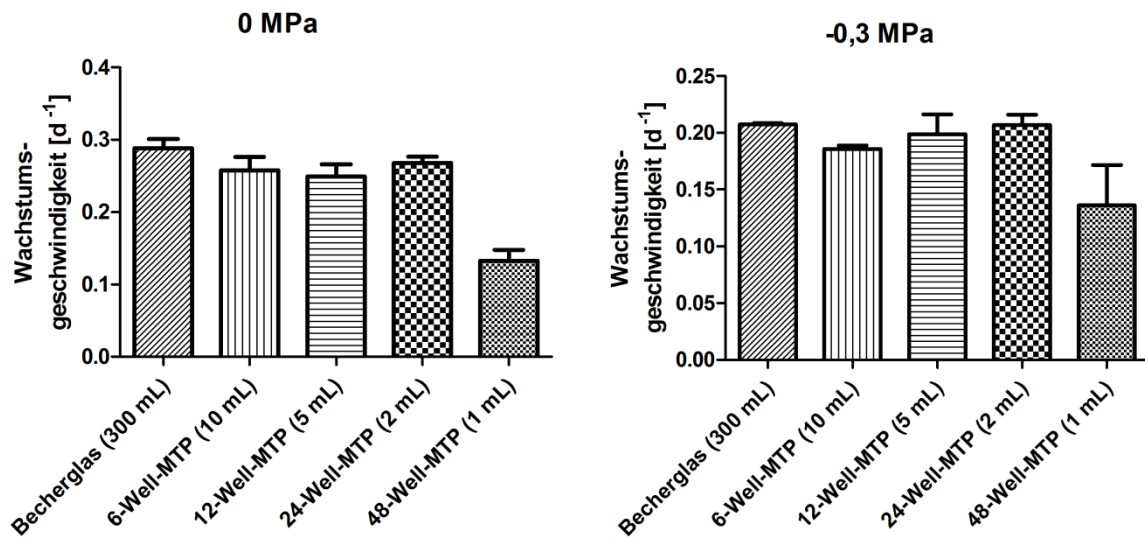


Abbildung 18: Wachstumsgeschwindigkeiten von *L. minor* Pflanzen unter ungestressten Bedingungen (A) sowie unter Trockenstress (B) in verschiedenen Mikrotiterplatten (MTP) sowie in Bechergläsern über 7 Tage, ausgehend von 2 - 3-sprossigen Pflanzen; Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardfehler; Werte in Klammern bezeichnen das Kulturvolumen

2.1.4 Untersuchung von Substanzbibliotheken

Vor der Untersuchung von Substanzen wurde die Toleranz der Wasserlinsen gegenüber verschiedenen Lösungsmitteln untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass Alkohole, wie Ethanol oder Methanol selbst bei einer Konzentration von 1 % (v/v) zu einer starken Wachstumsinhibierung führen. Die niedrigste Toxizität zeigte sich bei Dimethylsulfoxid (DMSO). Hier konnten bei einer Konzentration 1 % (v/v) keine Unterschiede zur Kontrolle festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der guten Lösungseigenschaften sowie der niedrigen Toxizität wurde DMSO für alle weiteren Untersuchungen in einer Konzentration von 1 % (v/v) eingesetzt.

Um Verbindungen zu identifizieren, die die Trockenstresstoleranz der Wasserlinsen erhöhen, wurde für 92 Substanzen (Konzentration jeweils 10 μ M) die Wirkung auf das Wasserlinsenwachstum untersucht. Diese Konzentration wurde ausgewählt, da bei Applikation höherer Konzentrationen die Wahrscheinlichkeit für eine unspezifische Proteinbindung bzw. sekundäre Effekte allgemein ansteigt. Eine detaillierte Auflistung der untersuchten Substanzen befindet sich im Anhang (Tabelle A.1). Die getestete Substanzbibliothek bestand aus 48 bekannten Agrochemikalien (Tomlin 1995) sowie 44 Substanzen, die eine Nikotinamid- bzw. Benzamid-ähnliche Struktur aufweisen.

Die meisten der getesteten Substanzen konnten keine positiven Effekte auf die Trockenstresstoleranz der Wasserlinsen bewirken. Vielmehr zeigten viele der Substanzen

wachstumshemmende bzw. toxische Effekte (Daten nicht gezeigt). Dies war vor allem bei Cyclosulfamuron (Abbildung 17; **17**) stark ausgeprägt, was vermutlich auf die für diese Substanz beschriebene Herbizid-Wirkung zurückzuführen ist (Tomlin 1995).

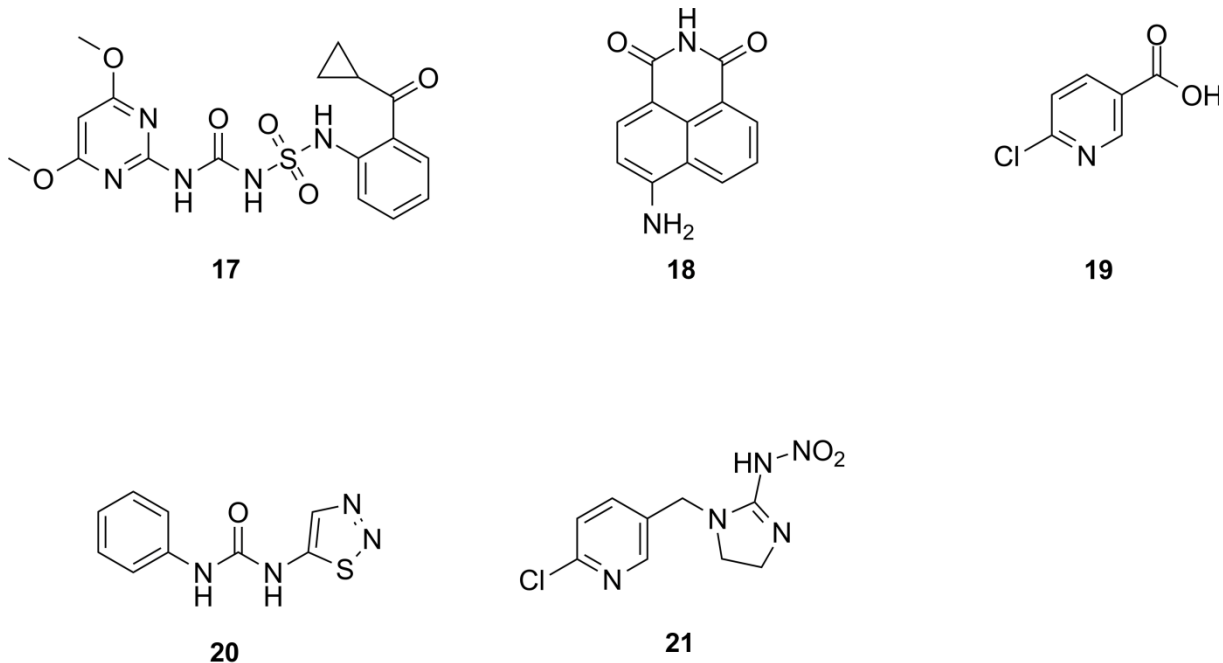


Abbildung 19: Strukturformeln von Cyclosulfamuron (**17**), 4-Amino-1,8-naphtalimid (**18**), 6-Chloronikotinsäure (**19**), Thidiazuron (**20**) Imidacloprid (**21**)

Es zeigte sich jedoch, dass die Substanzen 4-Amino-1,8-naphtalimid (**18**, 4-ANI), 6-Chloronikotinsäure (**19**, 6-CNA) sowie der Pflanzenwachstumsregulator Thidiazuron (**20**) eine positive Wirkung auf das Wachstum der Wasserlinsen unter Trockenstress besaßen. Daher wurde die Konzentrationsabhängigkeit dieser Wirkung näher untersucht.

Dabei konnte für **18** festgestellt werden, dass sowohl bei Konzentrationen von 1 bzw. 10 μM das Wachstum der Wasserlinsen unter Trockenstress signifikant um 12,6 % bzw. 16,3 % erhöht wird (Abbildung 20 A). Unter Normalbedingungen konnten keine wachstumssteigernden oder -hemmenden Effekte festgestellt werden (Abbildung 20 B), was darauf schließen lässt, dass es sich um einen spezifischen Effekt handelt. Da **18** als Inhibitor des *Hs*PARP-1 bekannt ist (De Block *et al.* 2005), war zu vermuten, dass diese Substanz auch die PARP-Aktivität der Wasserlinsen inhibiert und somit eine höhere Trockenstresstoleranz erzeugt wird.

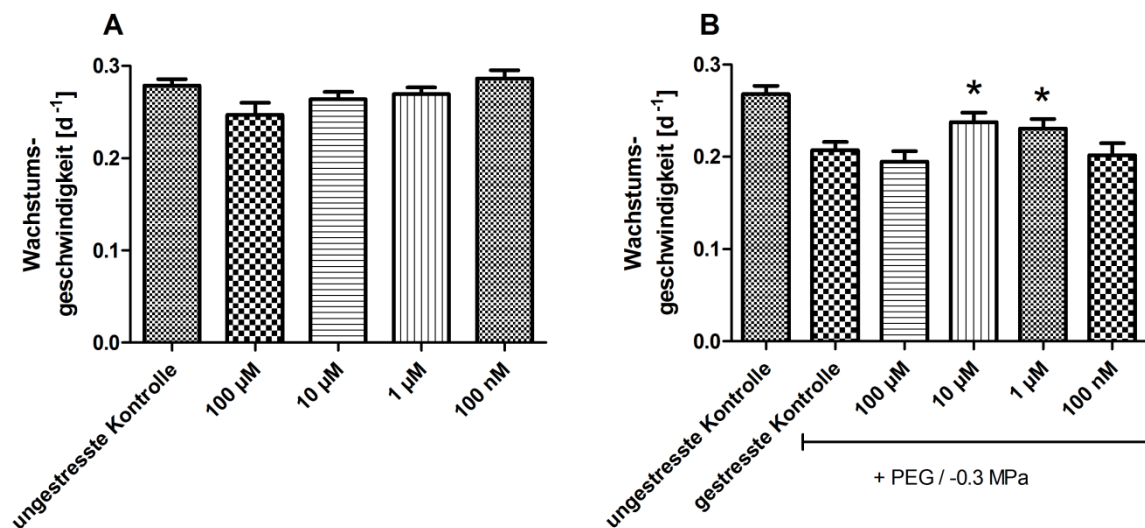


Abbildung 20: Wachstumsgeschwindigkeiten von *L. minor* unter Normalbedingungen (A) oder unter Trockenstress (B) bei verschiedenen Konzentrationen an 4-Amino-1,8-naphthalimid (**18**) über 7 Tage, ausgehend von 2 - 3-sprossigen Pflanzen; Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardfehler; * bezeichnen statistisch signifikante Unterschiede zur gestressten Kontrolle ($\alpha \leq 0,05$)

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der bekannte Pflanzenwachstumsregulator **20** eine positive Wirkung auf das Wasserlinsenwachstum unter Trockenstress besitzt. Dabei konnten sogar Wachstumsgeschwindigkeiten wie sie für die ungestresste Kontrolle beobachtet wurden, nachgewiesen werden (Abbildung 21). Diese Wirkung ist jedoch nicht überraschend, da **20** als Analogon von Benzyladenin, einem natürlichen Cytokinin wirkt. Als Pflanzenhormone wirken sich Cytokinine im Allgemeinen fördernd auf das Streckungswachstum sowie die Zellteilung aus. Weiterhin ist für Cytokinine auch eine positive Wirkung auf die Trockenstresstoleranz beschrieben (Monakhova und Chernyad'ev 2007). Damit validiert die Identifikation von **20** als hormonmimetische Trockenstresstoleranz-induzierende Substanz das entwickelte Testsystem.

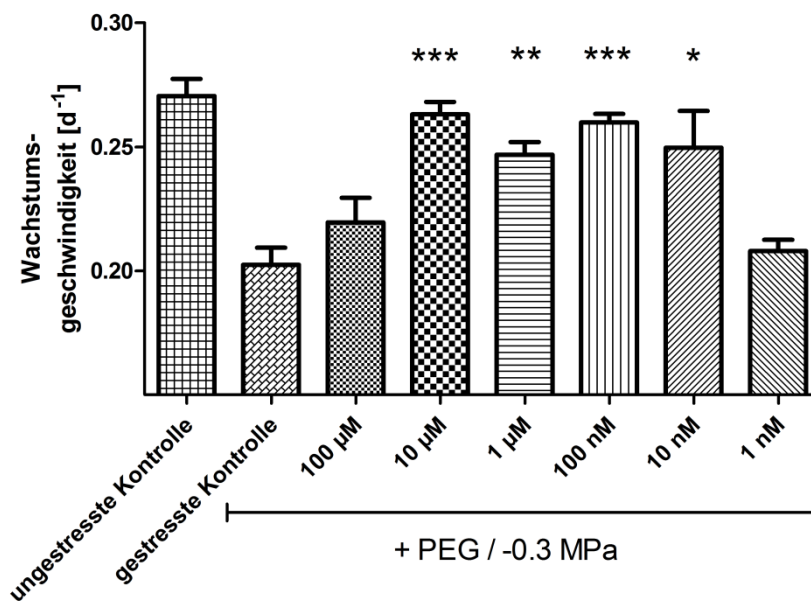


Abbildung 21: Wachstumsgeschwindigkeiten von *L. minor* unter Trockenstress bei verschiedenen Konzentrationen Thidiazuron (**20**) über 7 Tage, ausgehend von 2 - 3-sprossigen Pflanzen; Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardfehler; * bezeichnen statistisch signifikante Unterschiede zur gestressten Kontrolle (* $\alpha \leq 0,05$; ** $\alpha \leq 0,01$; *** $\alpha \leq 0,001$)

Untersuchung von Nikotinsäurederivaten

Weiterhin wurde das Insektizid Imidacloprid (**21**) untersucht, von dem bekannt ist, dass es die Trockenstresstoleranz im Feld verbessert (Thielert 2006). Für diese Substanz konnte jedoch kein wachstumssteigernder Effekt im Wasserlinsen-Assay nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigte jedoch eines der Hauptabbauprodukte von Imidacloprid (**21**), 6-Chlornikotinsäure (**19**), eine Erhöhung der Trockenstresstoleranz bei Wasserlinsen (Abbildung 22). In der Literatur wird diskutiert, dass nicht Imidacloprid (**21**) selbst eine wuchsfördernde Aktivität besitzt, sondern **19**. Da der relativ langsame Abbau von Imidacloprid zu **19** nicht innerhalb des Testzeitraumes von 7 Tagen stattfindet (Rouchaud *et al.* 1996), stützen die erhaltenen Ergebnisse diese Hypothese. Die Aktivität von **19** ist jedoch als geringer einzuschätzen als die von **18**, da nur bei 100 µM eine Steigerung des Wachstums um 13,6 % erreicht werden konnte. Eine Testung höherer Konzentrationen von **19** war jedoch nicht möglich, da dies zu Chlorosen führte. Der wachstumsverstärkende Effekt von **19** konnte weiterhin auch unter Normalbedingungen nachgewiesen werden, unter denen kein Trockenstress vorlag (Abbildung 22). Hier konnte das Wachstum um 9,6 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gesteigert werden.

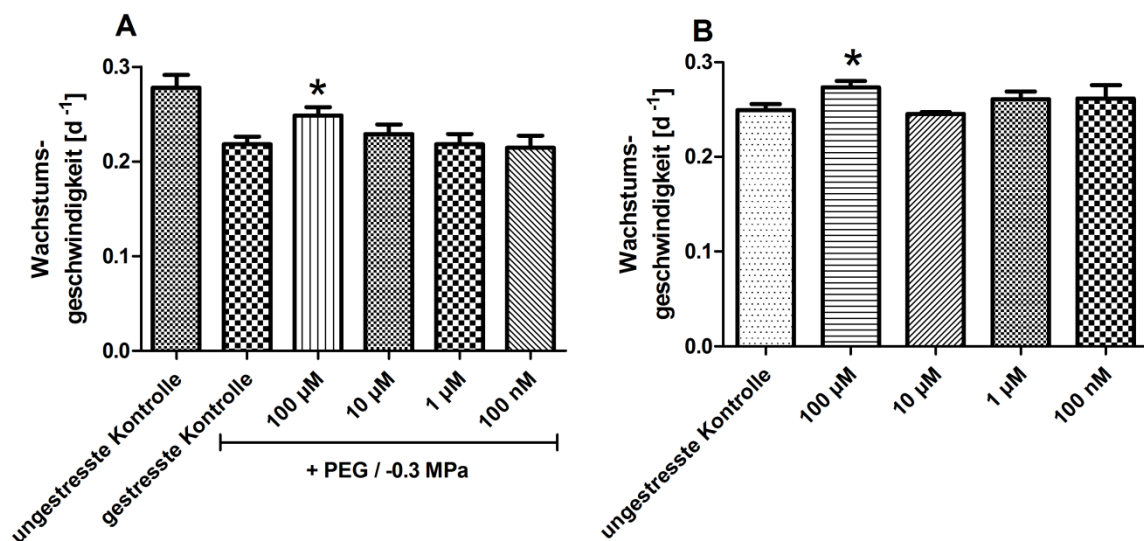


Abbildung 22: Wachstumsgeschwindigkeiten von *L. minor* unter Trockenstress (A) oder unter Normalbedingungen (B) bei verschiedenen Konzentrationen 6-Chlornikotinsäure (**19**) über 7 Tage, ausgehend von 2 - 3-sprossigen Pflanzen; Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardfehler; * bezeichnen statistisch signifikante Unterschiede zur gestressten Kontrolle ($\alpha \leq 0,05$)

Es ist zu vermuten, dass **19** als Analogon von Nikotinsäure (**22**, Vitamin B₃) wirken kann und somit den Nikotinsäurepool der Zelle erhöht. Dies könnte zu einer verstärkten Bildung von NAD⁺ führen, welches bei Trockenstress vermehrt durch eine PARP-Überaktivierung verbraucht wird. Um diese Theorie zu unterstützen, wurden **22** sowie Nikotinamid (**23**) im Lemna-Test auf ihre Aktivität untersucht, um Hinweise zu erhalten, ob die Wachstumssteigerung von **19** auf spezifische Trockenstress- oder eher unspezifische Vitamineffekte zurückzuführen ist.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl **22** als auch **23** zu einer Erhöhung des Wasserlinsenwachstums unter Trockenstress führen (Abbildung 23). Da diese Wachstumssteigerung auch unter Normalbedingungen zu beobachten war, kann daraus abgeleitet werden, dass die Wirkung dieser Substanzen eher auf einen Vitamineffekt als auf einen spezifischen Effekt in Bezug auf Trockenstress zurückzuführen ist. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von **19** zu **22** und **23** ist zu vermuten, dass auch die Wirkung von **19** ebenfalls unspezifischen Charakter besitzt.

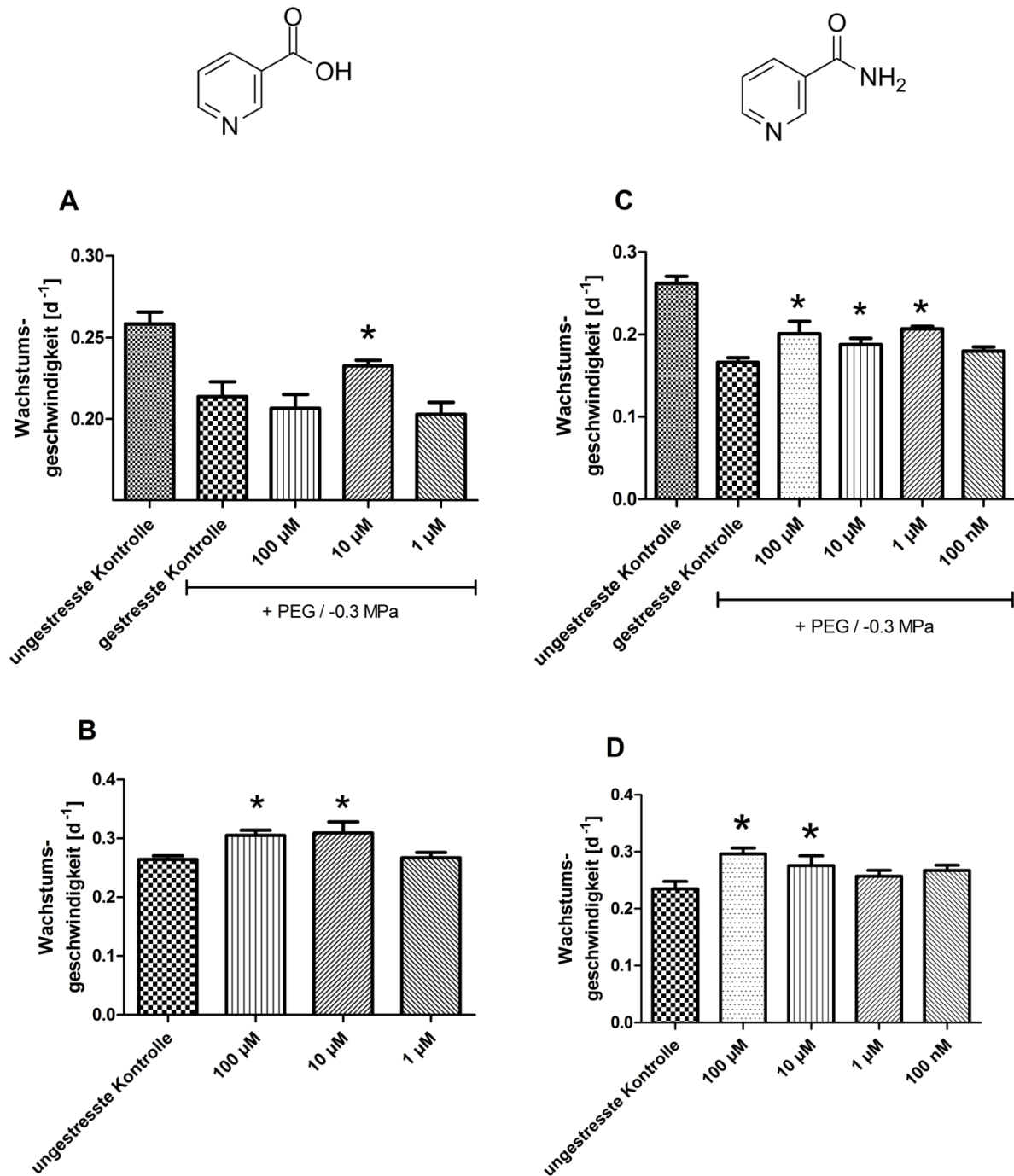


Abbildung 23: Wachstumsgeschwindigkeiten von *L. minor* unter Normalbedingungen (B,D) oder unter Trockenstress (A,C) bei verschiedenen Konzentrationen Nikotinsäure (22; A,B) bzw. Nikotinamid (23; C,D) über 7 Tage, ausgehend von 2-3-sprossigen Pflanzen; Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardfehler; * bezeichnen statistisch signifikante Unterschiede zur gestressten Kontrolle ($\alpha \leq 0,05$)

2.2 Validierung des entwickelten Assays

2.2.1 Pflanzenzellassay

Primäre Stressfaktoren, die durch biotische sowie abiotische Umwelteinflüsse entstehen, verursachen *in planta* häufig sekundäre oxidative Stressphänomene. Bei Trockenstress geschieht dies zum Beispiel durch eine gesteigerte Atmung, wodurch mehr ROS als unter Normalbedingungen gebildet werden (De Block *et al.* 2005). Deshalb wurde zunächst ein *in vitro* Pflanzenzell-basierter Assay (Levine *et al.* 1994) ausgewählt, um diese Effekte für die im entwickelten Lemna-Test identifizierten Substanzen zu bestätigen. Dabei wurde untersucht, inwieweit die Substanzen **18** und **19** in der Lage waren, den durch oxidativen Stress hervorgerufenen Zelltod in *A. thaliana*-Zellkulturen zu verhindern. Hierzu wurde die Aufnahmekapazität der Zellen für den Farbstoff Evans Blue bestimmt, welcher nur in tote Zellen eindringen kann. Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl **18** (-20 %) als auch **19** (-38 %) bei einer Konzentration von 10 μM (Abbildung 24) in der Lage sind, den induzierten Zelltod von *A. thaliana*-Zellen zu verringern. Da sowohl in diesem Test als auch im Lemna-Test eine positive Wirkung der Substanzen **18** und **19** bzgl. der Toleranz gegenüber oxidativen sowie Trockenstress nachgewiesen werden konnte, validieren diese Resultate die Aktivität von **18** und **19** als Trockenstresstoleranz-induzierende Substanzen.

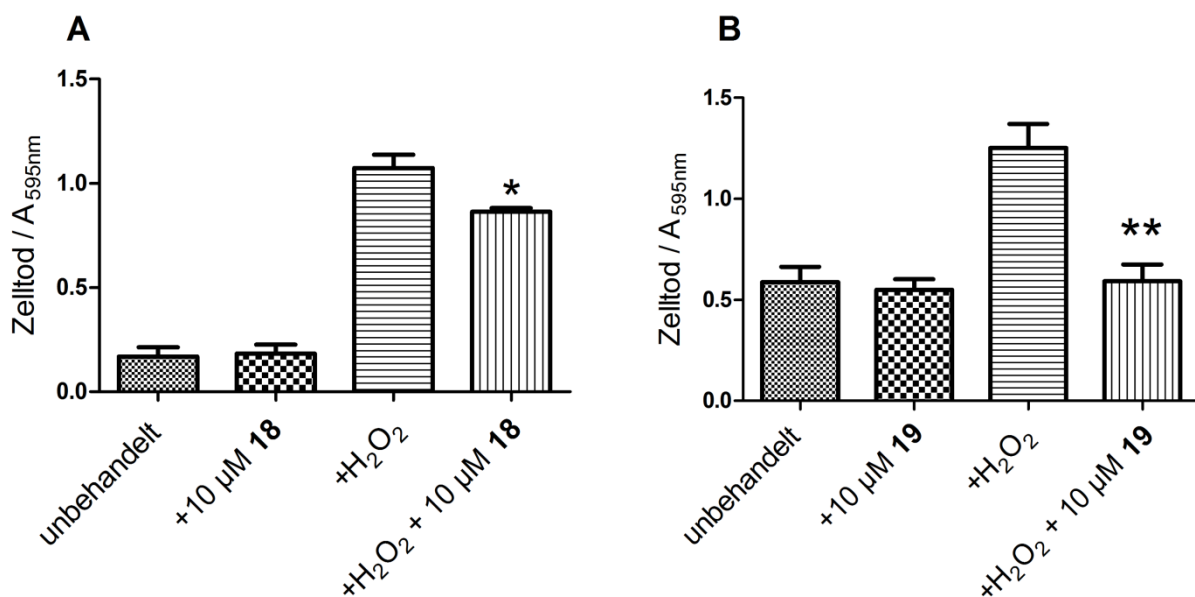


Abbildung 24: Durch oxidativen Stress verursachter Zelltod von *A. thaliana*-Zellen, welche in Gegenwart von 10 μM 4-Amino-1,8-naphthalimid (**18**; A) oder 6-Chlornikotinsäure (**19**; B) kultiviert wurden; gemessene Absorptionen des Farbstoffes Evans Blue repräsentieren Mittelwerte \pm Standardfehler; * bezeichnen statistisch signifikante Unterschiede zur H₂O₂-behandelten Kontrolle (* $\alpha \leq 0,05$; ** $\alpha \leq 0,01$)

2.2.2 Wurzelkrümmungsassay

Zur weiteren Validierung des entwickelten Assays und um zu überprüfen, ob die erhaltenen Ergebnisse auch auf andere Ganzpflanzensysteme übertragbar sind, wurden die Substanzen **18** und **19** in einem Geotropismusassay nach Maruyama (2008) untersucht. Es ist bekannt, dass sich Trockenstress auf die Vitalität von Pflanzen auswirkt. So ist zum Beispiel das Wachstumsverhalten der Pflanzen bei Lageveränderung beeinträchtigt. Vitale Pflanzen reagieren bei Lageveränderung mit einer Wurzelkrümmung, da sie sich entsprechend der Gravitation ausrichten. Gestresste Pflanzen zeigen diesen Effekt des Geotropismus nicht oder nur in vermindertem Ausmaß. Daher ist es möglich, durch Wurzelkrümmungsversuche auf die Vitalität bzw. auf die Trockenstresstoleranz der untersuchten Pflanzen zu schließen. In solch einem Assay wurde daher erneut der Effekt von **18** und **19** auf *A. thaliana*-Pflanzen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass unter Trockenstress durch die Behandlung mit den Substanzen ein deutlich höherer Anteil der Pflanzen eine Wurzelkrümmung im Vergleich zur gestressten Kontrolle aufweist (Abbildung 25). Diese Ergebnisse belegen, dass auch in diesem Assay die Substanzen **18** und **19** zu einer Verbesserung der Trockenstresstoleranz beitragen und somit die Ergebnisse des Lemna-Assays auch auf andere Testsysteme übertragbar sind.

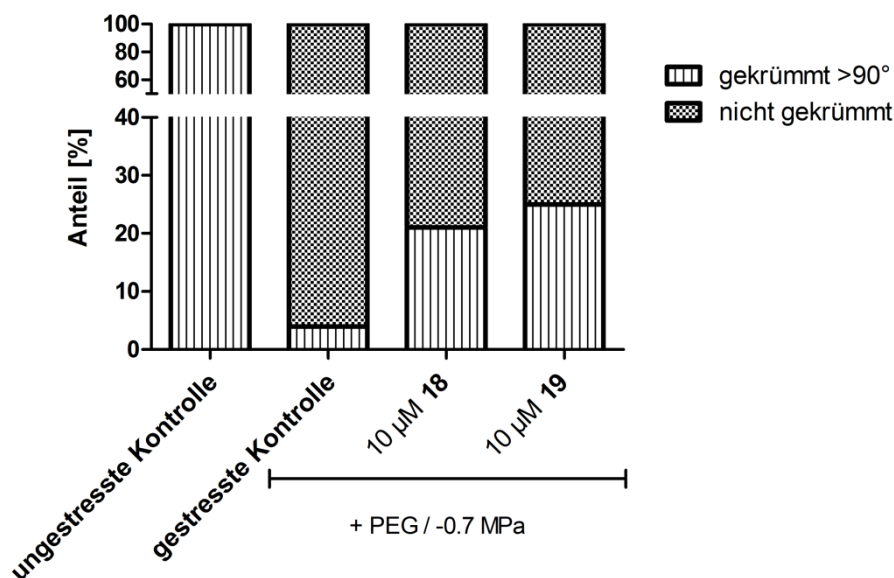


Abbildung 25: Wurzelkrümmungsassay: Anteil von *A. thaliana*-Pflanzen, die unter Trockenstress (-0,7 MPa) sowie bei Behandlung mit den Substanzen 4-Amino-1,8-naphthalimid (**18**) oder 6-Chlornikotinsäure (**19**) eine Wurzelkrümmung nach Lageänderung (180°) zeigen; Daten repräsentieren Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten mit je 24 Pflanzen

2.2.3 Untersuchung der Übertragbarkeit auf Landpflanzen

Da bei dem entwickelten Lemna-Assaysystem ein ökonomisch nicht relevanter Modellorganismus verwendet wird, wurde die Fragestellung untersucht, ob die erhaltenen Ergebnisse auch auf andere Pflanzen übertragbar sind. Dazu wurden im Lemna-Assaysystem Trockenstress-Biomarker untersucht, die in Nutzpflanzen unter Trockenstress Konzentrationsveränderungen zeigen. Um eine möglichst breite Übertragbarkeit zu gewährleisten, wurden nur Bioindikatoren untersucht, von denen bekannt ist, dass sie in nahezu allen Kulturpflanzen unter Trockenstress akkumulieren bzw. erniedrigt sind.

Es ist bekannt, dass die intrazelluläre Prolinkonzentration von vielen Nutzpflanzen (Weizen, Reis, Tomate, Sojabohne, Gerste, Tabak, Spinat, Kartoffel) unter Trockenstress stark erhöht ist (Delauney und Verma 1993). Daher wurde dieser Parameter für die Untersuchung im entwickelten Lemna-Assaysystem ausgewählt. Für das Frischgewicht, welches zur Normalisierung des L-Prolingehaltes bestimmt wurde, konnte keine signifikante Änderung gezeigt werden (Abbildung 26 A). Jedoch zeigten die Lemna-Pflanzen unter Trockenstress einen stark erhöhten Gehalt an L-Prolin (Abbildung 26 A). Daher ist dieser Parameter für eine weitere Charakterisierung von Wasserlinsen unter Trockenstress geeignet und bestätigt das etablierte Modellsystem.

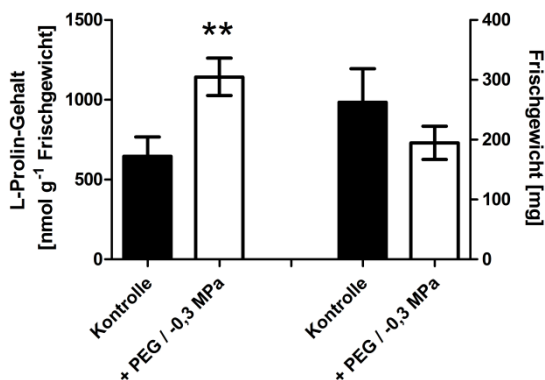


Abbildung 26: Bestimmung des Prolingehaltes: L-Prolingehalt (links) bzw. Frischgewicht (rechts) von *L. minor* unter Trockenstress (-0,3 MPa) bzw. Normalbedingungen; Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung; ** bezeichnen statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrolle ($\alpha \leq 0,01$)

Weiterhin ist bekannt, dass viele Pflanzen unter Trockenstress eine erniedrigte Photosyntheseleistung aufweisen, was auch auf einen geringeren Chlorophyllgehalt zurückzuführen ist (Farooq *et al.* 2009). Um dies auch für Lemna-Pflanzen zu untersuchen, wurden die Gehalte an Chlorophyll a, b sowie der Gesamtchlorophyllgehalt photometrisch bestimmt. Auch bei *L. minor* zeigt dieser Biomarker eine signifikante Reduktion unter

Trockenstress im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 27). Um den Mechanismus der durch **18** induzierten erhöhten Trockenstresstoleranz näher zu untersuchen, wurde der Chlorophyllgehalt unter Trockenstress bzw. unter Normalbedingungen auch für Lemna-Pflanzen bestimmt, welche mit 10 μM der Substanz **18** behandelt worden waren. Dabei konnten jedoch keine Veränderungen im Chlorophyllgehalt festgestellt werden (Abbildung 27), was darauf schließen lässt, dass dieser Parameter nicht durch die Substanz **18** beeinflusst wird.

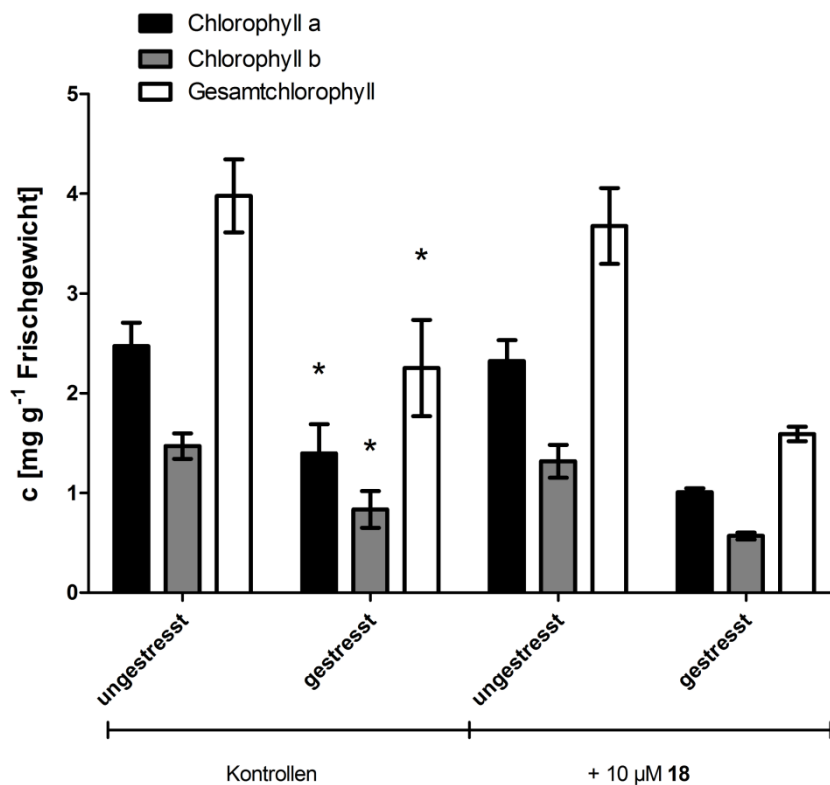


Abbildung 27: Bestimmung des Chlorophyllgehaltes: Chlorophyllgehalte von *L. minor* Pflanzen unter Trockenstress bzw. Normalbedingungen, welche über 7 Tage mit 10 μM 4-Amino-1,8-naphtalimid (**18**) behandelt wurden; Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardfehler; * bezeichnen statistisch signifikante Unterschiede zur ungestressten Kontrolle ($\alpha \leq 0,05$)

Aufgrund des erhöhten Levels an oxidativem Stress, werden in Pflanzen unter Trockenstress vermehrt antioxidativ wirkende Substanzen wie Ascorbat und Glutathion gebildet (Foyer und Noctor 2011). Daher wurden die Gehalte an Ascorbat und Glutathion, jeweils in der reduzierten und oxidierten Form, im etablierten Modellsystem untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl der Ascorbatgehalt als auch der Gesamtascorbatgehalt gegenüber der ungestressten Kontrolle signifikant erhöht sind (Abbildung 28). Für Dehydroascorbat konnte weder durch Trockenstress noch nach Behandlung mit **18** eine signifikante Veränderung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Ähnliche Ergebnisse wurden auch für den Glutathiongehalt erzielt, wobei hier

sowohl für die reduzierte als auch die oxidierte Form und den Gesamtgehalt ein Anstieg unter Trockenstress gezeigt werden konnte (Abbildung 29). Bei der Akkumulation von antioxidativ wirksamen Substanzen handelt es sich vermutlich auch bei *L. minor* um eine Anpassungsreaktion an einen gesteigerten oxidativen Stresslevel. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass im entwickelten Lemna-System die Trockenstressbiomarker Prolin-, Chlorophyll-, Ascorbat- sowie Glutathiongehalt in gleicher Art verändert sind, wie es für Nutzpflanzen bekannt ist. Daher ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse vom Trockenstressmodellsystem Lemna auf Nutzpflanzen wahrscheinlich.

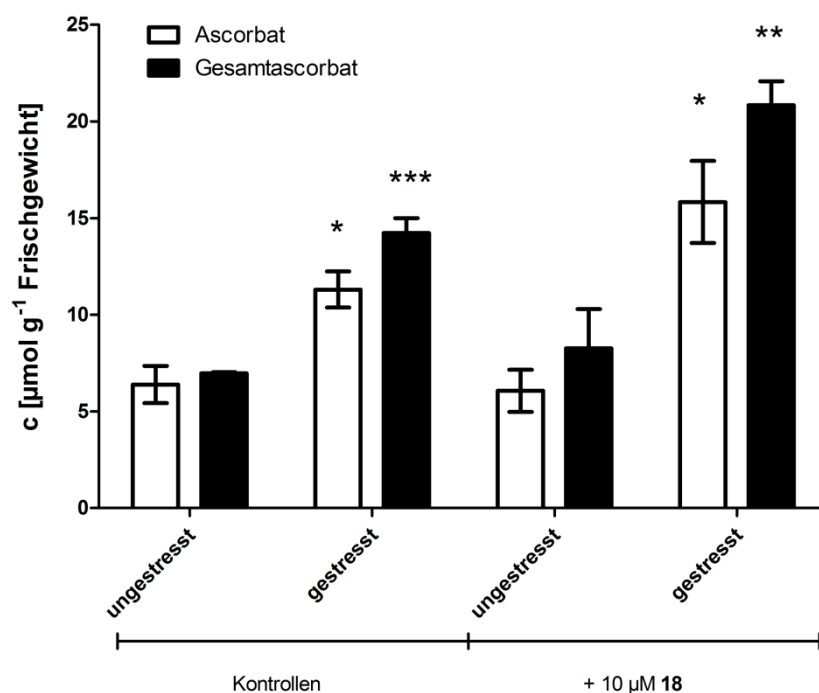


Abbildung 28: Bestimmung des Ascorbatgehaltes: Ascorbatgehalt von *L. minor* Pflanzen unter Trockenstress bzw. Normalbedingungen, welche über 7 Tage mit 10 μM 4-Amino-1,8-naphtalimid (**18**) behandelt wurden; Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardfehler; * bezeichnen statistisch signifikante Unterschiede zur ungestressten bzw. unbehandelten Kontrolle (* $\alpha \leq 0,05$; ** $\alpha \leq 0,01$; *** $\alpha \leq 0,001$)

Um den Wirkmechanismus der Substanz **18** zu charakterisieren, wurde analog zum Chlorophyllgehalt die Wirkung der Substanz auf den Glutathion- sowie Ascorbatgehalt untersucht. Im Gegensatz zum Glutathiongehalt (Abbildung 29) zeigten die Pflanzen, die unter Trockenstress mit **18** behandelt wurden, einen sehr starken Anstieg des Ascorbat- sowie Gesamtascorbatgehaltes. Hier konnte eine signifikante Steigerung im Vergleich zur gestressten Kontrolle nachgewiesen werden (Abbildung 28). Unter Normalbedingungen waren jedoch keine signifikanten Unterschiede sowohl beim Ascorbat- als auch beim Glutathiongehalt zu beobachten. Es ist zu vermuten, dass die Zugabe von **18** eine

beschleunigte Stressantwort bewirkt, die zu einem erhöhten Level an Antioxidantien führt und dadurch die Widerstandsfähigkeit der Pflanze erhöht, was gleichzeitig das verstärkte Wachstum der Pflanzen erklärt. Interessant ist jedoch, dass der gesteigerte Ascorbatgehalt scheinbar unabhängig vom Glutathiongehalt ist. Diese Tatsache legt die Schlussfolgerung nahe, dass durch eine Behandlung mit **18** möglicherweise nicht das gesamte Reparatursystem bestehend aus Glutathion, Ascorbat sowie den entsprechenden Regenerierungsenzymen dereguliert wird. Die Ergebnisse deuten vielmehr daraufhin, dass eine spezifische, von Glutathion unabhängige Funktion von Ascorbat verändert wird, wie sie auch in der Literatur vermutet wird (Foyer und Noctor 2011). So konnte zum Beispiel für *A. thaliana* gezeigt werden, dass die verschiedenen Gehalte von Glutathion und Ascorbat sehr unterschiedlich auf abiotische Stressfaktoren reagieren (Bartoli *et al.* 2006; Grace und Logan 1996). Hinzu kommt, dass die verschiedenen Redoxenzyme scheinbar auf Transkriptionsebene getrennt voneinander reguliert werden (Vanderauwera *et al.* 2005).

Weiterhin wird auch ein Zusammenhang zwischen der PARP-Aktivität und dem zellulären Redoxstatus in der pflanzlichen Entwicklung vermutet. So konnte bei nicht gestressten *A. thaliana*-Zellen eine positive Korrelation von Glutathiongehalt und PARP-Aktivität gezeigt werden. Zusätzlich werden auch erhöhte Ascorbat-Gehalte bei niedrigen PARP-Aktivitäten beschrieben (Pellny *et al.* 2009). Daher ist es möglich, dass **18** als humaner PARP-Inhibitor auch pflanzliche PARP-Enzyme inhibiert und auf diese Weise zu höheren Ascorbatgehalten sowie höherer Trockentresstoleranz führt.

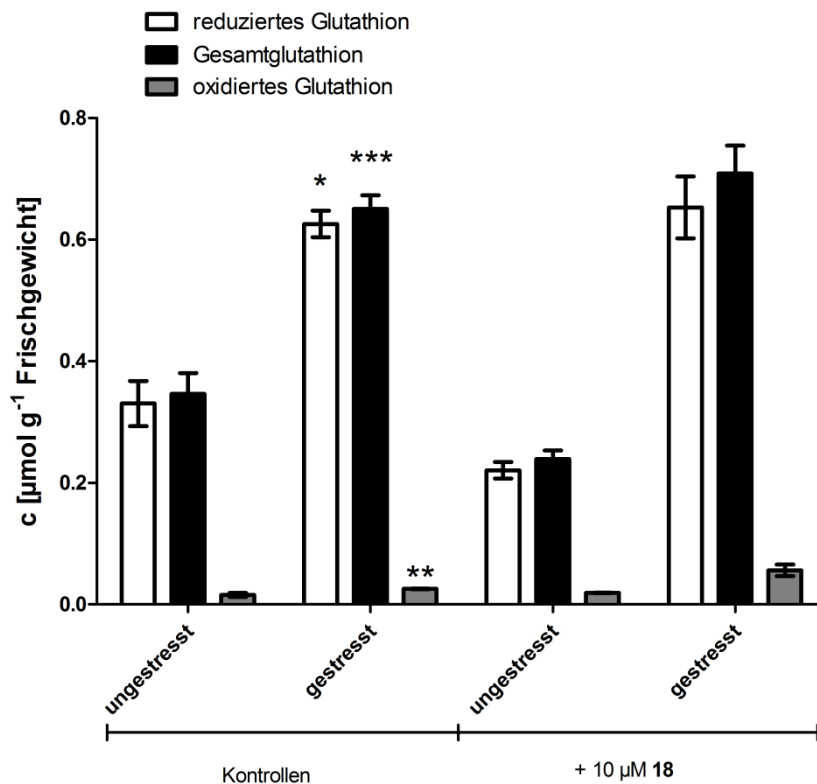


Abbildung 29: Bestimmung des Glutathiongehaltes: Glutathiongehalt von *L. minor* Pflanzen unter Trockenstress bzw. Normalbedingungen welche über 7 Tage mit 10 μM 4-Amino-1,8-naphtalimid (**18**) behandelt wurden; Daten repräsentieren Mittelwerte ± Standardfehler; * bezeichnen statistisch signifikante Unterschiede zur ungestressten Kontrolle (* $\alpha \leq 0,05$; ** $\alpha \leq 0,01$; *** $\alpha \leq 0,001$)

2.2.4 Untersuchung von Substanzbibliotheken

Nach der Entwicklung des Wasserlinsenassays sowie ersten Validierungsansätzen wurden verschiedene Substanzen auf ihre Trockenstresstoleranz-induzierende Aktivität untersucht. Um den strukturellen Raum einzugrenzen sowie eine mechanistische Vorstellung des Wirkprinzips zu erhalten, wurden zunächst *in silico* Untersuchungen durchgeführt, welche Bestandteil der Dissertation von Herrn Peter-Paul Heym sind. Da für diese Untersuchungen ein potentiell Zielprotein benötigt wurde, wurde PARP ausgewählt, da hier bereits zahlreiche Inhibitoren sowie Kristallstrukturen des humanen Isoenzym bekannt sind und bereits eine Trockenstresstoleranz-induzierende Aktivität der PARP-Inhibitoren gezeigt werden konnte. Aus einer Analyse der hauseigenen Bibliothek der Abteilung Natur- und Wirkstoffchemie des IPB Halle wurden neun Substanzen für die Testung im Lemna-Assay vorgeschlagen. Diese Substanzen wurden im Konzentrationsbereich von 100 μM bis 1 nM getestet, wobei keine der Substanzen in der Lage war die Wachstumsgeschwindigkeit der Wasserlinsen unter Trockenstress signifikant zu erhöhen (Abbildung 30).

Da beim virtuellen Screening nur ein singuläres Phänomen, hier die Bindungsfähigkeit des potentiellen Liganden an das Protein, betrachtet wird, ist dieses Ergebnis nicht unerwartet. Für eine Substanz, die auf ein Ganzpflanzensystem wirken soll, spielen jedoch weitere Parameter, wie u. a. die Aufnahme, Verteilung und Verstoffwechslung eine große Rolle. Diese multifaktoriellen Einflüsse erfordern weitere biochemische und zelluläre *in vitro* Tests, da diese geeignet sind um Rückschlüsse auf den Mechanismus zu ziehen und somit die Wahrscheinlichkeit für die Identifikation aktiver Substanzen erhöhen.

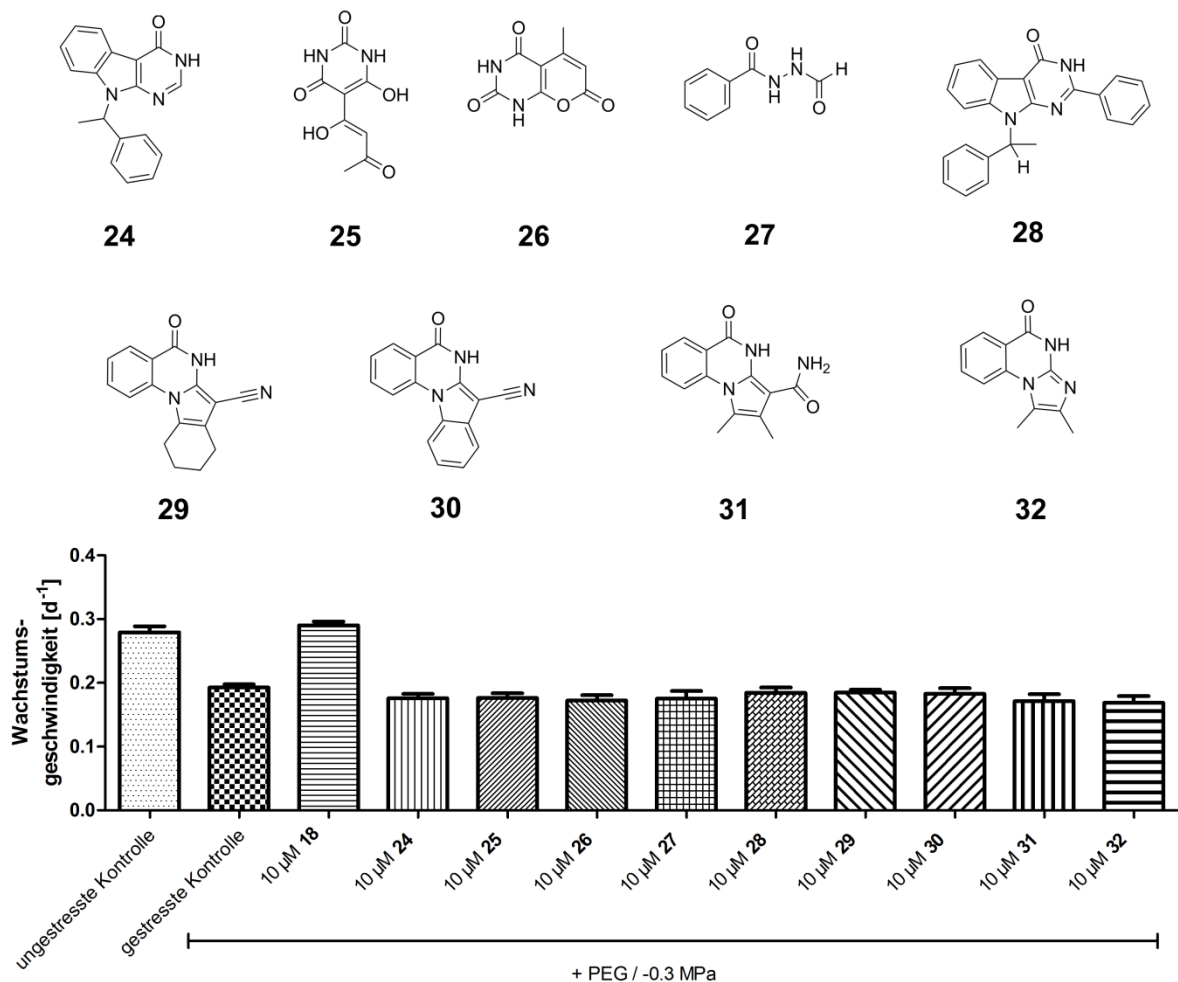


Abbildung 30: Untersuchung der hauseigenen-Substanzbibliothek: Wachstumsgeschwindigkeiten von *L. minor* unter Trockenstress mit 10 μM verschiedener Testsubstanzen (24-32) aus der hauseigenen Substanzbibliothek; Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardfehler

2.2.5 Zusammenfassung

Zusammenfassend betrachtet konnte ein *in vivo* Trockenstresstestsystem entwickelt werden, welches sich für die Untersuchung von Substanzen aus umfangreichen Bibliotheken eignet. Bei diesem Testverfahren wird der Modellorganismus *L. minor* verwendet, welcher aufgrund seiner geringen Größe sowie seines schnellen Wachstums besonders geeignet ist. Aufgrund dieser hohen Wachstumsgeschwindigkeit war es möglich, die Testzeit auf nur sieben Tage zu beschränken, was die zurzeit kürzeste publizierte Dauer eines Trockenstressversuchs mit Ganzpflanzen darstellt (Geissler und Wessjohann 2011). Für das entwickelte Testsystem spricht weiterhin, dass es sich bei *L. minor* um eine Spezies der Monokotyledonen handelt. Zu dieser Gruppe gehören alle Getreidearten wie Weizen, Reis oder Gerste, es existieren jedoch bis auf die Zwenke (*Brachypodium distachyon*) nur wenige Modellorganismen. Der entwickelte Assay hat weiterhin den Vorteil, dass nahezu alle Entwicklungsstadien der Wasserlinsen in der Population vorhanden sind und somit, nicht wie in anderen Ganzpflanzentests, nur Keimlinge untersucht werden. Daher besitzt der Lemna-Assay eine größere Relevanz für Kulturpflanzen. Alle Pflanzen lassen sich zudem als asexuell vermehrte Klone steril anziehen, wodurch die biologische Varianz und biotische Interaktionen sowie mikrobieller Substanzabbau minimiert werden. Die identifizierten Substanzen könnten daher eine bessere Grundlage für die Entwicklung von Düngerezusatzstoffen bilden, die die Trockenstresstoleranz von Kulturpflanzen verbessern. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Trockenstressbiomarker auch in *L. minor* ein ähnliches Verhalten wie bei bekannten Kulturpflanzen zeigen, wodurch die Ergebnisse möglicherweise übertragbar sind. Nachteilig am entwickelten Testsystem ist jedoch, dass keine direkte Erfassung des Wirkmechanismus möglich ist. Aus diesem Grund ist es nötig, weitere Untersuchungen mit den positiv getesteten Substanzen durchzuführen, um auf die molekularen Mechanismen schließen zu können.

2.3 Proteinchemischer PARP-Assay

Um wie bereits in 2.2.4 ausgeführt, die Daten aus dem virtuellen Screening mit experimentellen Ergebnissen zu korrelieren und weitere Rückschlüsse auf die molekularen Mechanismen zu ziehen, wurde eine Screeningroute etabliert. Diese sollte idealerweise aus einem *in vitro* Enzymassay, einem zellulären Testsystem sowie dem entwickelten *in vivo* Trockenstressassay mit *L. minor* bestehen. Da für eine solche Screeningroute ein Targetprotein benötigt wird, wurde das PARP-Enzym, wie in 2.2.4 begründet, ausgewählt (De Block *et al.* 2005).

2.3.1 Expression von *AtPARP-1*

Für einen biochemischen Assay war es zunächst nötig, das Protein in ausreichender Menge zur Verfügung zu stellen. Dazu wurde das PARP-1-Protein aus *A. thaliana* verwendet, welches rekombinant in *E. coli* hergestellt wurde. Der Klon wurde freundlicherweise im Rahmen einer Kooperation mit der Gruppe von Professor Dr. B. Dräger (Institut für Pharmazie, Martin-Luther Universität Halle) verfügbar gemacht. Da bei der Expression bei 37°C hauptsächlich unlösliches Protein erhalten wurde, wurde die Kultivierungstemperatur auf 22°C abgesenkt, um eine langsamere Expression und damit eine korrekte Faltung zu gewährleisten. Während der Reinigung des Proteins mittels Metallaffinitätschromatografie wurden den einzelnen Fraktionen Proben entnommen, um die Reinheit des Proteins zu bestimmen (Abbildung 31). Für das gereinigte Protein konnten Ausbeuten von bis zu 1,5 mg/L bei 98 % Reinheit erreicht werden. Da derartige Mengen für das Testsystem ausreichend sind, wurde auf eine Optimierung der Protein-Ausbeute verzichtet.

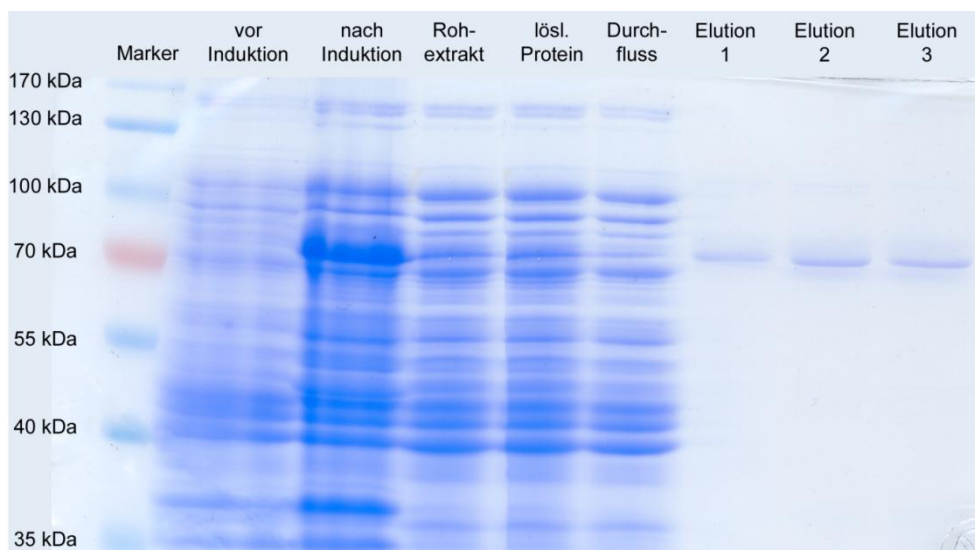


Abbildung 31: SDS-PAGE der Proteinreinigung des *AtPARP-1* (Coomassie-Färbung)

Für die Untersuchung der Aktivität des gereinigten Proteins wurde ein Testsystem verwendet, welches von Robert Rennert (Ontochem AG, Halle/Saale) zur Testung von humanem PARP-1 etabliert wurde. Dieser Assay basiert auf dem Prinzip eines Tests der Firma Trevigen (siehe 3.2.5). Dabei wird die Menge des nicht verbrauchten Substrates NAD^+ detektiert. Dies geschieht, indem mittels einer Alkoholdehydrogenase NAD^+ zu NADH umgesetzt wird, welches in einer Folgereaktion durch eine Diaphorase zur Reduktion des Farbstoff-Vorläufers Resazurin dient. Dabei wird das fluoreszierende Resorufin sowie NAD^+ gebildet. Das erneut zur Verfügung stehende NAD^+ kann dann zur Bildung von weiterem

Resorufin dienen. Zur Nutzung des Tests mit dem *At*PARP-1-Protein wurden die Pufferbedingungen an die Gegebenheiten des Proteins angepasst. Zunächst wurde gereinigtes *At*PARP-1 verwendet, wobei das kommerziell erhältliche *Hs*PARP-1-Protein als Kontrolle diente. Dabei konnte gezeigt werden, dass gereinigtes *At*PARP-1 das Substrat NAD^+ in ähnlicher Weise abbaut wie *Hs*PARP-1 (Abbildung 32), weshalb davon ausgegangen werden kann, dass das Protein in aktiver Konformation vorlag.

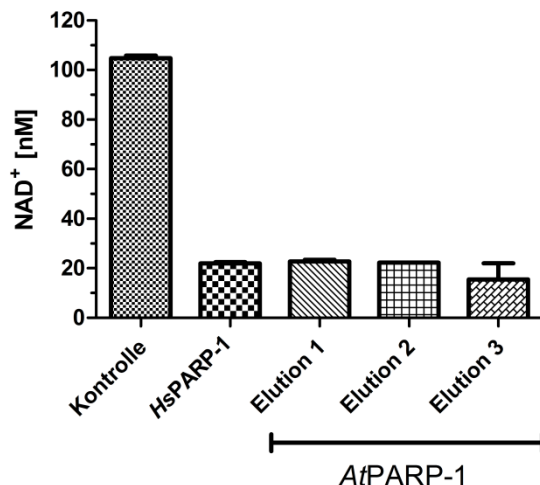


Abbildung 32: Untersuchung von gereinigtem *At*PARP-1: Verbliebene Mengen des Substrates NAD^+ nach der Reaktion mit gereinigten *At*PARP-1-Fractionen (2 pmol) bzw. *Hs*PARP-1 (0,5 pmol); Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardfehler

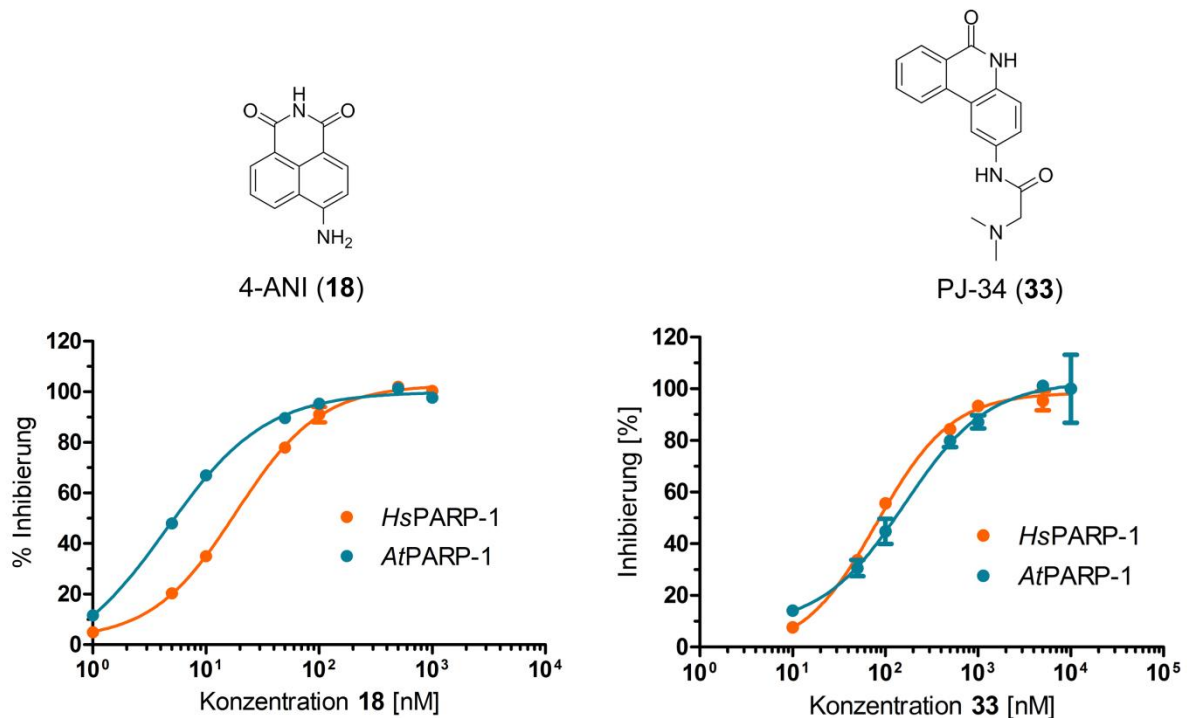
2.3.2 Validierung des PARP-Assays

Zur Validierung des verwendeten Testsystems wurden die für das *Hs*PARP-1-Protein bekannten Inhibitoren PJ-34 (**33**) sowie 4-ANI (**18**) auf ihre IC_{50} -Werte untersucht.

Die Übertragung der pADPR durch *Hs*PARP-1 kann sowohl auf ein zweites Substrat (Heteromodifikation) als auch auf PARP selbst erfolgen (Automodifikation). Dabei beziehen sich die Literatur- IC_{50} -Werte meist auf die Heteromodifikation. Für *At*PARP-1 ist jedoch nicht bekannt, ob es Heteromodifikationen katalysieren kann, da noch kein zweites Substrat identifiziert wurde. Daher wird im Folgenden nur die Inhibierung der Automodifikation betrachtet. Aus diesem Grund sind alle angegebenen IC_{50} -Werte als für die Automodifikation spezifische Werte zu verstehen und daher als relative IC_{50} -Werte angegeben.

Zum Vergleich wurden die Substanzen **33** und **18** sowohl am humanen als auch am *At*PARP-1-Protein untersucht. Dabei konnte für *Hs*PARP-1 für beide Substanzen festgestellt werden, dass die ermittelten IC_{50} -Werte mit den Literaturwerten vergleichbar sind (Abbildung 33). Beide Substanzen sind zudem potente Inhibitoren des *At*PARP-1-Proteins.

Dabei ist zu bemerken, dass **18** als der bisher potenteste Inhibitor für pflanzliche PARP-Enzyme identifiziert werden konnte. Für alle weiteren Untersuchungen wurde **18** daher als Positivkontrolle für diesen Assay verwendet.



rel. IC ₅₀	4-Amino-1,8-naphtalimid (18)	Literatur ¹	PJ-34 (33)	Literatur ¹
HsPARP-1	18,5 ± 1,1 nM	23 ± 7 nM	81,4 ± 1.2 nM	110 ± 3 nM
AtPARP-1	10,9 ± 1,1 nM		162 ± 1.4 nM	

Abbildung 33: Bestimmung der relativen IC₅₀-Werte für 4-Amino-1,8-naphtalimid (**18**) und PJ-34 (**33**); Daten repräsentieren Mittelwerte ± Standardfehler; ¹Literaturwerte entsprechen den Angaben des Herstellers: http://www.trevigen.com/docs/protocol_4690-096-K.pdf; 08.11.2011

2.4 Zellulärer PARP-Assay

Zur Abschätzung von potentiellen Aufnahme- bzw. Metabolisierungseffekten wurde ein zellulärer *in vitro* PARP-Assay etabliert. Für dieses Testsystem wurde der Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* verwendet. Dieser Organismus ist zum Screening von PARP-Inhibitoren besonders geeignet, da gezeigt werden konnte, dass die Expression von HsPARP-1 zu einer Wachstumsinhibierung des transgenen Hefestamms führt (Kaiser *et al.* 1992). Da diese Wachstumsinhibierung mit der Aktivität des Proteins

korreliert, wurde ein Wachstumsinhibitionsassay entwickelt, der die Suche nach PARP-Inhibitoren sowie die Bestimmung von IC_{50} -Werten ermöglicht (Perkins *et al.* 2001). Zusätzlich zu seinem Phänotyp bei PARP-Expression ist *S. cerevisiae* als Modellorganismus für eine Übertragung auf komplexere pflanzliche Systeme geeignet, da die Hefe als Eukaryont die gleiche Genomorganisation wie Pflanzen aufweist. Weiterhin ist v. a. die hohe Teilungsrate (Verdopplungszeit: 1,25 - 2 h, 30°C) sehr vorteilhaft für die Laborkultivierung und ermöglicht einen hohen Durchsatz. Genau wie Pflanzen besitzt *S. cerevisiae* eine Zellwand, bestehend aus Polysaccharidkomplexen. Trotz dieser Gemeinsamkeiten bestehen Unterschiede in der Zusammensetzung der Zellwand, weshalb es nicht auszuschließen ist, dass es bei der Übertragung der Ergebnisse auf Pflanzen zu Abweichungen kommen kann.

Eine transgene Hefe, die das *At*PARP-1- bzw. das *Hs*PARP-1-Protein unter einem induzierbaren Promotor produziert, wurde von der Gruppe von Professor Dr. E. Peiter (Institut für Pflanzenernährung, Martin-Luther-Universität Halle) zur Verfügung gestellt und ist Bestandteil der Dissertation von Frau Dagmar Rissel.

Mittels dieser Hefestämme konnte demonstriert werden, dass sowohl das *Hs*PARP-1 als auch *At*PARP-1-Protein zu einer Wachstumsinhibierung führen (Abbildung 34). Wie für *Hs*PARP-1 bereits bekannt (Perkins *et al.* 2001), lässt sich auch für das *At*PARP-1-Protein dieser Phänotyp mit dem bekannten Inhibitor 6-(5H)-Phenanthridinon (**9**) wieder aufheben. Im Vergleich zu *Hs*PARP-1 fällt die Wachstumsinhibierung für *At*PARP-1 allerdings geringer aus. Im Vergleich zur nicht mit Inhibitor behandelten Kontrolle ist dieser Unterschied jedoch immer noch hochsignifikant (Abbildung 34), was die Etablierung eines Testsystems mit der *At*PARP-1-produzierenden Hefe ermöglicht.

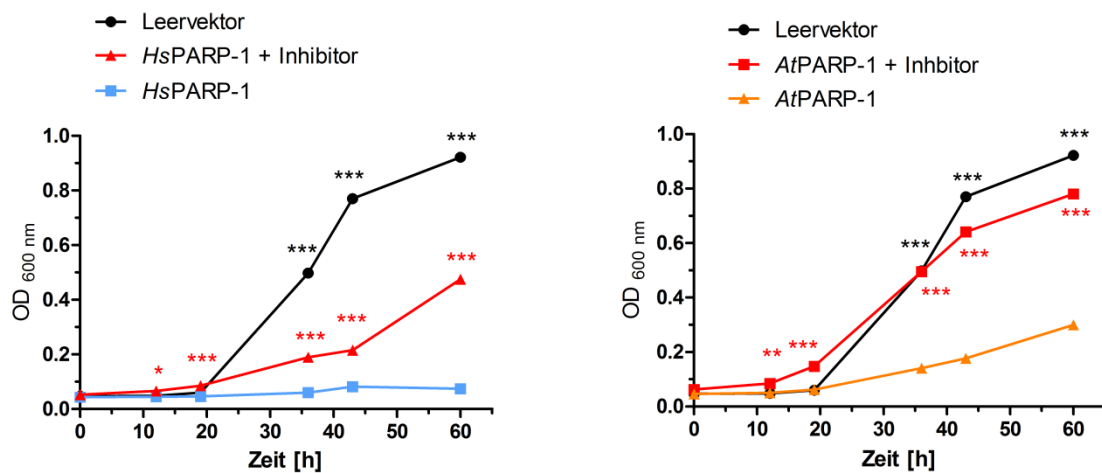
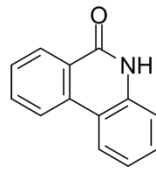


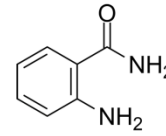
Abbildung 34: Wachstumskurven für Hefen mit leerem Vektor bzw. mit PARP-Konstrukten, welche mit bzw. ohne Inhibitor [100 μ M 6-(5H)-Phenanthridinon (**9**)] kultiviert wurden; Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardfehler; * bezeichnen statistisch signifikante Unterschiede zum unbehandelten PARP-Konstrukt (* $\alpha = 0,05$; ** $\alpha = 0,01$; *** $\alpha = 0,001$)

Da es nötig war, die Testsubstanzen in organischen Lösungsmitteln zu applizieren, wurde zunächst die Toleranz der Hefen gegen die verwendeten Lösungsmittel Methanol und Dimethylsulfoxid bestimmt. Es wurde festgestellt, dass Methanol bei Konzentrationen von bis zu 10 % (v/v) nicht zu einer Wachstumsinhibierung führt. Für DMSO wurde eine maximale Konzentration von 1 % (v/v) toleriert (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der besseren Lösungseigenschaften für die verwendeten Substanzen wurde für alle weiteren Tests mit DMSO bei maximal 1 % (v/v) gearbeitet.

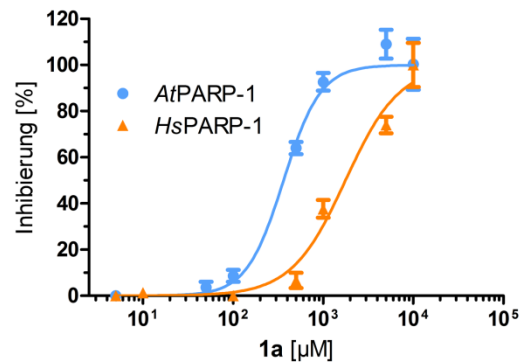
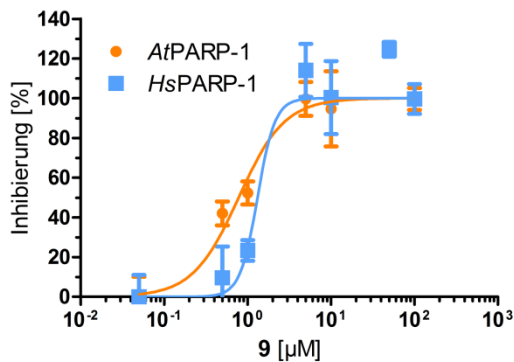
Der Hefe-Assay wurde analog zu Perkins *et al.* (2001) etabliert. Nachfolgend wurde der Assay validiert, indem die IC_{50} -Werte für bekannte Inhibitoren ermittelt wurden. Es sind jedoch bisher nur wenige Standardinhibitoren in diesem Testsystem untersucht worden, sodass ein Literaturvergleich nur für 6-(5H)-Phenanthridinon (**9**) möglich war. Für diese Substanz konnte für HsPARP-1 ein IC_{50} -Wert von 1,3 μ M ermittelt werden, welcher mit dem Literaturwert von 3 μ M vergleichbar ist (Perkins *et al.* 2001). Schwankungen zwischen dem experimentell ermittelten und dem Literaturwert ergeben sich hier aufgrund des möglicherweise unterschiedlichen Expressionslevels des Proteins der beiden Stämme. Weiterhin könnten sich Unterschiede in der intrazellulären Konzentration des Substrates NAD^+ ergeben, was sich bei kompetitiv wirkenden Inhibitoren auf den IC_{50} -Wert auswirkt. Dennoch liegt der ermittelte Wert innerhalb derselben Zehnerpotenz wie der Literaturwert, weshalb von einer Validierung des Tests ausgegangen werden kann.



9



1a



IC ₅₀	6-(5H)-Phenanthridinon (9)	3-Aminobenzamid (1a)
HsPARP-1	1,29 ± 0,83 µM	1768 ± 180 µM
AtfPARP-1	0,767 ± 0,282 µM	362 ± 1,1 µM

Abbildung 35: Bestimmung der IC₅₀-Werte für 6-(5H)-Phenanthridinon (**9**) und 3-Aminobenzamid (**1a**); Daten repräsentieren Mittelwerte ± Standardfehler

Nach der Validierung des Assays wurden weitere für *Hs*PARP-1 bekannte Inhibitoren sowohl am humanen als auch am *A. thaliana* PARP-1-Protein untersucht. Dabei konnte für 3-AB (**1a**), mit einem IC₅₀-Wert von 1,8 mM für *Hs*PARP-1 bzw. 362 µM für *At*PARP-1 nur eine sehr schwache Aktivität gezeigt werden. Weiterhin konnte auch 6-(5H)-Phenanthridinon (**9**) als Inhibitor des *At*PARP-1-Proteins mit einem IC₅₀-Wert von 770 nM identifiziert werden (Abbildung 35). Aufgrund des möglicherweise unterschiedlichen Expressionslevels der Proteine sowie unbekannter intrazellulärer Substratkonzentrationen ist ein Vergleich des IC₅₀-Wertes für *Hs*PARP-1 mit dem IC₅₀-Wert für *At*PARP-1 und damit der Abschätzung einer potentiellen Selektivität nur annäherungsweise möglich.

2.5 Untersuchung von Substanzbibliotheken

Nach der Entwicklung und Etablierung von allen drei Assays, sollten diese nun konsekutiv durchgeführt werden um eine Screeningroute zur Suche nach Trockenstresstoleranz induzierenden PARP-Inhibitoren zu bilden, beginnend mit dem

niedrigsten Substanzbedarf (Abbildung 36). Diese Screeningroute wurde anschließend zur Untersuchung kommerzieller Substanzbibliotheken genutzt.

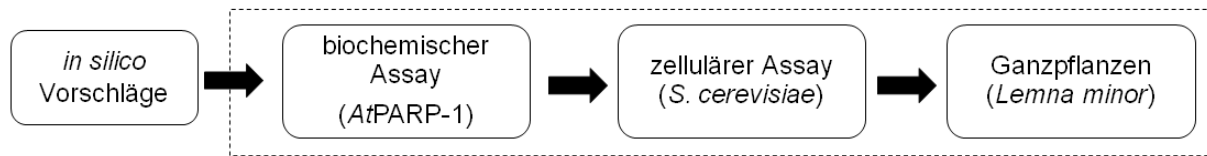


Abbildung 36: Screeningroute

Durch ein virtuelles Screening am Homologie-Modell des AtPARP-1-Proteins konnten weitere 121 Vorschläge für potentielle PARP-Inhibitoren gemacht werden, die alle aus der Substanzsammlung der Key Organics Limited (Großbritannien) bestellt wurden. Hierbei handelte es sich zu ca. 50 % um Substanzen mit Phtalazinon- und Chinazolinon-Grundgerüsten, die vermutlich auch am HsPARP-1 wirken könnten. Die anderen Substanzen besitzen Grundgerüste, die keinem der bisher beschriebenen Inhibitoren zugrunde liegen. Eine detaillierte Liste der Strukturformeln befindet sich im Anhang (Tabelle A.2).

Um PARP-Inhibitoren zu identifizieren, sollten die Substanzen zunächst in vier Konzentrationen im biochemischen PARP-Assay untersucht werden. Substanzen, die bei der höchsten Inhibitorkonzentration eine Inhibierung des Enzyms von mindestens 30 % zeigten, wurden als aktiv bewertet. Hier konnten 53 der 121 Substanzen als Inhibitoren des AtPARP-1-Proteins identifiziert werden. Dies entspricht einer Positivrate des virtuellen Screenings von 44 %. Von diesen Substanzen wurden nachfolgend mit dem biochemischen PARP-Assay IC₅₀-Werte bestimmt.

Um eventuelle Metabolisierungs- und Aufnahmeeffekte abzuschätzen, wurden die aktiven Substanzen im zellulären Hefe-Assay untersucht, wobei auch hier IC₅₀-Werte bestimmt wurden. Um eine mögliche Spezifität der Substanzen für das pflanzliche bzw. das humane PARP-Protein abzuschätzen, wurden die Substanzen sowohl an HsPARP-1- als auch AtPARP-1-exprimierenden Hefestämmen getestet.

Die PARP-Inhibitoren wurden nachfolgend auch im entwickelten Ganzpflanzentest auf ihre Trockenstresstoleranz-induzierende Aktivität untersucht. Zusätzlich wurden alle anderen Substanzen, die keine Aktivität im Protein-Assay zeigten, im Ganzpflanzentest untersucht, da eine Trockenstresstoleranz-induzierende Aktivität über einen anderen Mechanismus nicht ausgeschlossen werden konnte.

2.5.1 Abgeleitete Struktur-Aktivitätsbeziehungen

Aufgrund des relativ großen Datensatzes von 53 Inhibitoren war es möglich, Struktur-Aktivitätsbeziehungen abzuschätzen. Am auffälligsten ist, dass nahezu alle Inhibitoren ein Chinazolinon- bzw. Phtalazinongrundgerüst aufweisen. Dieses Strukturelement ist auch bei Inhibitoren des humanen Isoenzym *HsPARP-1* zu finden (Iwashita *et al.* 2005). Daher ist zu vermuten, dass die identifizierten Inhibitoren sich analog dazu an der Nikotinamidbindestelle des *AtPARP-1* anlagern. Die Substrukturen außerhalb des Grundgerüsts wurden zum besseren Verständnis in einen Spacerteil und einen variablen Rest unterteilt (Abbildung 37 A). Da häufig sowohl Spacer als auch der Rest einer strukturellen Variation unterliegen, sind die nachfolgend diskutierten Struktur-Aktivitätsbeziehungen nur als Abschätzung zu verstehen.

Für den Spacer zeigte sich, dass hier eine Länge von zwei C-Atomen, bzw. einem C-Atom und einem Heteroatom optimal zu sein scheint. Dabei führen längere Spacer von 4-5 Atomen tendenziell zu schlechteren Aktivitäten (Abbildung 37 B). Dies ist möglicherweise auf das begrenzte Volumen der Bindetasche zurückzuführen. Es ist jedoch wahrscheinlicher, dass es durch die gesteigerte Anzahl rotierbarer Bindungen und damit höhere Flexibilität des Liganden zu einem stärkeren Entropieverlust bei der Bindung an das Enzym kommt (Murray *et al.* 2007), was sich entsprechend negativ auf die Bindungsaffinität auswirkt.

Weiterhin zeigen vor allem die Spacer mit einer Methylenimino-Einheit hohe Aktivitäten. Dabei ist zu vermuten, dass diese Gruppe als Wasserstoffbrückendonator wirkt und dabei die 2'- oder 3'-Hydroxylgruppe einer Riboseeinheit des Substrates NAD⁺ imitiert. Aus Kristallstrukturen ist bekannt, dass diese Hydroxylgruppen bevorzugt mit dem für die Katalyse essentiellen Glutamatrest interagieren (Ruf *et al.* 1998). Mit einer solchen Interaktion der Spacergruppe mit der katalytisch wirksamen Aminosäure wäre die besonders hohe Aktivität dieser Inhibitoren zu erklären. Es lässt sich jedoch aufgrund der Datenlage nicht ausschließen, dass es sich hier um einen reinen Spacerlängeneffekt handelt.

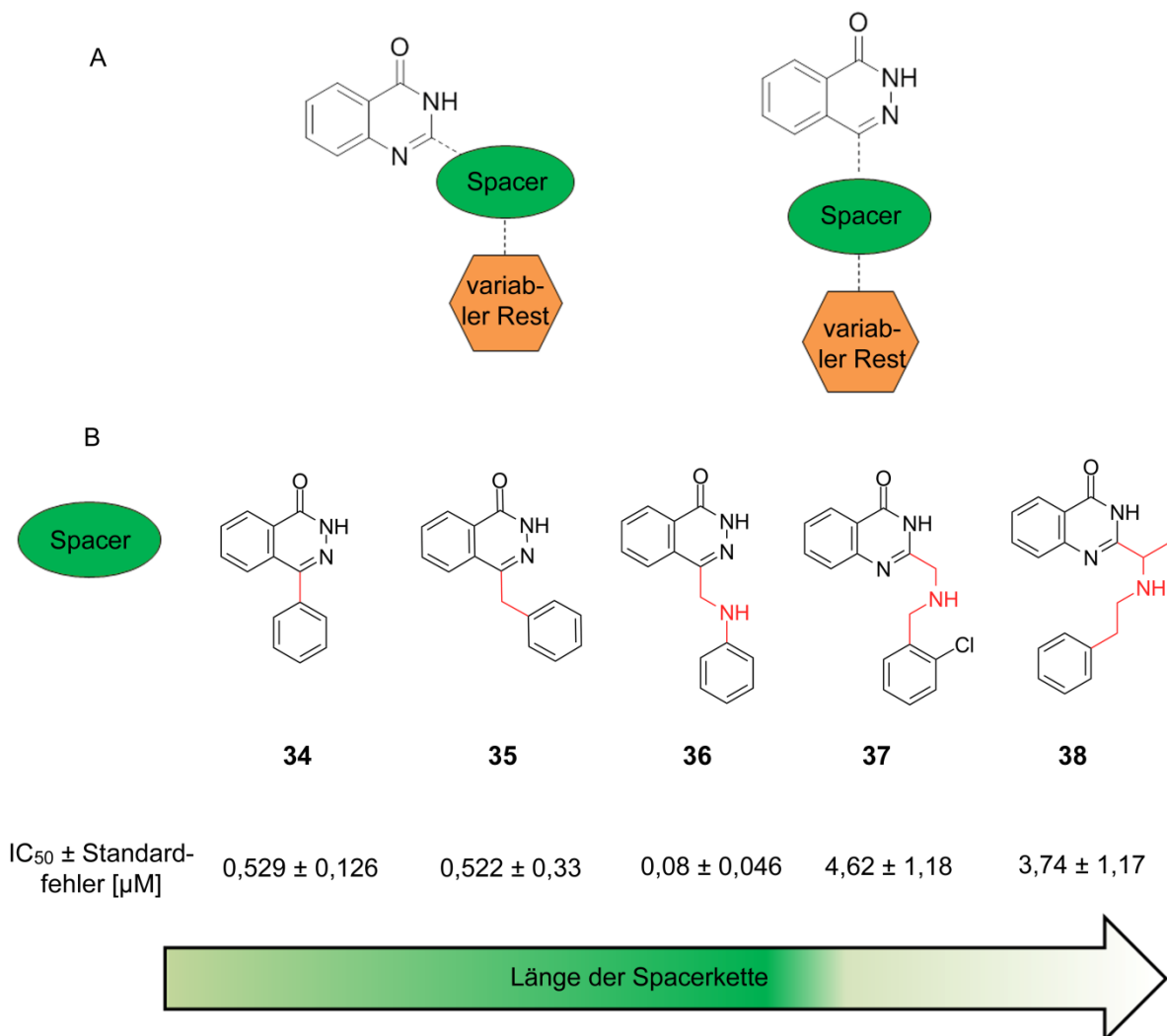


Abbildung 37: vermutete Struktur-Aktivitätsbeziehungen
A prinzipielle Darstellung der Chinazolinon- (links) und Phthalazinoninhibitoren (rechts)
B Einfluss der Länge des Spacers auf die Aktivität gegenüber AfPARP-1
 Spacerteil rot eingefärbt

Bezüglich des variablen Restes ist zu beobachten, dass vor allem Substanzen, in diesem Teil des Moleküls Arylsubstituenten aufweisen, eine hohe Aktivität zeigen (Abbildung 38). Es ist jedoch zu vermuten, dass dies weniger auf arylspezifische Interaktionen mit dem Protein zurückzuführen ist, sondern vielmehr auf hydrophoben / solvophoben Kontakten beruht. Dies zeigt sich vor allem bei gesättigten Ringsystemen (**40**), da diese im Gegensatz zu Alkylketten relativ unflexibel sind und daher geringere Entropieverluste bei der Bindung an das Protein auftreten, aber gleichzeitig hydrophobe Kontakte ausgebildet werden. Da bei gesättigten Ringsystemen, wie dem Adamantylrest von **40**, auch keine π - π -Interaktionen möglich sind, beruht die relativ hohe Aktivität dieser Verbindung vermutlich auf der Ausbildung hydrophober Kontakte des variablen Restes zum Protein. Hierbei ist zu vermuten, dass der variable Rest mit dem Teil

des Proteins interagiert, der den Adenylrest des Substrates NAD^+ bindet und diesen hauptsächlich über hydrophobe Kontakte stabilisiert. Weiterhin scheint auch die Größe des variablen Restes einen Einfluss auf die Aktivität zu haben. So zeigen viele der Inhibitoren, bei denen der variable Rest aus zwei nicht anellierten Ringsystemen besteht (**41**), meist nur eine schwache Aktivität. Inhibitoren mit nur einem 5- oder 6-gliedrigen aromatischen Ring bzw. einem Indan-System (**39**) hingegen zeigen eine hohe Aktivität und besitzen daher vermutlich eine optimale Größe für die Enzymtasche.

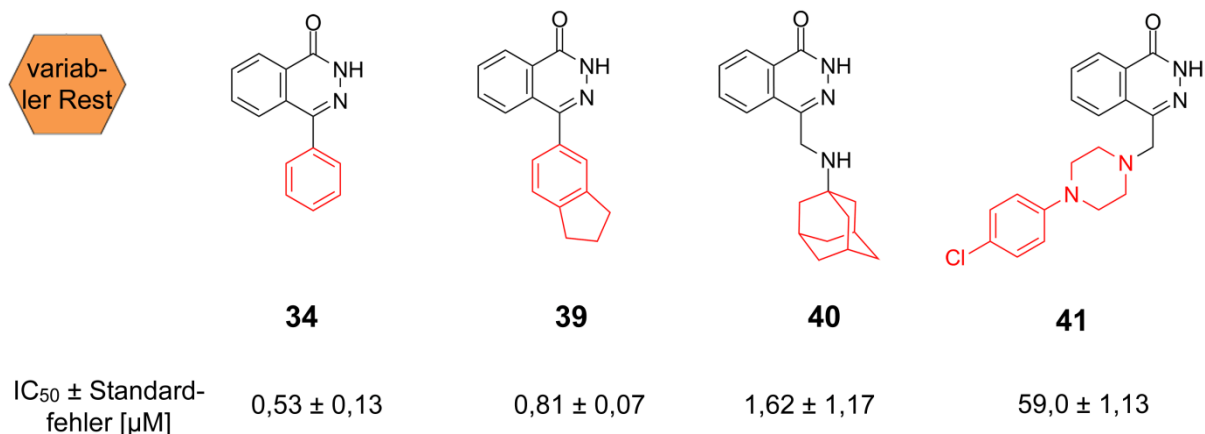


Abbildung 38: Einfluss des variablen Restes auf die Aktivität gegenüber *At*PARP-1; variabler Rest rot eingefärbt

Es wurden weiterhin Substanzen identifiziert, deren Grundgerüste bisher noch nicht als Inhibitoren von PARP-Enzymen beschrieben wurden. So konnte gezeigt werden, dass auch Tetrahydrochinazolinone wie **42** und Thienopyridinone wie **43** PARP-Enzyme, im speziellen Fall das *At*PARP-1-Protein, inhibieren können (Abbildung 39). Dabei konnten aus der Klasse der Tetrahydrochinazolinone insgesamt fünf Vertreter als *At*PARP-1-Inhibitoren identifiziert werden. Ähnliche Inhibitoren wie **42** sind in der Literatur noch für kein PARP-Enzym beschrieben. Alle Inhibitoren der beiden neuen Strukturklassen zeigen jedoch nur eine sehr schwache Aktivität im zweistelligen mikromolaren Bereich. Aufgrund der strukturellen Verwandtschaft der Grundgerüste zu den Chinazolinon- bzw. Phtalazinonen ist zu vermuten, dass diese Substanzen ebenfalls die Nikotinamidbindestelle des *At*PARP-1-Proteins nutzen. Es ist bekannt, dass die Bindung des Substrates in diesem Teil der Bindetasche durch π - π -Interaktion mit einem Tyrosin stabilisiert wird. Da die Liganden **42** und **43** ein kleineres aromatisches System aufweisen, steht vermutlich weniger Kontaktfläche für π - π -Interaktionen als bei den Chinazolinonen bzw. Phtalazinonen zur Verfügung, was die schwächere Bindung erklären würde. Ähnliche Inhibitoren wie **43** konnten von Shinkwin (1999) für das *Hs*PARP-1 identifiziert werden. Hierbei handelt es sich

um Stellungsisomere, wobei sich das Schwefelatom in 2-Position und nicht wie bei **43** in 1-Position befindet. Die Vergleichbarkeit der Aktivität ist jedoch schwierig, da in der Studie von Shinkwin keine Inhibitorkonstanten bestimmt wurden, sondern nur bei einzelnen Konzentrationen gemessen wurde. Weiterhin wurden für diese Inhibitoren nur ungereinigte Zellkernextrakte humaner Zellen verwendet.

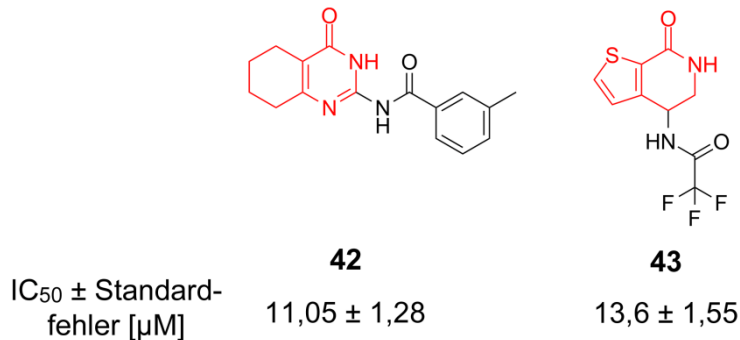


Abbildung 39: Neu identifizierte Grundgerüste für AtPARP-1 Inhibitoren

2.5.2 Ergebnisse des Hefe-Assays

Die 53 im Protein-Assay als AtPARP-1 Inhibitoren identifizierten Substanzen, wurden nachfolgend auch im Hefe-Assay untersucht. Dabei zeigten 33 der Substanzen auch hier eine Aktivität. Die Struktur-Aktivitätsbeziehungen, welche für die Ergebnisse des Protein-Assays abgeleitet werden konnten, spiegeln sich auch in den Resultaten des Hefe-Assays prinzipiell wider (Abbildung 40). Da die Untersuchung nur 33 strukturell verhältnismäßig diverse Substanzen umfasst, ist eine weitere Auswertung der Struktur-Aktivitätsbeziehungen sehr spekulativ, weshalb hier darauf verzichtet wird.

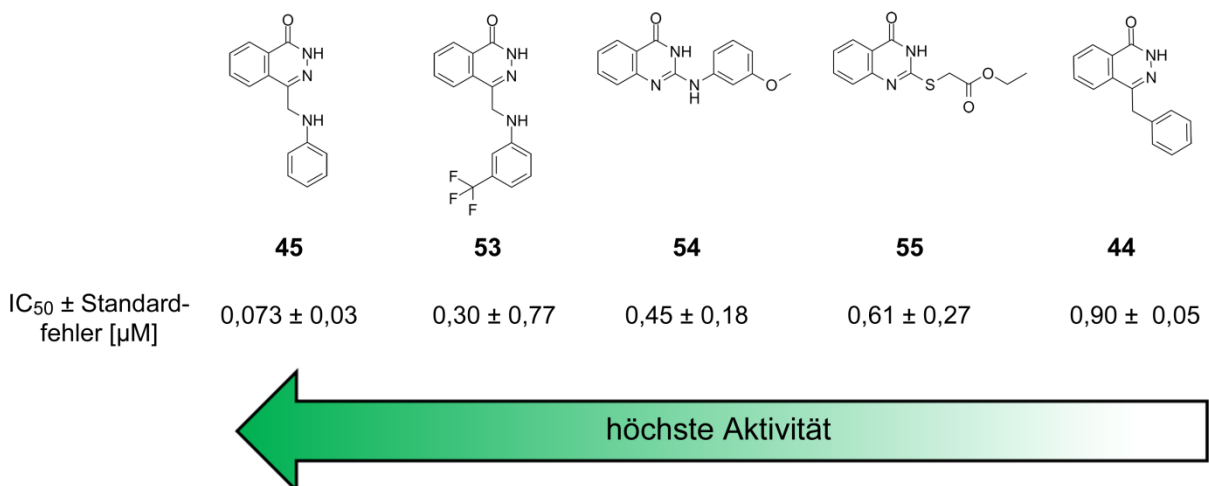


Abbildung 40: Strukturformeln und IC_{50} -Werte des zellulären Hefe-Assay der aktivsten Verbindungen

Im Allgemeinen zeigt sich ein Trend zu höheren IC_{50} -Werten im zellulären Assay. Dieser Effekt ist nicht verwunderlich, da im zellulären System natürlich auch andere Faktoren, wie veränderte Löslichkeit, unspezifische Proteinbindung sowie die Geschwindigkeit des Abbaus auf die Bioverfügbarkeit einer Substanz wirken. Es konnte festgestellt werden, dass v. a. **39** und **40** sowie viele Tetrahydrochinazolinone (**42**) eine niedrigere Aktivität im zellulären Assay zeigen (Abbildung 41). Vermutlich beruht dieser Effekt darauf, dass die Substanzen aufgrund ihrer relativ hohen Hydrophobizität mit den Membranen der Hefe assoziiert vorliegen und nicht an das lösliche AtPARP-1 binden. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass die Substanzen von unspezifischen Transportproteinen, von denen in *S. cerevisiae* insgesamt 29 bekannt sind (Decottignies und Goffeau 1997), aus der Zelle geschleust werden und daher keine oder nur geringe Aktivität entfalten können.

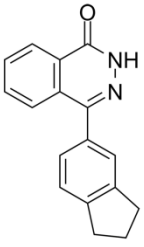
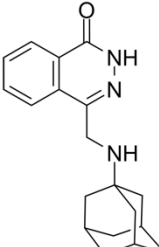
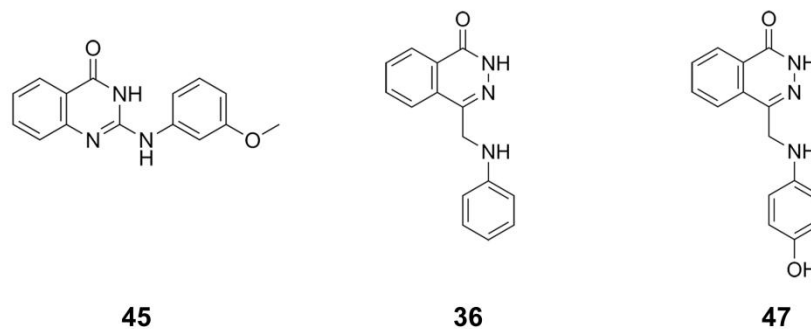
		
	39	40
Protein-Assay		
$IC_{50} \pm$ Standardfehler [μ M]	$0,81 \pm 0,07$	$1,62 \pm 1,17$
Hefe-Assay		
$IC_{50} \pm$ Standardfehler [μ M]	$19,3 \pm 1,18$	$6,22 \pm 0,01$

Abbildung 41: Unterschiede der Aktivitäten von Protein- und Hefe-Assay: Struktur und Aktivität einiger Verbindungen mit abweichenden IC_{50} -Werten in Protein und Hefe-Assay

Weiterhin wurde untersucht, ob einige Inhibitoren eine potentielle Selektivität für das humane oder das AtPARP-1 zeigen. Aufgrund des möglicherweise unterschiedlichen Expressionslevels der Proteine sowie Unterschieden der Substratkonzentration kann dies jedoch nur eine Abschätzung sein. Daher wurden nur Inhibitoren als selektiv definiert, bei denen sich die IC_{50} -Werte um mindestens eine Zehnerpotenz unterscheiden.

Auf diese Weise konnte der Inhibitor **47** mit einem Selektivitätsindex von 14,6 für das HsPARP-1 identifiziert werden. Für eine Substanz, die die Trockenstresstoleranz von Kulturpflanzen erhöhen soll, ist jedoch eine höhere Affinität zum pflanzlichen PARP

unerlässlich. Da *Hs*PARP-1-Inhibitoren die menschliche DNA-Reparatur beeinträchtigen könnten, kommt einer solchen Differenzierung besondere Bedeutung zu. Im hier beschriebenen Screening konnten drei *At*PARP-1-selektive Inhibitoren identifiziert werden, wobei **45** den höchsten Selektivitätsindex von 46,4 zeigte (Abbildung 42). **36** und **45** sind sowohl aufgrund ihrer hohen Aktivität im nanomolaren Bereich als auch aufgrund der Selektivität für *At*PARP-1 für die Entwicklung als Pflanzenschutzmittel geeignet. Alle übrigen Inhibitoren wurden als unselektiv definiert.



IC ₅₀ <i>Hs</i> PARP-1 [μM]	20,9 ± 0,66	1,65 ± 2,12	43,9 ± 0,94
IC ₅₀ <i>At</i> PARP-1 [μM]	0,45 ± 0,18	0,073 ± 0,03	2,62 ± 0,03
Selektivitätsindex IC ₅₀ (<i>At</i> PARP-1) / IC ₅₀ (<i>Hs</i> PARP-1)	46,4	22,6	16,8

Abbildung 42: Strukturformeln und Aktivitätswerte von Inhibitoren, die eine *At*PARP-1-Selektivität aufweisen

2.5.3 Ergebnisse des Lemna-Assays

Da bekannt ist, dass auch andere Targetproteine als PARP-1 für eine Erhöhung der Trockenstresstoleranz verantwortlich sind, wurden nicht nur die 53 *At*PARP-1-Inhibitoren sondern alle 121 Substanzen im entwickelten Lemna-Assay untersucht. Von den *At*PARP-1-Inhibitoren konnten dabei fünf das Wachstum der Wasserlinsen unter Trockenstress signifikant erhöhen, was einem Anteil von 9,4 % entspricht. Dabei ist besonders interessant, dass **45** bei einer Konzentration von 5 μM zu einer Wachstumserhöhung von 30 % führt, da dieser Inhibitor im Hefe-Assay als selektiv klassifiziert wurde. Jedoch zeigt sich, dass hier nur ein sehr enger Aktivitätsbereich vorhanden ist, da bei 10 μM und 1 μM die Wasserlinsen bereits wieder mit normaler Geschwindigkeit wachsen. Es ist zu vermuten, dass aufgrund des hohen Potentials des Inhibitors (Protein IC₅₀ ≈ 480 nM) bei höheren Konzentrationen die pflanzliche DNA-Reparatur zu stark beeinflusst wird und somit das Wachstum negativ beeinflusst. Aus diesem Grund ist ein moderater Inhibitor für die Entwicklung als Pflanzenschutzmittel vermutlich besser geeignet, da dieser bei Trockenstress eine Überaktivierung von PARP und

damit übermäßigen Zelltod verhindert, nicht aber die DNA-Reparatur, an der PARP beteiligt ist, zu stark beeinflusst. Auch die Ergebnisse von de Block (2005) deuten auf diese Tatsache hin, da nur die RNAi-Linien, bei denen noch restliches PARP-Protein vorhanden ist, trockenstresstoleranter sind, jedoch nicht die Knockout-Pflanzen, bei denen kein PARP-1-Protein mehr vorhanden ist. Weiterhin konnte Amor (1998) durch Überexpression des PARP-1-Proteins in *Glycine max*-Zellen zeigen, dass sich PARP bei einem hohen Stresslevel nachteilig, bei geringem Stresslevel jedoch positiv auf die Vitalität auswirkt. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass es bei dem sehr engen Aktivitätsbereich von **45** um ein Artefakt handelt, so dass diese Substanz erneut getestet werden sollte. Eine konzentrationsabhängige Erhöhung der Trockenstresstoleranz lässt sich jedoch bei den Inhibitoren **46**, **48** und **49** zeigen (Abbildung 43).

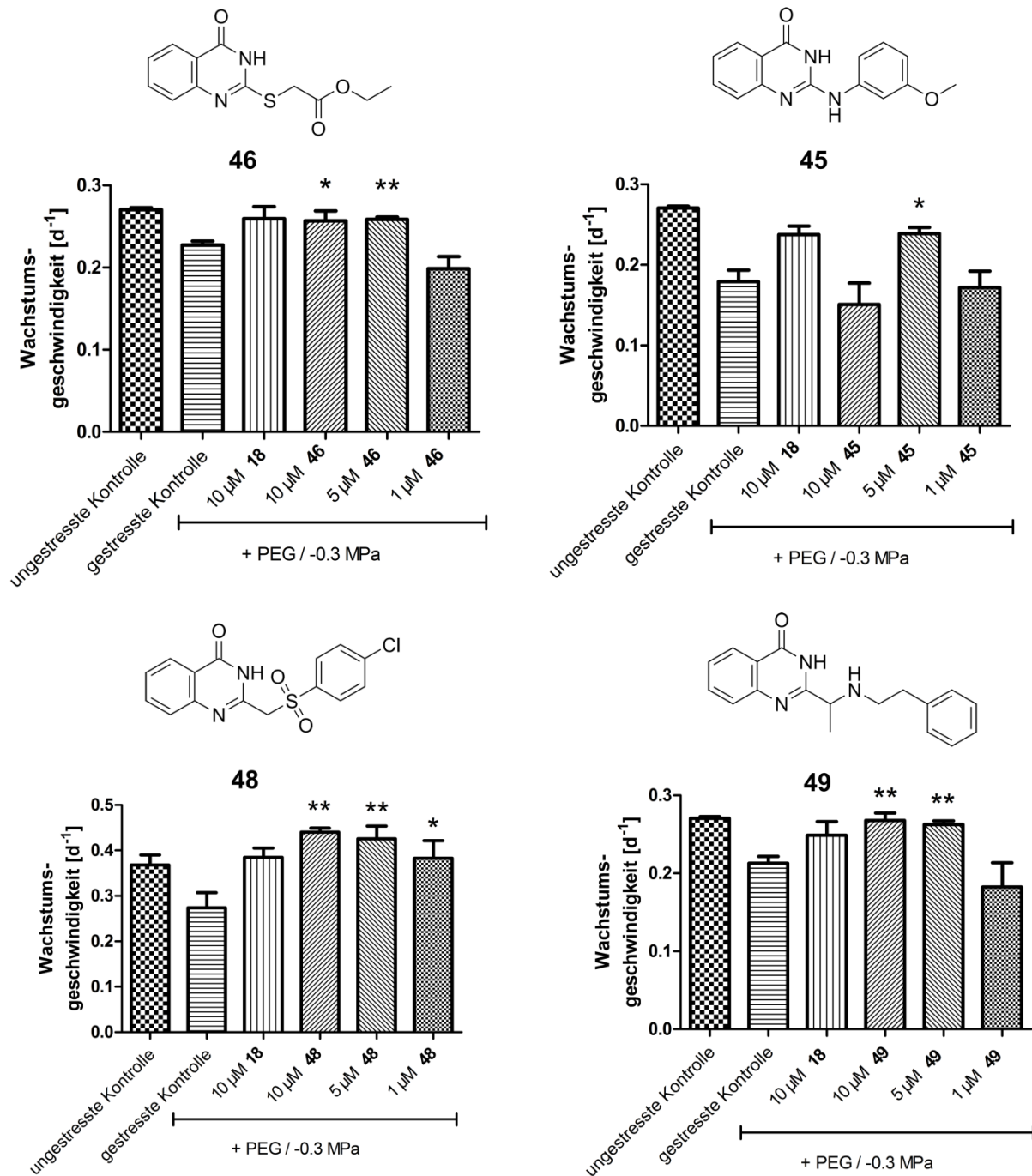


Abbildung 43: Wachstumsgeschwindigkeiten von *L. minor* unter Trockenstress, behandelt mit den gezeigten Substanzen; Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardfehler; * bezeichnen statistisch signifikante Unterschiede zur gestressten Kontrolle (* $\alpha \leq 0,05$; ** $\alpha \leq 0,01$)

Hier fällt vor allem der Inhibitor **48** auf, da dieser das Wachstum sogar über den Wert der ungestressten Kontrolle hinaus signifikant steigert. Dabei konnte das Wachstum der Wasserlinsen um bis zu 61 % gegenüber der gestressten und sogar 9,5 % gegenüber der ungestressten Kontrolle erhöht werden (**48**, 10 μM). Das deutet daraufhin, dass **48** nicht nur

eine PARP- und damit trockenstressspezifische Aktivität besitzt, sondern vermutlich auch noch andere Effekte hervorruft.

Von den nicht als AtPARP-1-Inhibitoren klassifizierten Substanzen konnten ebenfalls zwei das Wachstum der Wasserlinsen signifikant erhöhen. Diese Substanzen (**50**, **51**, Abbildung 44) zeigen eine moderate Erhöhung des Wachstums um maximal 12 % (**50**; 5 μM). In der Literatur ist keine der Substanzen bisher im Zusammenhang mit Trockenstress beschrieben. Ähnliche Thiazolcarboxamide wie **50** sind bisher nur für ihre fungizide Wirkung bekannt (Sharma *et al.* 2001).

Die Identifikation von zwei Substanzen aus einer Gesamtzahl von 121 entspricht demnach einer Hitrate von 2,9 %. Geht man davon aus, dass diese Hitrate einer willkürlichen Auswahl von Verbindungen entspricht, konnte mittels der Voruntersuchungen am Protein sowie an der Hefe eine Anreicherung auf 9,4 % und daher um mehr als das Dreifache erreicht werden. Weiterhin konnten durch die Voruntersuchungen wertvolle Hinweise auf den zugrundeliegenden Mechanismus der Erhöhung der Trockenstresstoleranz erhalten werden.

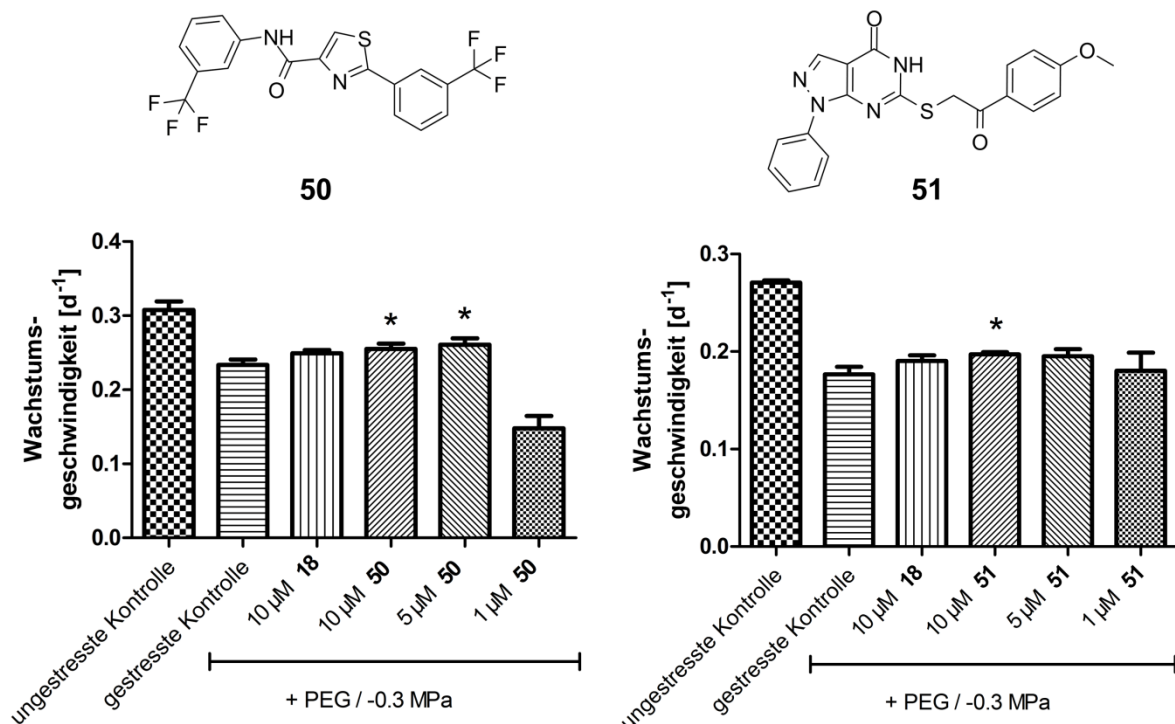


Abbildung 44: Wachstumsgeschwindigkeiten von *L. minor* unter Trockenstress, behandelt mit den gezeigten Substanzen; Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardfehler; * bezeichnen statistisch signifikante Unterschiede zur gestressten Kontrolle (* $\alpha \leq 0,05$)

2.5.4 Zusammenfassung

Zur Untersuchung, ob die etablierte Screeningroute zur Suche nach PARP-Inhibitoren, die potentiell die Trockenstresstoleranz erhöhen, geeignet ist, wurden 121 Substanzen getestet. Es konnte gezeigt werden, dass 53 dieser Substanzen das AtfPARP-1-Protein inhibieren. Die Inhibierung eines pflanzlichen PARP-Proteins war bislang für keine der Substanzen bekannt. Dabei zeigten sieben der Substanzen einen IC_{50} -Wert im nanomolaren Bereich, wobei die höchste Aktivität mit $IC_{50} \approx 80$ nM für **36** erzielt wurde. In einem zellulären Hefe-Assay konnte die Inhibierung des AtfPARP-1-Proteins ebenfalls für 33 der Substanzen nachgewiesen werden. Dabei konnte zusätzlich eine Abschätzung bezüglich selektiver Inhibitoren getroffen werden und auf diese Weise drei potentiell AtfPARP-1-selektive Inhibitoren identifiziert werden. Fünf der identifizierten PARP-Inhibitoren zeigten zudem eine Steigerung der Trockenstresstoleranz der Wasserlinsen. Dabei zeigte vor allem **48** eine besonders hohe Aktivität, da die Substanz das Wachstum der Wasserlinsen um ca. 60 % gegenüber der gestressten Kontrolle steigern konnte. Von den nicht als PARP-Inhibitoren klassifizierten Substanzen konnten zwei das Wachstum der Wasserlinsen leicht steigern.

2.6 Synthese

Um weitere Substanzen aus der Gruppe der Chinazolinone zu identifizieren, die die Trockenstresstoleranz von Pflanzen verbessern können, wurden weitere derartige Verbindungen synthetisiert. Diese Verbindungsklasse ist einfach zugänglich durch die Kupplung von Säurechloriden bzw. symmetrisch substituierten zyklischen Anhydriden mit Anthranilamid. Die entstehenden Amide konnten direkt getestet werden oder durch basische Aufarbeitung zu den stabilen Iminen und Chinazolinonen zyklisiert werden (Griffin *et al.* 1998; Abbildung 45). Auf diese Weise wurden insgesamt sieben Amide bzw. Chinazolinone erhalten.

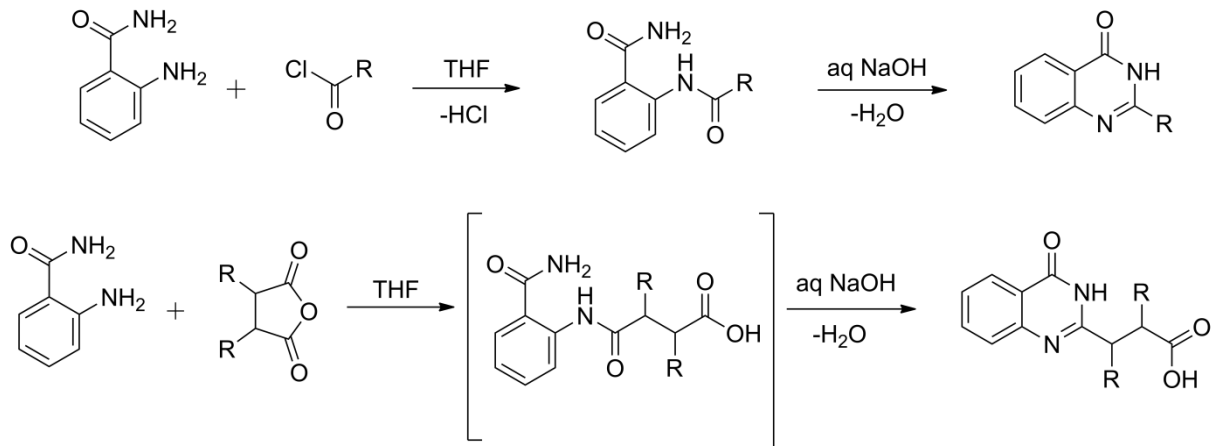
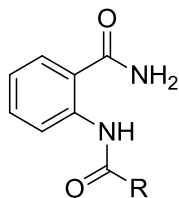


Abbildung 45: Reaktionsschema zur Bildung von Chinazolinonen

Sowohl die Amide als auch die Chinazolinone wurden auf ihre inhibitorische Aktivität gegenüber dem AtPARP-1-Protein untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die offenkettigen Amide nahezu keine Aktivität gegenüber AtPARP-1 besitzen (Tabelle 2) und von den Chinazolinonen nur **55** und **56** eine nennenswerte Aktivität im unteren mikromolaren Bereich aufweisen (Tabelle 3). Die erhaltenen Ergebnisse stützen auch die Hypothese, dass relativ unflexible kurze Spacer am Chinazolinon-Grundgerüst für eine hohe Aktivität sorgen (**55**, **56**), wobei größere Substituenten vermutlich zu einem Aktivitätsverlust führen (**58**).

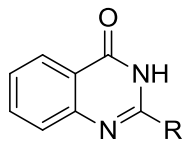
Tabelle 2: Strukturformeln und Testergebnisse (Protein-, Lemna-Assay) der synthetisierten Amide

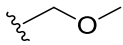
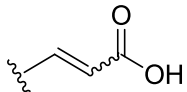
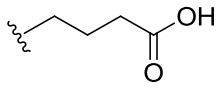


Substanz	R	Protein-Assay IC ₅₀ ± SF [µM]	Wachstums- geschwindigkeit [d ⁻¹] <i>L. minor</i> bei 10 µM Testsubstanz (Mittelwert ± SF)
52	Me	13,43 ± 1,54	0,147 ± 0,055
53		54,28 ± 1,59	0,178 ± 0,017
54		43,53 ± 1,62	0,184 ± 0,016

Weiterhin wurde auch die Trockenstresstoleranz-induzierende Aktivität im entwickelten Lemna-Assay untersucht, wobei gezeigt werden konnte, dass keine der Substanzen das Wachstum der Wasserlinsen signifikant erhöht. Es ist zu vermuten, dass die Substanzen keine ausreichende Bioverfügbarkeit *in vivo* aufweisen bzw. nicht ausreichend metabolisch stabil sind. Trotz ihrer einfachen Zugänglichkeit sind die Substanzen nicht für die Entwicklung als Pflanzenschutzmittel geeignet.

Tabelle 3: Strukturformeln und Testergebnisse (Protein-, Lemna-Assay) der synthetisierten Chinazolinone



Substanz	R	Protein-Assay IC ₅₀ ± SF [μM]	Wachstums- geschwindigkeit [d ⁻¹] <i>L. minor</i> bei 10 μM Testsubstanz (Mittelwert ± SF)
55	Me	0.78 ± 0,08	0,194 ± 0,021
56		3,02 ± 1,19	0,190 ± 0,013
57		15.46 ± 0,10	0,220 ± 0,016
58		>100	0,198 ± 0,017

3

Experimenteller Teil

3.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien besaßen einen Reinheitsgrad größer 95% oder Analysenreinheit. Bei allen Prozessen, die die Zugabe von Wasser erforderten, wurde MilliQ-Wasser verwendet. Die Anpassung der pH-Werte für Puffer erfolgte mit 1 M HCl bzw. 1 M NaOH.

3.2 Biochemische Testsysteme

3.2.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle folgenden Schritte unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Dazu wurden alle Medien bei 121°C für 20 min autoklaviert und alle Arbeiten unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt.

Der *E. coli*-Stamm mit der cDNA des Gens *AtPARP-1* (At4g02390) im Vektor pQE30 wurde freundlicherweise von der Gruppe von Professor Dr. B. Dräger (Institut für Pharmazie,

Martin-Luther Universität Halle) zur Verfügung gestellt (Abbildung 46). Zur Herstellung von Glycerinkulturen wurden 5 mL LB-Medium (Tabelle 4) mit 50 µg/mL Kanamycin und 50 µg/mL Ampicillin mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Nachfolgend wurde die Kultur bei 18600 g für 5 min zentrifugiert (Hettich Mikro 120, Tuttlingen) und das Bakterienpellet in 1 mL 20 % Glycerin-Lösung in LB-Medium aufgenommen, in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

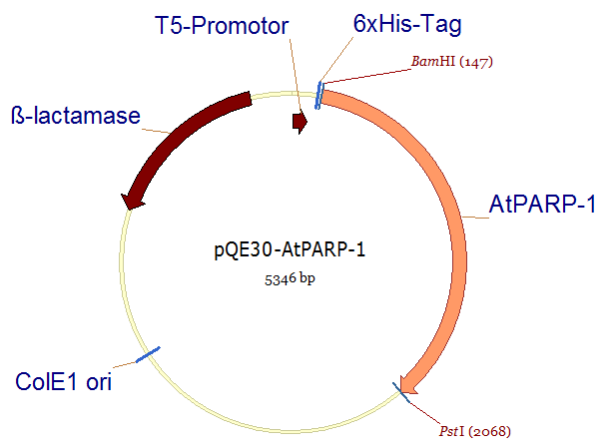


Abbildung 46: Vektorkarte mit Insertionssequenz (*AtPARP-1*), Schnittstellen der zur Klonierung verwendeten Restriktionsenzyme (*Bam*HI, *Pst*I), Replikationsursprung (*ColE1 ori*), Selektionsmarkergen (β -Laktamase), Promotorsequenz (T5-Promotor) sowie Sequenz zur Proteinreinigung (6x His-Tag)

Tabelle 4: Medien zur Kultivierung von *E. coli*

Medium	Zusammensetzung
Terrific broth (TB)-Medium	24 g/L Hefeextrakt
	12 g/L Trypton
	0,4 % (v/v) Glycerin
	17 mM KH_2PO_4
	72 mM K_2HPO_4
Lysogeny broth (LB)-Medium	5 g/L Hefeextrakt
	10 g/L Trypton
	10 g/L NaCl

3.2.2 Proteinreinigung

Zur Proteinreinigung wurde zunächst eine Starterkultur des unter 3.2.1 beschriebenen *E. coli*-Stammes hergestellt. Dazu wurden 10 µL der Glycerinkultur zu 50 mL LB-Medium mit 50 µg/mL Kanamycin und 50 µg/mL Ampicillin gegeben und bei 37°C und 180 rpm für ca. 12 h inkubiert. 17,5 mL dieser Starterkultur wurden nachfolgend in 1 L TB-Medium (Tabelle 4) mit den oben angegebenen Antibiotika-Konzentrationen überführt. Die Kultur wurde bei 37°C und 180 rpm erneut inkubiert und regelmäßig die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) kontrolliert. Sobald diese einen Wert von 0,6-0,8 erreichte, wurde durch Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (Endkonzentration 1 mM) die Proteinexpression induziert. Nachfolgend wurde die Kultur bei 22°C und 180 rpm für 20 h inkubiert.

Die folgenden Schritte wurden unter nicht sterilen Bedingungen bei 4°C oder im Eisbad durchgeführt. Für die Zellernte wurde zunächst die Kultur bei 17700 g (Beckman-Coulter Avanti J-E, Krefeld) für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das erhaltene Zellpellet wurde in 25 mL Proteinextraktionspuffer (Tabelle 5) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels eines Ultraschall-Homogenisators (Bandelin SonoPuls HD 3200, Berlin) für 2 min (1 s Puls / 1 s Pause, Amplitude 70 %). Danach erfolgte ein Verdau bakterieller DNA bei RT, indem 10 µg/mL DNase I dem Bakterienlysat zugegeben wurden und die Mischung für 15 min inkubiert wurde. Nachfolgend wurde das Bakterienlysat bei 20000 g für 90 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, durch einen Polvinylfluorid-Filter (Porenweite 0,45 µm) filtriert und das Filtrat für alle weiteren Aufreinigungsschritte verwendet.

Zur Reinigung des AtfPARP-1-Proteins wurde der N-terminal fusionierte Hexa-Histidin-Tag verwendet, welcher eine Aufreinigung mittels Metallionen-Affinitätschromatografie erlaubt. Hierzu wurden 1 mL HisTrap[®]-Säulen (GE Healthcare, München) zunächst mittels einer Peristaltik-Pumpe (Pump P-1, GE Healthcare) und Puffer A (Tabelle 5) bei einer Flussrate von 1 mL/min equilibriert. Die Säule wurde nachfolgend mit dem im letzten Schritt erhaltenen löslichen Proteinextrakt bei einer Flussrate von 0,3 mL/min beladen. Nachfolgend wurde die Säule mit je 10 mL der Waschpuffer 1 und 2 (Tabelle 5) gewaschen. Danach erfolgte die fraktionierte Elution des Proteins mittels Puffer B (Tabelle 5). Nach einem letzten Waschschrift mit 10 mL Waschpuffer 3 (Tabelle 5) wurde die Säule auf 20 % (v/v) EtOH gelagert. Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels Größenausschlusschromatografie über PD-10-Säulen (GE Healthcare) nach den Herstellerangaben entsalzt. Das für alle Assays verwendete gereinigte Protein lag in Puffer C (Tabelle 5) vor.

Tabelle 5: Verwendete Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Proteinextraktionspuffer (pH = 7,5)	35,1 mM Na ₂ HPO ₄ 14,8 mM NaH ₂ PO ₄ 20 % (v/v) Glycerin 1 mM 2-Mercaptoethanol 10 µg/mL Lysozym 1 % (v/v) Tween 20
Puffer A (pH = 7)	35,1 mM Na ₂ HPO ₄ 14,8 mM NaH ₂ PO ₄ 150 mM NaCl 10 mM Imidazol
Puffer B (pH = 7)	35,1 mM Na ₂ HPO ₄ 14,8 mM NaH ₂ PO ₄ 150 mM NaCl 300 mM Imidazol
Puffer C (pH = 8)	50mM Tris(hydroxymethyl)- aminomethan (Tris) 200 mM NaCl
Waschpuffer 1 (pH = 7)	35,1 mM Na ₂ HPO ₄ 14,8 mM NaH ₂ PO ₄ 150 mM NaCl 30 mM Imidazol
Waschpuffer 2 (pH = 7)	35,1 mM Na ₂ HPO ₄ 14,8 mM NaH ₂ PO ₄ 150 mM NaCl 80 mM Imidazol
Waschpuffer 3 (pH = 6)	30 mM 2-(N-Morpholino) ethansulfonsäure 0,2 g/L NaN ₃

3.2.3 SDS – Polyacrylamid – Gelelektrophorese (SDS - PAGE)

Zur Analyse des Molekulargewichts sowie zur Bestimmung der Reinheit der Proteine wurden während des Reinigungsprozesses Proben entnommen und mittels SDS-PAGE analysiert. Dazu wurden 0,5 µg der Proteinprobe mit SDS-Probenpuffer (Tabelle 6) versetzt, für 10 min bei 95°C denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte mit einem 10 % Polyacrylamidgel (Tabelle 7) in einer Mini-Gel Twin-Gelkammer (Biometra, Göttingen). Als Größenstandard wurde die PageRuler® Plus Prestained Protein Ladder (6 µL, Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Die Färbung des Gels erfolgte mittels Coomassie Brilliant Blue G-250 nach der Methode von Ausubel *et al.* (2000). Zur Dokumentation sowie zur Reinheitsbestimmung wurde das Gel fotografiert und eine Bildanalyse durchgeführt (Biometra BioDocAnalyse Live System).

Tabelle 6: Puffer für die SDS-PAGE-Analyse

Puffer	Zusammensetzung
SDS-Laufpuffer	1 g/L Natriumdodecylsulfat (SDS) 25 mM Tris 14,41 g/L Glycin
SDS-PAGE-Probenpuffer (5x)	100 g/L SDS 10 mM 2-Mercaptoethanol 20 % (v/v) Glycerin 0,2 M Tris-Hydrochlorid 0,5 g/L Bromphenolblau

Tabelle 7: Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE-Analyse

Sammelgel (5 %)	Trenngel (10 %)
3,645 mL H ₂ O	4,8 mL H ₂ O
0,625 mL 40 % (w/v) Acrylamid	2,5 mL 40 % (w/v) Acrylamid
0,630 mL Tris (1 M; pH = 6,8)	2,5 mL Tris (1,5 M; pH = 8,8)
50 µL 10 % (w/v) SDS	100 µL 10 % (w/v) SDS
50 µL 10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat	100 µL 10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat
5 µL Tetramethylethyldiamin	10 µL Tetramethylethyldiamin

3.2.4 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der gereinigten Fraktionen erfolgte nach Bradford (1976). Hierzu wurden 20 μL Probe mit 780 μL Puffer C und 200 μL Bradford-Reagenz (Roti®-Quant universal, Roth, Karlsruhe) versetzt. Ein Blank ohne Probe wurde in ähnlicher Art hergestellt. Nach 5 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur (RT) wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm mittels Photometer (Eppendorf BioPhotometer plus) gemessen. Als Referenzprotein diente Rinderserumalbumin, welches zur Kalibrierung im Konzentrationsbereich von 0,8 - 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ eingesetzt wurde.

3.2.5 Bestimmung der Enzymaktivität

Die Bestimmung der Aktivität von AtPARP-1 erfolgte durch Quantifizierung des nicht umgesetzten Substrates NAD^+ . Hierzu wurde der gekoppelte Enzymtest „HT Fluorescent Homogeneous PARP Inhibition Assay Kit“ der Firma Trevigen (Gaithersburg, USA) zur Nutzung mit dem AtPARP-1-Protein modifiziert. Dazu wurde Alkoholdehydrogenase aus *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma Aldrich) in Puffer I gelöst (Tabelle 8; 1 U/ μL), wobei diese Lösung für jedes Experiment frisch hergestellt wurde. Stammlösungen der Diaphorase aus *Clostridium kluyveri* (Sigma Aldrich) in Puffer II (Tabelle 8; 0,1 U/ μL) konnten 14 Tage bei 4°C gelagert werden. Soweit nicht anders angegeben, erfolgten alle weiteren Verdünnungsschritte mit Reaktionspuffer (Tabelle 8).

Um die PARP-Aktivität zu bestimmen, wurden 2 pmol gereinigtes Enzym mit 625 ng aktivierter Rinderthymus-DNA (Sigma-Aldrich) in einem Gesamtvolumen von 12,5 μL in Wells einer schwarzen Mikrotiterplatte (Costar 96-Well Half Area Plates, Corning, Kaiserslautern) überführt. Um die Reaktion zu starten, wurde das Substrat NAD^+ in einer Endkonzentration von 100 nM zugegeben, so dass sich ein Gesamtvolumen von 25 μL ergab. Nachfolgend wurde die Reaktion für 90 min bei RT inkubiert. Zur Detektion wurden 25 μL einer Lösung, die 100 μM Resazurin (Sigma-Aldrich), 4 % (v/v) Ethanol (99%, Fluka), 4 mU/mL Alkoholdehydrogenase und 0,4 mU/mL Diaphorase enthielt, zugegeben, so dass sich ein Gesamtvolumen von 50 μL ergab. Die ansteigende Fluoreszenz (λ_{ex} : 568 nm, λ_{em} : 600 nm) des gebildeten Resorufins wurde alle 5 min für 40 min mit einem Mikrotiterplattenspektrophotometer (Spectramax M5, Molecular Devices, Biberach an der Riss) gemessen.

Routinemäßig erfolgte eine Messung in Triplikaten, wobei für alle Auswertungen der Anstieg der Fluoreszenz verwendet wurde. Zur Normalisierung der Daten wurde eine Kalibrationsreihe verschiedener NAD^+ -Konzentrationen zwischen 30 und 150 nM unter

gleichen Bedingungen aber in Abwesenheit des Enzyms gemessen. Die erhaltenen Daten wurden einer Regressionsanalyse mithilfe eines Polynoms zweiter Ordnung unterzogen, wodurch es für alle Reaktionen möglich war, die verbliebenen NAD⁺-Gehalte zu berechnen.

Zur Bestimmung von Inhibitorkonstanten wurden die Substanzen zunächst in DMSO gelöst und je nach zu erwartender Aktivität in Reaktionspuffer verdünnt und zusammen mit 100 nM NAD⁺ untersucht. Kontrollen der zu testenden Substanzen ohne Enzym, Reaktionen ohne Substrat, ohne Inhibitor sowie mit 10 µM 4-ANI wurden in ähnlicher Art und Weise durchgeführt. Die prozentuale Inhibition wurde mittels der Positivkontrolle (10 µM 4-ANI; 100 % Inhibition) und der Negativkontrolle (Reaktionspuffer; 0 % Inhibition) berechnet. IC₅₀-Werte wurden nach einem 4-Parameter-Dosis-Wirkungsmodell mit variablem Hillslope mit Hilfe der Software GraphPad Prism 5.0 berechnet.

Tabelle 8: Puffer für die Analyse der Enzymaktivität

Puffer	Zusammensetzung
Puffer I (pH = 8)	40 mM Tris
Puffer II (pH = 8)	200 mM Tris 300 mM NaCl
Reaktionspuffer (pH = 8)	50 mM Tris 2 mM MgCl ₂

3.3 Zelluläre Testsysteme

Soweit nicht anders angegeben, fanden alle folgenden Arbeiten unter sterilen Bedingungen statt. Dazu wurden alle Medien und -bestandteile entweder bei 121°C für 20 min autoklaviert oder bei nicht ausreichender Thermostabilität durch 0,45 µm Polyvinylfluorid-Filter sterilfiltriert.

3.3.1 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Für alle Experimente wurde der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* AD1-7 (*MATa*; *pdr1--3*; *ura3*; *his1*; *yor1Δ::hisG*; *snq2Δ::hisG*; *pdr5Δ::hisG*; *pdr10Δ::hisG*; *pdr11Δ::hisG*; *ycf1Δ::hisG*; *pdr3Δ::hisG*) verwendet. Dieser Hefe-Stamm wurde mit dem Konstrukt pYES2-*At*PARP-1 bzw. pYES2-*Hs*PARP-1 transfiziert und freundlicherweise von

Professor Dr. E. Peiter (Institut für Pflanzenernährung, Martin-Luther Universität Halle) zur Verfügung gestellt. Zur Kultivierung der Hefezellen wurde Stickstoffbasismedium (1,9 g/L; Formedium, Großbritannien) mit Aminosäurezusätzen (0,77 g/L; Formedium, Großbritannien) verwendet. Das Medium enthielt dabei kein Uracil, um eine auxotrophe Selektion zu gewährleisten. Als Kohlenstoffquelle wurde dem Medium D-Glucose (20 g/L) zugegeben. Zur Induktion der Expression wurde anstatt D-Glucose D-Galaktose (20 g/L) verwendet. Für Festmedien wurde zusätzlich Agar (20 g/L) beigefügt.

Stammkulturen

Zur Gewinnung von Stammkulturen wurden Hefezellen über Nacht in 1 ml SC-Ura-Glucose-Medium bei 30°C und 230 rpm angezogen. 500 µL einer solchen Anzucht wurden mit 500 µL sterilem 50 % (v/v) Glycerin gemischt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Hefe-Assay

Zunächst wurden 20 mL SC-Ura-Glucose-Medium in einen 100 mL Erlenmeyerkolben und mit einer Stammkultur beimpft, so dass die OD_{600nm} ca. 0,1 - 0,2 betrug. Nachfolgend wurde die Kultur für ca. 8-10 h bei 30°C und 230 rpm kultiviert, bis eine OD_{600nm} von ca. 0,5-0,6 erreicht war. Der Kultur wurden danach 10 mL entnommen, bei 6100 g für 5 min zentrifugiert (Beckman Coulter Avanti J-E) und der Überstand verworfen. Das erhaltene Zellpellet wurde in SC-Ura-Medium ohne Kohlenstoffquelle gewaschen und erneut bei 6100 g für 5 min zentrifugiert. Nachfolgend wurde das Pellet in SC-Ura-Galaktose-Medium resuspendiert und soweit verdünnt, bis eine OD_{600nm} von 0,04 erreicht war. 90 µL der erhaltenen Zellsuspension wurden in die entsprechenden Wells einer transparenten 96-Well-Mikrotiterplatte (Greiner) gefüllt. Nachfolgend wurden den Zellen 10 µL der zu untersuchenden Substanzen zugegeben, so dass sich ein Gesamtvolumen von 100 µL ergab. Die Substanzen wurden dabei routinemäßig in DMSO gelöst und auf eine Lösungsmittelkonzentration von 1 % im Test verdünnt. Um Randeffekte zu vermeiden, wurden die äußeren Wells der Mikrotiterplatte mit 200 µL dest. H₂O befüllt. Mittels eines Spectramax M5 Spektralphotometers (Molecular Devices) wurde die OD_{600nm} aller Wells zu Beginn des Tests sowie nach einer Inkubationszeit von 42 h bei 30°C bestimmt. Zur Homogenisierung der Suspension wurden die Mikrotiterplatten unmittelbar vor jeder Messung bei 350 rpm für 5 min geschüttelt. Blanks ohne Zellen, nicht induzierte Kontrollen, Negativkontrollen ohne Inhibitor sowie Positivkontrollen wurden in ähnlicher Art und Weise hergestellt. Als Positivkontrolle diente der für *Hs*PARP-1 bekannte Inhibitor 6-(5H)-

Phenanthridinon (**9**) in einer Konzentration von 100 μM . Alle Messungen erfolgten in Triplikaten. Inhibition sowie IC_{50} -Werte wurden analog zu 3.1.5 bestimmt.

3.3.2 Pflanzenzellassay

Für alle Tests wurden *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Col-0 Zellen verwendet, welche freundlicherweise von der Abteilung Stress- und Entwicklungsbiologie (Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle) zur Verfügung gestellt wurden.

Die Zellen wurden in Suspensionskultur in 250 mL Erlenmeyerkolben mit je 40 mL Murashige-Skoog-Medium mit Gamborg-Vitaminen sowie 1 mg/mL 2,4-Dichlorophenoxyessigsäure (Gamborg *et al.* 1968; Murashige und Skoog 1962) bei 25°C und 120 rpm in Dunkelheit kultiviert. Zur Kulturerhaltung erfolgte nach 7 Tagen eine Passagierung der Kulturen, d. h. 4 mL der Suspension wurden mit 36 mL frischem Medium verdünnt.

Für die Tests wurde 1 mL der frisch subkultivierten Suspensionskultur in Wells einer 12-Well-Mikrotiterplatte (Polystyrol, Arbeitsvolumen: 2-4 mL, Bestellnummer: 665102, Greiner) transferiert. Zur Induktion des oxidativen Stresses wurden der Zellsuspension 15,5 μL 30 % (w/w) Wasserstoffperoxidlösung zugegeben. Weiterhin erfolgte die Zugabe der Testsubstanzen, welche routinemäßig in DMSO gelöst wurden und so mit Medium verdünnt wurden, dass die Lösungsmittelkonzentration 1 % betrug. Abschließend wurden die Wells auf ein Gesamtvolumen von 2 mL mit Medium aufgefüllt. Kontrollen ohne Wasserstoffperoxid bzw. ohne Substanzen wurden in ähnlicher Art und Weise hergestellt. Zur Bestimmung des Zelltodes wurde die Evans Blue-Methode verwendet (Geissler und Wessjohann 2011; Levine *et al.* 1994).

3.4 Ganzpflanzentests

3.4.1 Lemna-Assay

Vor- / Subkultivierung der Wasserlinsen

Axenische Vorkulturen der Spezies *Lemna minor* (CPCC 490) und *Lemna gibba* (CPCC 310) wurden aus dem Canadian Phycological Culture Centre erhalten. Zur Subkultivierung wurde ein 500 mL Erlenmeyerkolben mit 200 mL Steinberg-Medium (ISO 20079) befüllt und mittels einer Impföse wurden 5-7 Lemna Pflanzen aus der Vorkultur überführt. Danach erfolgte eine Kultivierung der Wasserlinsen bei 24°C und 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ kontinuierlichem Licht für 7 - 12 d. Ab einer Konfluenz von ca. 80% wurde jeweils ein neuer Kolben beimpft, so dass kein Stress für die Pflanzen durch Platzmangel bestand.

Lemna-Assay

Die zu testenden Substanzen wurden i. d. R. in DMSO gelöst und durch Zugabe von Steinberg-Medium oder Steinberg-Medium mit verringertem Wasserpotential wurden entsprechende Verdünnungsreihen erstellt. Medium mit verringertem Wasserpotential wurde hergestellt, indem Steinberg-Medium eine entsprechende Menge PEG 6000 zugegeben wurde (Michel und Kaufmann 1973). Nachfolgend wurde dieses Medium mittels eines 0,45 μm -Polyvinylfluorid-Filter sterilfiltriert. Für die Analyse der Substanzen wurden 24-Well Mikrotiterplatten mit verschiedenen Mischungen sterilem Steinberg-Medium bzw. mit Steinberg-Medium mit verringertem Wasserpotential sowie den jeweiligen Substanzmengen befüllt, so dass sich ein Kulturvolumen von 2 mL ergab. Mittels einer Impföse wurden aus der Vorkultur ca. 1 - 2 Lemna-Pflanzen in je ein Well überführt. Kontrollen ohne PEG 6000 oder ohne Testsubstanzen wurden in ähnlicher Weise hergestellt. Um eine erhöhte Verdunstung in den Randbereichen zu vermeiden, wurde der Raum zwischen den Wells mit 19 mL Steinberg-Medium mit verringertem Wasserpotential aufgefüllt. Nachfolgend wurden die Mikrotiterplatten für 7 d analog zu den Vorkulturen inkubiert und alle 24 h mittels eines Lemnatec Scanalysers (Lemnatec GmbH) fotografiert. Daraufhin wurden die Flächen der Pflanzen mittels der SAW Duckweed LT-0004 Software (Lemnatec GmbH) bestimmt. Da es aufgrund der natürlichen Diversität der Pflanzen nicht möglich ist, die gleiche Anfangsmenge an Pflanzenmaterial einzustellen, wurde die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit μ als Parameter zur Auswertung verwendet. Um die Wachstumsgeschwindigkeit zu berechnen, wurden die mittels Bildanalyse ermittelten Flächen AP in logarithmischer Form gegen die

Wachstumszeit und mittels linearer Regression nach Formel 3 ausgewertet. Dieser Wachstumsparameter wurde nachfolgend entweder direkt verwendet oder es wurde die prozentuale Verstärkung des Wachstums in Bezug auf die Kontrolle berechnet. Für Substanzscreenings erfolgte die Testung mit vier Replikaten. Für alle positiv identifizierten Substanzen wurden die erhaltenen Ergebnisse in zwei weiteren unabhängigen Experimenten mit je vier Replikaten bestätigt.

Formel 3: Regressionsmodell nach Sonnleitner und Chmiel (2011) zur Bestimmung der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit μ

$$\ln A_p = \mu \cdot t + \ln A_{p_0}$$

Die Tests in 12-Well-, 6-Well-Mikrotiterplatten sowie in 400 mL Bechergläsern erfolgte analog wie oben beschrieben, wobei Kulturvolumina von 5 mL, 10 mL bzw. 200 mL verwendet wurden.

Bestimmung des Ascorbatgehaltes

Zur Bestimmung des Ascorbatgehaltes wurde die Methode nach Teisseire und Vernet verwendet (2000).

Bestimmung des Glutathiongehalt

Der Gehalt an reduzierten und oxidierten Glutathion wurde nach der Methode von Griffith bestimmt (1980).

Bestimmung des Prolingehaltes

Die Bestimmung des Gehaltes an L-Prolin erfolgte analog Bates *et al.* (1973).

3.4.2 Geotropismus-Assay

Der Geotropismus-Assay nach Maruyama *et al.* (2008) wurde für die Nutzung von *A. thaliana*-Pflanzen modifiziert. Dazu wurde Saatgut des Ökotyps Col-0 zunächst mittels Chlorgas oberflächensterilisiert. 10 Samen wurden je Well einer 24-Well-Mikrotiterplatte eingesät und mit einer gasdurchlässigen Abdeckfolie (BREATHSeal[®], Greiner) verschlossen.

Durch Zugabe von 5 mL 37 % (v/v) HCl zu 10 mL 12 % Natriumhypochlorit Lösung in einem Exsikkator erfolgte die Cl₂-Gas-Produktion. Nach einer Inkubationszeit von 45 min wurde überschüssiges Cl₂-Gas mittels zwei in Reihe geschalteter Saugflaschen entfernt. Nach 12-stündiger Belüftung wurden 30 Samen mit einem sterilen Zahnstocher in zwei Reihen auf ATS-Agar (Estelle und Somerville 1987) in rechteckigen 12 x 12 cm-Petrischalen verteilt. Nach einer Kältestratifikation von 48 h bei 4°C wurden die Petrischalen vertikal stehend bei 24°C für 5 Tage bei einem 16 h/8 h Tag/Nacht-Rhythmus und einer Lichtintensität von 150 μmol Photonen m⁻² s⁻¹ in einem Lichtschrank (Sanyo MLR351H, Bad Nenndorf) inkubiert. Nachfolgend wurden je 12 ungefähr gleich große Keimlinge in 2 Reihen auf Agarplatten mit ATS-Medium mit verringertem Wasserpotential (-0,7 MPa; -1,2 MPa) übertragen. Die Agarplatten wurden nach der Methode von Verslues (2006) hergestellt, wobei die Substanzen 4-ANI (**18**) und 6-CNA (**19**) auf eine Endkonzentration von 10 μM mit einer Endkonzentration von 0,1 % (v/v) DMSO dem noch nicht festen Agarmedium zugegeben wurden. Kontrollen mit ATS-Medium mit normalem Wasserpotential wurden in gleicher Art hergestellt. Nach 24 h wurden die Platten um 180° gedreht, so dass die Wurzeln der Pflanzen nach oben zeigten. Mittels eines Auflichtmikroskops (Olympus CKX41) wurde alle 24 h bei 100-facher Vergrößerung die Wurzelkrümmung untersucht. Dabei wurden nur Wurzeln als positiv und damit vital gezählt, bei denen eine Krümmung >90° vorlag. Für die Auswertung wurde der Anteil der gekrümmten Wurzeln der 24 Pflanzen je Platte aus zwei unabhängigen Experimenten gemittelt.

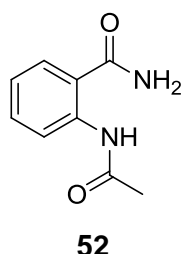
3.5 Statistik

Zur statistischen Analyse sowie zur Darstellung aller Graphen wurde die Software GraphPad Prism 5.0 verwendet. Mittels des D'Agostino-Pearson Omnibus K2-Tests erfolgte die Analyse auf Normalverteilung (D'Agostino und Stephens 1986). Die Überprüfung auf statistisch signifikante Differenzen erfolgte mit dem Student's t-Test.

3.6 Synthese

3.6.1 2-Acetamidobenzamid (52)

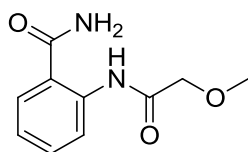
Anthranilamid (136 mg; 1 mmol; 1 eq) in wasserfreiem Tetrahydrofuran (2 mL) wurde unter Schutzgas mit Acetylchlorid (70,6 μL ; 1,2 mmol; 1,2 eq) und Triethylamin (139 μL ; 1,2 mmol; 1,2 eq) versetzt und über Nacht gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das gebildete 2-Acetamidobenzamid wurde mittels Säulenchromatografie an Kieselgel 60 (Ethylacetat / n-Hexan 4:1; Merck KGaA) erhalten.



Das Produkt wurde als weißer Feststoff erhalten (110,5 mg; 62 %). DC (Ethylacetat / n-Hexan 4:1) R_F 0,65; $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD ; 300 MHz) δ = 2,16 (s; 3 H); 7,14 (d; J = 7,6 Hz; 1 H); 7,47 (d; J = 8,5 Hz; 1 H); 7,73 (d; J = 7,9 Hz; 1 H); 8,36 (d; J = 8,5 Hz; 1 H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD ; 75,5 MHz) δ = 24,8; 122,5; 124,4; 129,4; 133,4; 140,2; 171,3; 173,5 ppm; ESI-MS von $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$ = 201,6; $[\text{M}-\text{H}]^-$ = 177,2); HR-MS ($[\text{M}+\text{H}]^+$ = 179,0816220 (gef.) $[\text{M}+\text{H}]^+$ = 179,0815040 (ber.))

3.6.2 2-(2-Methoxyacetamido)benzamid (53)

Anthranilamid (68 mg; 0,5 mmol; 1 eq) in wasserfreiem Tetrahydrofuran (2 mL) wurde unter Wasserausschluss mit Methoxyacetylchlorid (66 μL ; 0,6 mmol; 1,2 eq) und Triethylamin (69 μL ; 0,6 mmol; 1,2 eq) versetzt und über Nacht gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das gebildete 2-(2-Methoxyacetamido)benzamid wurde mittels Säulenchromatografie an Kieselgel 60 (Ethylacetat / n-Hexan 3:1) erhalten.

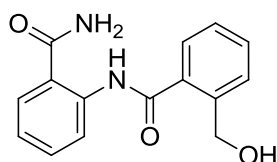


53

Das Produkt wurde als weißer Feststoff erhalten (27,4 mg; 26 %). DC (Ethylacetat / n-Hexan 3:1) R_F 0,44; $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD ; 300 MHz) δ = 3,51 (s; 3 H); 4,02 (s; 2 H); 7,17 (dd, J = 7,8; 1,2 Hz; 1H); 7,50 (dd, J = 8,5; 7,4 Hz; 1H); 7,75 (dd, J = 7,9; 1,4 Hz; 1H) 8,54 (d; J = 8,4 Hz; 1H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD ; 75,5 MHz) δ = 87,9; 101,3; 150,2; 150,3; 152,6; 157,5; 161,4; 167,5; 199,1; 201,3 ppm; ESI-MS von $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$ = 209,0; $[\text{M}-\text{H}]^-$ = 207,8); HR-MS ($[\text{M}+\text{H}]^+$ = 209,0922820 (gef.) $[\text{M}+\text{H}]^+$ = 209,0920690 (ber.))

3.6.3 N-(2-Carbamoylphenyl)-2-(hydroxymethyl)benzamid (54)

Anthranilamid (134 mg; 1 mmol; 1 eq) in wasserfreiem Acetonitril (2 mL) wurde unter Schutzgas mit Phtalid (134 mg; 1 mmol; 1 eq) sowie wasserfreiem ZnCl_2 (1 mg; 1 μmol ; 0,001 eq) versetzt und über Nacht gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das gebildete Anthranildiamid wurde mittels Säulenchromatografie an Kieselgel 60 (Ethylacetat / n-Hexan 3:1) erhalten.

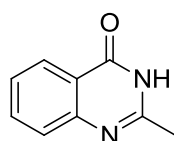


54

Das Produkt wurde als weißer Feststoff erhalten (137,4 mg; 50,8 %). DC (Ethylacetat / n-Hexan 3:1) R_F = 0,56; $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD ; 400 MHz) δ = 5,37 (s; 2 H); 6,61 (ddd; J = 8,1; 7,2; 1,1 Hz; 1H); 6,75 (dd; J = 8,3; 1,0 Hz; 1H); 7,19 (ddd; J = 8,4; 7,2; 1,5 Hz; 1H); 7,51 (dd; J = 8,0; 1,5 Hz; 1H); 7,65 – 7,53 (m; 2H); 7,74 (ddd; J = 7,6; 1,0 Hz; 1H); 7,86 (d; J = 7,7 Hz; 1H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD ; 75,5 MHz) δ = 71,4; 115,9; 117,3; 118,4; 123,7; 126,2; 126,5; 129,7; 130,1; 133,6; 135,4; 148,7; 150,8; 173,4; 174,6 ppm; ESI-MS von $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$ ($[\text{M}]^+$ = 270,0); HR-MS ($[\text{M}+\text{H}]^+$ = 271,1085010 (gef.) $[\text{M}+\text{H}]^+$ = 271,1077190 (ber.))

3.6.4 2-Methylchinazolin-4(3H)-on (55)

Anthranilamid (136 mg; 1 mmol; 1 eq) in wasserfreiem Tetrahydrofuran (2 mL) wurde unter Schutzgas mit Acetylchlorid (69 μ L; 1,2 mmol; 1,2 eq) und Triethylamin (139 μ L; 1,2 mmol; 1,2 eq) versetzt und über Nacht gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das Reaktionsgemisch wurde in 5 mL 1 M NaOH aufgenommen. Das gebildete 2-Methylquinazolin-4(3H)-on wurde mittels Säulenchromatografie an Kieselgel 60 (Ethylacetat) erhalten.

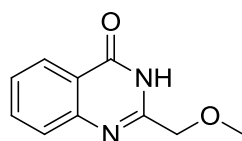


55

Das Produkt wurde als weiß-gelblicher Feststoff erhalten (99 mg; 62 %). DC (Ethylacetat) R_F 0,28; $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD ; 300 MHz) δ = 2,45 (s; 3H); 7,49 (d; J = 12,9 Hz; 1H); 7,61 (d; J = 8,1 Hz; 1H); 7,80 (dd; J = 8,6; 7,2 Hz; 1H); 8,18 (d; J = 8,0 Hz; 1H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD ; 75,5 MHz) δ = 21,4; 121,6; 127,0; 127,1; 127,6; 135,9; 149,8; 156,4; 164,3 ppm; ESI-MS von $\text{C}_9\text{H}_8\text{N}_2\text{O}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$ = 161,2; $[\text{M}+\text{Na}]^+$ = 183,0; $[\text{M}-\text{H}]^-$ = 159,0); HR-MS ($[\text{M}+\text{H}]^+$ = 161,0715349 (gef.) $[\text{M}+\text{H}]^+$ = 161,0709390 (ber.))

3.6.5 2-(Methoxymethyl)chinazolin-4(3H)-on (56)

Anthranilamid (136 mg; 1 mmol; 1 eq) in wasserfreiem Tetrahydrofuran (2 mL) wurde unter Schutzgas mit Methoxyacetylchlorid (109 μ L; 1,2 mmol; 1,2 eq) und Triethylamin (139 μ L; 1,2 mmol; 1,2 eq) versetzt und über Nacht gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das Reaktionsgemisch wurde in 5 mL 1 M NaOH aufgenommen. Das gebildete 2-Methylquinazolin-4(3H)-on wurde mittels Säulenchromatografie an Kieselgel 60 (Ethylacetat / n-Hexan 3:1) erhalten.

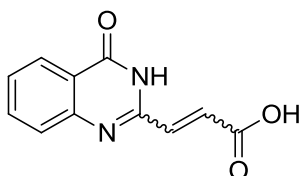


56

Das Produkt wurde als weiß-gelblicher Feststoff erhalten (85 mg; 45 %). DC (Ethylacetat / n-Hexan 3:1) R_F 0,40; $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD ; 300 MHz) δ = 3,55 (s; 3H); 7,51 – 7,46 (m; 1H); 7,66 (d; J = 7,8 Hz; 1H); 7,77 (ddd; J = 8,5; 7,2; 1,5 Hz; 1H); 8,29 (dd; J = 8,0; 1,5 Hz; 1H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD ; 75,5 MHz) δ = 58,8; 65,5; 121,0; 126,8; 126,2; 126,8; 134,7; 147,8; 148,4; 161,6 ppm; ESI-MS von $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$ = 212,9; $[\text{M}-\text{H}]^-$ = 189,3); HR-MS ($[\text{M}+\text{H}]^+$ = 191,0805199 (gef.) $[\text{M}+\text{H}]^+$ = 191,0815040 (ber.))

3.6.6 3-(4-Oxo-3,4-dihydrochinazolin-2-yl)acrylsäure (57)

Anthranilamid (68 mg; 0,5 mmol; 1 eq) in wasserfreiem Tetrahydrofuran (5 mL) wurde unter Schutzgas mit Maleinsäureanhydrid (49 mg; 0,5 mmol; 1 eq) versetzt und über Nacht gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das Reaktionsgemisch wurde in 5 mL 1 M NaOH aufgenommen. Die Wasserphase wurde dreimal mit 25 mL Dichlormethan extrahiert und nachfolgend tropfenweise mit 1 M HCl auf einen pH-Wert von 2 angesäuert. Das Gemisch wurde bei 4°C über Nacht inkubiert und das ausgefallene Chinazolinon abfiltriert.



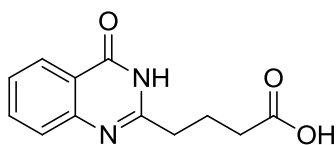
57

Das Produkt wurde als weißer Feststoff erhalten (48 mg; 44 %). DC (Ethylacetat + 0,1 % AcOH) R_F 0,13; $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD ; 300 MHz) δ = 6,57 (d; J = 12,9 Hz; 1H); 6,89 (d; J = 12,9 Hz; 1H); 7,65 (dd; J = 8,2; 7,3 Hz; 1H); 7,74 (d; J = 8,2 Hz; 1H); 7,92 (dd; J = 9,8; 7,2 Hz; 1H); 8,27 (d; J = 9,9 Hz; 1H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD ; 75,5 MHz) δ = 122,3; 126,5; 127,7; 129,7; 132,3; 134,6; 136,7; 152,5; 157,7; 162,7; 167,7 ppm; ESI-MS von $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$ = 217,4; $[\text{M}+\text{Na}]^+$ = 239,3; $[\text{M}+\text{K}]^+$ = 255,1; $[\text{M}-\text{H}]^-$ = 215,3); HR-MS ($[\text{M}+\text{Na}]^+$ = 239,0416383 (gef.) $[\text{M}+\text{Na}]^+$ = 239,042714 (ber.))

3.6.7 4-(4-Oxo-3,4-dihydrochinazolin-2-yl)butansäure (58)

Anthranilamid (68 mg; 0,5 mmol; 1 eq) in wasserfreiem Tetrahydrofuran (2 mL) wurde unter Schutzgas mit Glutarsäureanhydrid (57 mg; 0,6 mmol; 1,2 eq) versetzt und über Nacht gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum vom Lösungsmittel befreit.

Das Reaktionsgemisch wurde in 5 mL 1 M NaOH aufgenommen. Die Wasserphase wurde dreimal mit 25 mL Dichlormethan extrahiert und nachfolgend tropfenweise mit 1 M HCl auf einen pH-Wert von 2 angesäuert. Das Gemisch wurde bei 4°C über Nacht inkubiert und das ausgefallene Chinazolinon abfiltriert.



58

Das Produkt wurde als weißer Feststoff erhalten (44 mg; 38 %). DC (Ethylacetat + 0,1 % AcOH) R_F 0,15; $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD ; 300 MHz) δ = 2,18 – 2,03 (*m*; 2H); 2,35 (*t*, J = 7,4 Hz; 2H); 2,80 – 2,69 (*m*; 2H); 7,43 (*ddd*, J = 8,1; 7,1; 1,2 Hz; 1H); 7,61 (*dd*, J = 8,2; 0,5 Hz; 1H); 7,73 (*ddd*, J = 8,5; 7,1; 1,5 Hz; 1H); 8,18 (*dd*, J = 8,0; 1,1 Hz; 1H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz; CD_3OD) δ = 26,1; 36,9; 38,3; 121,6; 126,7; 126,9; 127,0; 135,1; 150,3; 161,9; 167,0; 181,9 ppm; ESI-MS von $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$ = 233,0; $[\text{M}+\text{Na}]^+$ = 255,3; $[\text{M}-\text{H}]^-$ = 231,3); HR-MS ($[\text{M}+\text{Na}]^+$ = 255,0743322 (gef.) $[\text{M}+\text{Na}]^+$ = 255,0734650 (ber.))

3.7 Analytik

3.7.1 Dünnschichtchromatografie (DC)

Zur dünn-schichtchromatografischen Analyse wurden mit Kieselgel 60 F254 (Schichtdicke 0,2 mm; Merck, Darmstadt) beschichtete Aluminiumfolien verwendet. Dazu wurde die Probe im jeweiligen Lösungsmittel punktförmig auf die DC-Platten aufgetragen. Die Entwicklung erfolgte in einer mit dem jeweiligen Lösungsmittel gesättigten Kammer. Nach der Trocknung wurden die Platten im Tageslicht und zusätzlich bei Licht der Wellenlängen 254 nm bzw. 366 nm ausgewertet und dokumentiert (Camag Reprostar 3). Zur Charakterisierung der Banden wurden die R_F -Werte nach Formel 4 berechnet.

Formel 4: Berechnung des R_F -Wertes

$$R_F = \frac{\text{Laufstrecke der Bande [mm]}}{\text{Laufstrecke der mobilen Phase [mm]}}$$

3.7.2 Massenspektrometrie

Die ESI-MS-Spektren wurden mit einem API-150EX Massenspektrometer (Applied Biosystems, Darmstadt) aufgenommen (Sprayspannung +5 kV bzw. -4,2 kV). Die Probenaufgabe erfolgte mittels Direkteinlass. Die Temperatur der Ionenquelle betrug 400°C, bei einem Vakuumdruck von $2,4 \cdot 10^{-5}$ Torr.

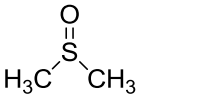
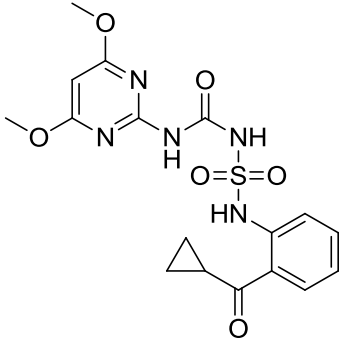
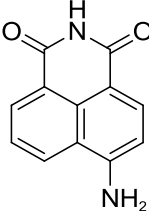
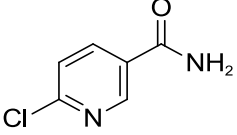
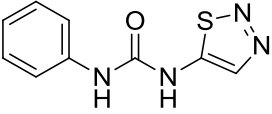
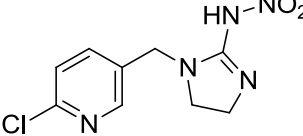
Die hochaufgelösten ESI-Massenspektren wurden mit einem Bruker APEX III Fouriertransformations-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometer, welches mit einer externen Apollo-Ionenquelle, einer InfinityTM-Zelle und einem 7,0 Tesla supraleitendem Magneten (Bruker, Karlsruhe) ausgestattet ist, aufgenommen. Mittels Spritzenpumpe wurden die Probenlösungen bei 120 µL/h kontinuierlich injiziert. Zur Auswertung der erhaltenen Spektren wurde die Software XMASS 6.1.2 (Bruker Daltonik, Bremen) verwendet. Alle Massenspektren wurden gemittelt und untergrundkorrigiert.

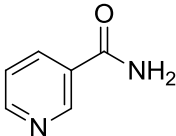
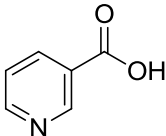
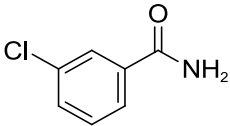
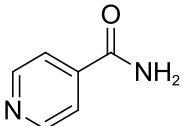
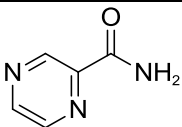
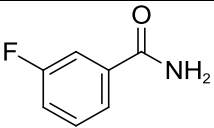
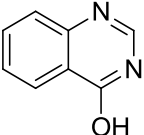
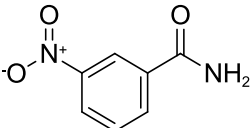
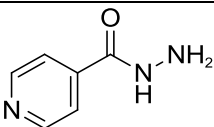
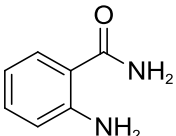
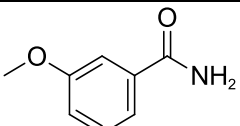
3.7.3 NMR-Spektroskopie

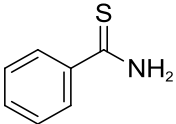
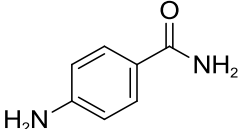
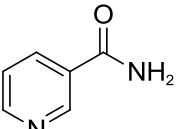
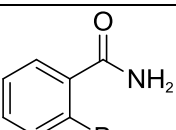
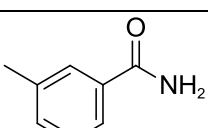
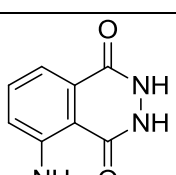
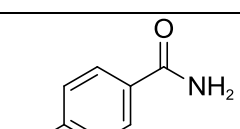
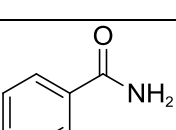
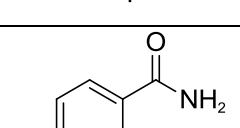
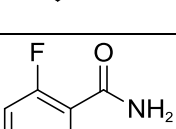
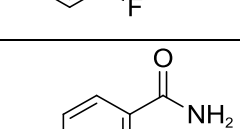
¹H-NMR-, ¹³C-NMR-Spektren wurden mit einem VARIAN UNITY 400 (¹H-NMR: 399,94 MHz, ¹³C-NMR: 100,57 MHz) aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben und sind auf internes Tetramethylsilan (¹H-NMR: 0 ppm) bzw. die internen Lösungsmittelsignale D₂O (¹H-NMR: 4,83 ppm), Dimethylsulfoxid-D₆ (¹H-NMR: 2,5 ppm, ¹³C-NMR: 39,5 ppm) bzw. Methanol-D₄ (¹H-NMR: 3,3 ppm, ¹³C-NMR: 49 ppm) referenziert.

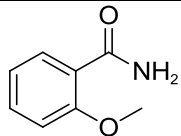
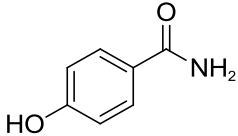
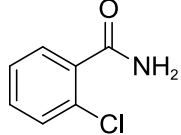
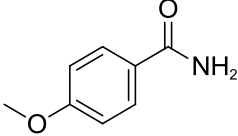
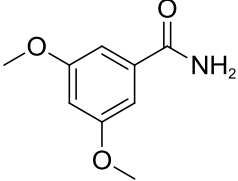
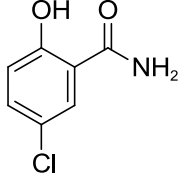
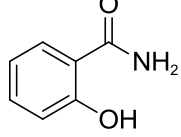
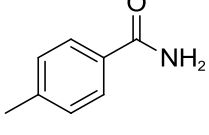
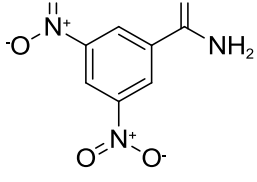
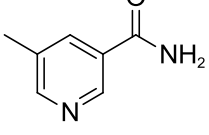
4. Anhang

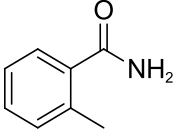
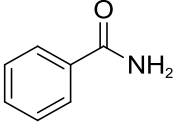
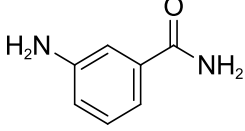
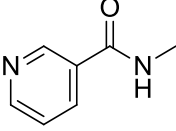
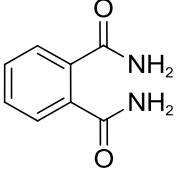
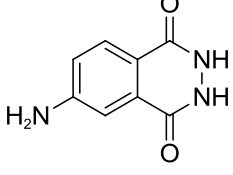
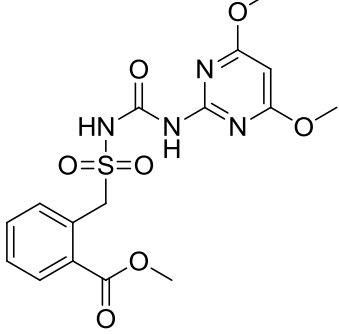
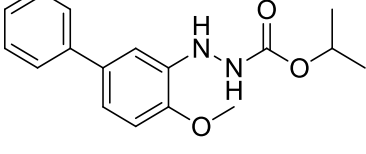
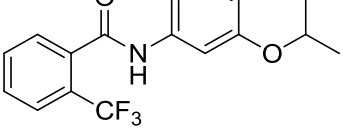
Tabelle A.1: Ergebnisse der Untersuchung der Substanzbibliotheken

Nr.	Struktur	IUPAC - Name [Trivialname]	Wachstumsgeschwindigkeit [d^{-1}] <i>L. minor</i> bei 10 μ M Testsubstanz (Mittelwert \pm SF)
-		Dimethylsulfoxid/ Lösungsmittelkontrolle	0,207 \pm 0,009 [1 % (v/v)]
26		- [Cyclosulfuron]	0,074 \pm 0,019
18		4-Amino-1,8-naphthalimid [-]	0,238 \pm 0,017
19		6-Chloronicotinsäure [-]	0,229 \pm 0,008
29		1-Phenyl-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)harnstoff [Thidiazuron]	0,159 \pm 0,022
21		- [Imidacloprid]	0,184 \pm 0,013

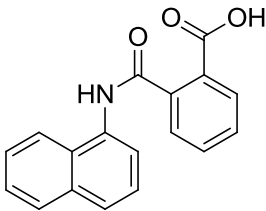
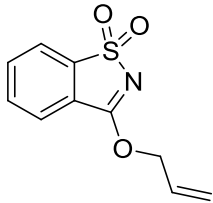
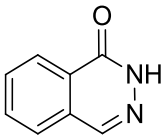
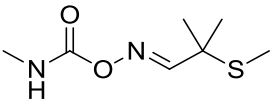
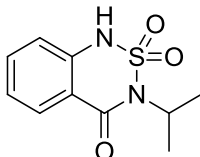
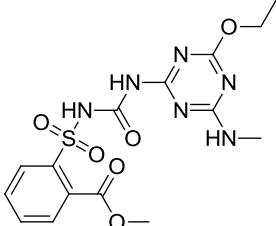
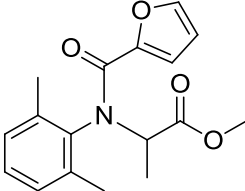
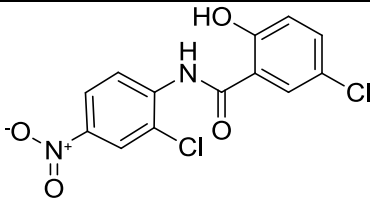
59		Nikotinamid [-]	0,207 ± 0,010
60		Nikotinsäure [-]	0,232 ± 0,003
61		3-Chlorobenzamid [-]	0,255 ± 0,016
62		Isonicotinamid [-]	0,232 ± 0,013
63		Pyrazinamid [-]	0,167 ± 0,017
64		3-Fluorobenzamid [-]	0,171 ± 0,014
65		4-Hydroxychinazolin [-]	0,131 ± 0,008
66		3-Nitrobenzamid [-]	0,163 ± 0,014
67		Isonicotinhydrazid [-]	0,161 ± 0,020
68		2-Aminobenzamid [-]	0,124 ± 0,012
69		3-Methoxybenzamid [-]	0,169 ± 0,021

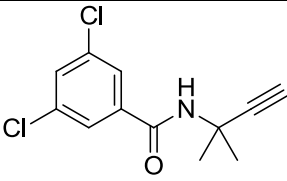
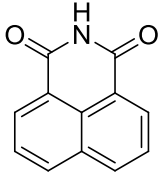
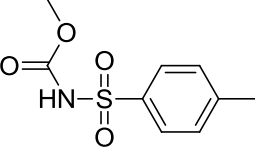
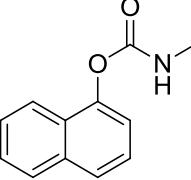
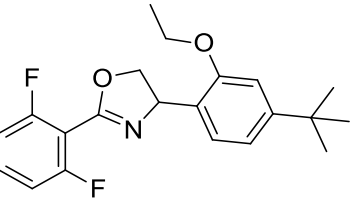
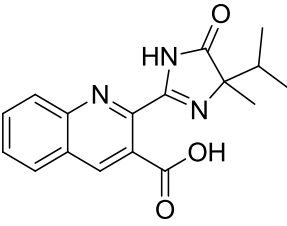
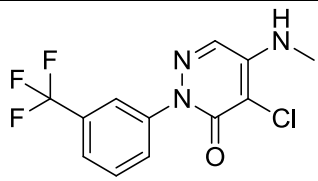
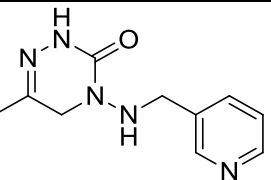
70		Thiobenzamid [-]	0,183 ± 0,025
71		4-Aminobenzamid [-]	0,137 ± 0,010
72		Nikotinamid [-]	0,163 ± 0,004
73		2-Brombenzamid [-]	0,177 ± 0,009
74		3-Methylbenzamid [-]	0,169 ± 0,004
75		3-Aminophthalhydrazid [-]	0,175 ± 0,009
76		4-Brombenzamid [-]	0,159 ± 0,008
77		2-Fluorbenzamid [-]	0,171 ± 0,010
78		4-Fluorobenzamid [-]	0,158 ± 0,012
79		2,6-Difluorbenzamid [-]	0,187 ± 0,020
80		4-Chlorbenzamid [-]	0,1908 ± 0,029

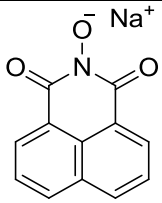
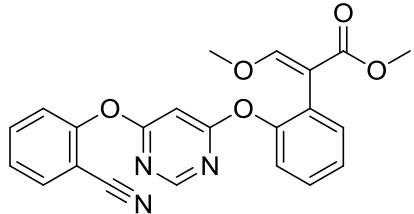
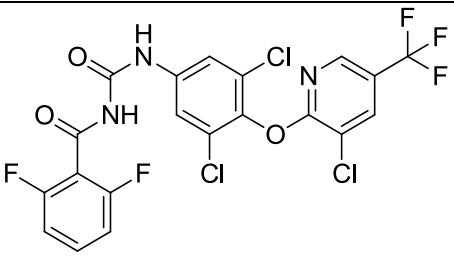
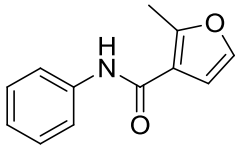
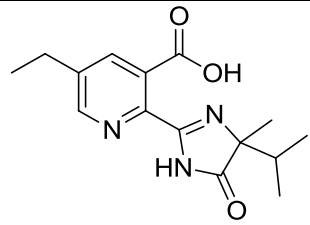
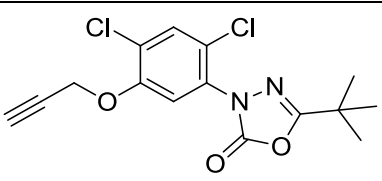
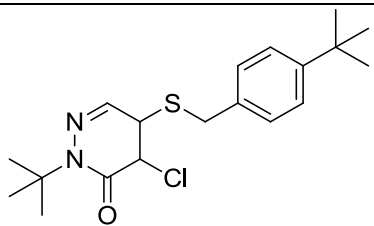
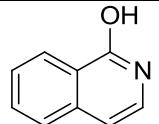
81		2-Methoxybenzamid [-]	0,129 ± 0,009
82		4-Hydroxybenzamid [-]	0,128 ± 0,006
83		2-Chlorbenzamid [-]	0,085 ± 0,009
84		4-Methoxybenzamid [-]	0,143 ± 0,009
85		3,5-Dimethoxybenzamid [-]	0,149 ± 0,014
86		5-Chlorosalicylamid [-]	0,096 ± 0,005
87		2-Hydroxybenzamid [-]	0,149 ± 0,008
88		4-Methylbenzamid [-]	0,146 ± 0,018
89		3,5-Dinitrobenzamid [-]	0,130 ± 0,014
90		5-Methylnicotinamid [-]	0,122 ± 0,026

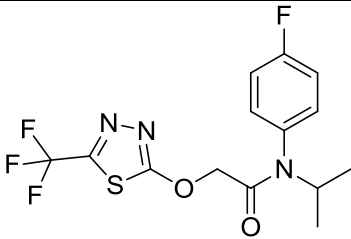
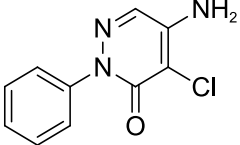
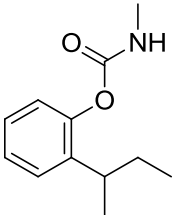
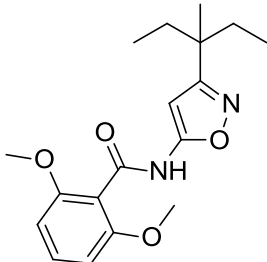
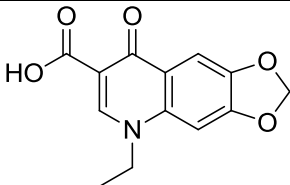
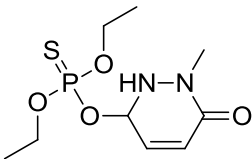
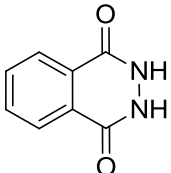
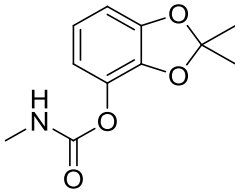
91		2-Methylbenzamid [-]	0,171 ± 0,011
92		Benzamid [-]	0,110 ± 0,004
93		3-Aminobenzamid [-]	0,138 ± 0,016
94		8-Methylnicotinamid [-]	0,124 ± 0,010
95		Phtalamid [-]	0,100 ± 0,007
96		4-Aminophthalhydrazid [-]	0,153 ± 0,009
97		Methyl 2-((N-((4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl)carbamoyl)sulfamoyl)methyl)benzoat [Bensulfuron-Methyl]	0,098 ± 0,002
98		Isopropyl 2-(4-methoxy-[1,1'-biphenyl]-3-yl)hydrazinecarboxylat [Bifenazat]	0,137 ± 0,010
99		N-(3-Isopropoxyphenyl)-2-(trifluoromethyl)benzamid [Flutolanil]	0,151 ± 0,013

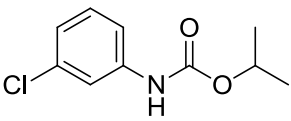
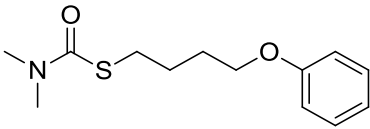
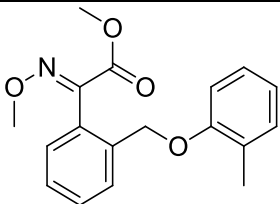
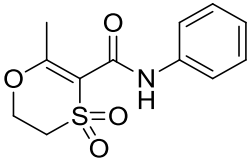
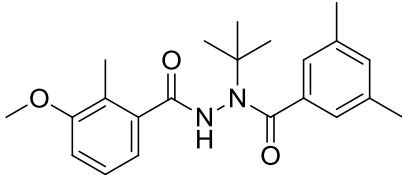
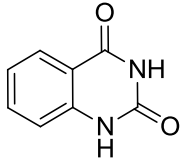
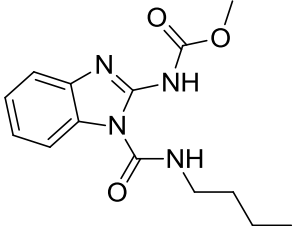
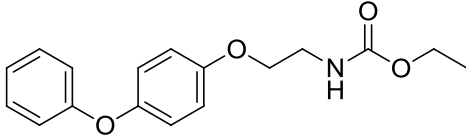
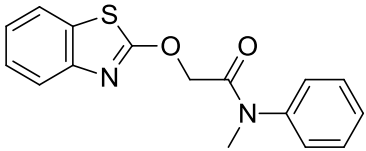
100		S-((5-Methoxy-2-oxo-1,3,4-thiadiazol-3(2H)-yl)methyl) O,O-dimethyl phosphorodithioat [Methidathion]	0,161 ± 0,027
101		S-((6-Chloro-2-oxobenzo[d]oxazol-3(2H)-yl)methyl) O,O-diethyl phosphorodithioat [Phosalon]	0,127 ± 0,003
102		Thionicotinamid [-]	0,152 ± 0,011
103		6(5H)-Phenanthridion [-]	0,132 ± 0,004
104		O,O-Diisopropyl S-(2-(phenylsulfonamido)ethyl) phosphorodithioat [Bensulid]	0,187 ± 0,028
105		3-((Ethoxycarbonyl)amino) phenyl phenylcarbamate [Desmedipham]	0,156 ± 0,014
106		5-(2-Chloro-4-(trifluoromethyl)phenoxy)-N-(methylsulfonyl)-2-nitrobenzamid [Fomesafen]	0,129 ± 0,008

107		2-(Naphthalen-1-ylcarbamoyl)benzoessäure [Naptalam]	0,173 ± 0,022
108		3-(Allyloxy)benzo[d]isothiazole 1,1-dioxid [Probenazol]	0,165 ± 0,017
109		1(2 <i>H</i>)-Phthalazinon [-]	0,137 ± 0,009
110		2-Methyl-2-(methylthio)propanal O-methylcarbamoyl oxim [Aldicarb]	0,175 ± 0,020
111		3-Isopropyl-1 <i>H</i> -benzo[c][1,2,6]thiadiazin-4(3 <i>H</i>)-one 2,2-dioxid [Bentazone]	0,166 ± 0,019
112		Methyl 2-(<i>N</i> -((4-ethoxy-6-(methylamino)-1,3,5-triazin-2-yl)carbamoyl)sulfamoyl)benzoat [Ethamethsulfuron-methyl]	0,138 ± 0,015
113		Methyl 2-(<i>N</i> -(2,6-dimethylphenyl)furan-2-carboxamido)propanoat [Furalaxyl]	0,175 ± 0,020
114		5-Chloro- <i>N</i> -(2-chloro-4-nitrophenyl)-2-hydroxybenzamid [Niclosamid]	0,166 ± 0,019

115		3,5-Dichloro- <i>N</i> -(2-methylbut-3-yn-2-yl)benzamid [Propyzamid]	0,138 ± 0,015
116		1,8-Naphthalimid [-]	0,175 ± 0,020
117		Methyl tosylcarbamate [Asulam]	0,166 ± 0,019
118		Naphthalen-1-yl methylcarbamate [Carbaryl]	0,138 ± 0,015
119		4-(4-(Tert-butyl)-2-ethoxyphenyl)-2-(2,6-difluorophenyl)-4,5-dihydrooxazol [Etoxazole]	0,175 ± 0,018
120		2-(4-Isopropyl-4-methyl-5-oxo-4,5-dihydro-1 <i>H</i> -imidazol-2-yl)quinoline-3-carbonsäure [Imazaquin]	0,100 ± 0,004
121		4-Chloro-5-(methylamino)-2-(3-(trifluoromethyl)phenyl)pyridazin-3(2 <i>H</i>)-on [Norflurazon]	0,111 ± 0,004
122		6-Methyl-4-((pyridin-3-ylmethyl)amino)-4,5-dihydro-1,2,4-triazin-3(2 <i>H</i>)-on [Pymetrozin]	0,168 ± 0,018

123		<i>N</i> -Hydroxynaphthalimid Natriumsalz [-]	0,132 ± 0,027
124		Methyl 2-(2-((6-(2-cyanophenoxy)pyrimidin-4-yl)oxy)phenyl)-3-methoxyacrylat [Azoxytrobilin]	0,173 ± 0,013
125		<i>N</i> -((3,5-Dichloro-4-((3-chloro-5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl)oxy)phenyl)carbamoyl)-2,6-difluorobenzamid [Chlorfluazuron]	0,175 ± 0,020
126		2-Methyl- <i>N</i> -phenylfuran-3-carboxamid [Fenfuram]	0,166 ± 0,019
127		5-Ethyl-2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-4,5-dihydro-1 <i>H</i> -imidazol-2-yl)nikotinsäure [Imazethapyr]	0,138 ± 0,015
128		5-(Tert-butyl)-3-(2,4-dichloro-5-(prop-2-yn-1-yloxy)phenyl)-1,3,4-oxadiazol-2(3 <i>H</i>)-on [Oxadiargyl]	0,175 ± 0,020
129		2-(Tert-butyl)-5-((4-(tert-butyl)benzyl)thio)-4-chloro-4,5-dihydropyridazin-3(2 <i>H</i>)-on [Pyridaben]	0,166 ± 0,019
130		1-Hydroxyisochinolin [-]	0,138 ± 0,015

131		<i>N</i> -(4-Fluorophenyl)- <i>N</i> -isopropyl-2-((5-(trifluoromethyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl)oxy)acetamid [Flufenacet]	0,175 ± 0,020
132		5-Amino-4-chloro-2-phenylpyridazin-3(2 <i>H</i>)-on [Chloridazon]	0,166 ± 0,019
133		2-(Sec-butyl)phenyl methylcarbamat [Fenobucarb]	0,138 ± 0,015
134		2,6-Dimethoxy- <i>N</i> -(3-(3-methylpentan-3-yl)isoxazol-5-yl)benzamid [Isoxaben]	0,156 ± 0,012
135		5-Ethyl-8-oxo-5,8-dihydro-[1,3]dioxolo[4,5- <i>g</i>]quinoline-7-carbonsäure [Oxolinsäure]	0,126 ± 0,016
136		<i>O,O</i> -Diethyl <i>O</i> -(1-methyl-6-oxo-1,2,3,6-tetrahydro-pyridazin-3-yl)phosphorothioat [Pyridaphenthion]	0,152 ± 0,013
137		2,3-Dihydro-1,4-phthalazindion [-]	0,127 ± 0,024
138		2,2-Dimethylbenzo[<i>d</i>][1,3]dioxol-4-yl methylcarbamat [Bendiocarb]	0,153 ± 0,020

139		Isopropyl (3-chlorophenyl)carbamate [Chlorpropham]	0,120 ± 0,019
140		S-(4-Phenoxybutyl)dimethylcarbamothioate [Fenothiocarb]	0,134 ± 0,024
141		Methyl 2-(methoxyimino)-2-(2-((o-tolyloxy)methyl)phenyl)acetate [Kresoxim-methyl]	0,120 ± 0,010
142		2-Methyl-N-phenyl-5,6-dihydro-1,4-oxathiin-3-carboxamide 4,4-dioxide [Oxycarboxin]	0,106 ± 0,035
143		N-(Tert-butyl)-N-(3,5-dimethylbenzoyl)-3-methoxy-2-methylbenzohydrazide [Methoxyfenozid]	0,161 ± 0,013
144		2,4(1H,3H)-Chinazolindion [-]	0,100 ± 0,020
145		Methyl (1-(butylcarbamoyl)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)carbamate [Benomyl]	0,122 ± 0,019
146		Ethyl(2-(4-phenoxyphenoxy)ethyl) carbamate [Fenoxycarb]	0,049 ± 0,005
147		2-(Benzo[d]thiazol-2-yloxy)-N-methyl-N-phenylacetamide [Mefenacet]	0,136 ± 0,006

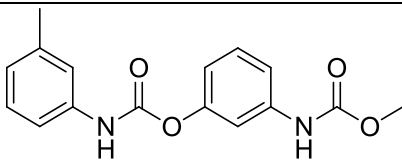
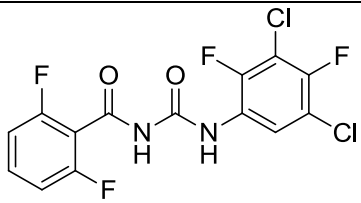
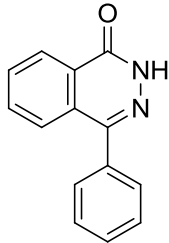
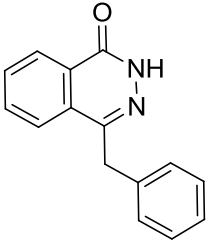
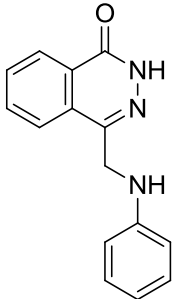
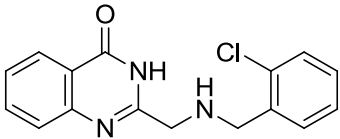
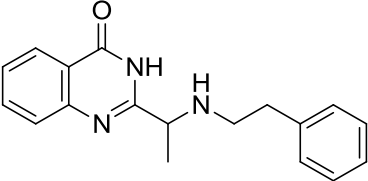
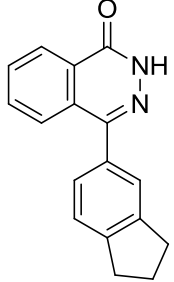
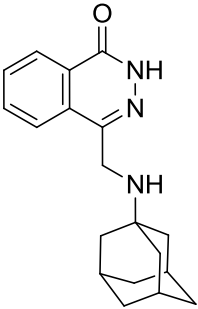
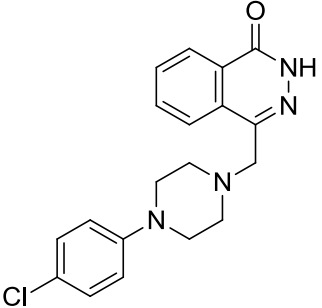
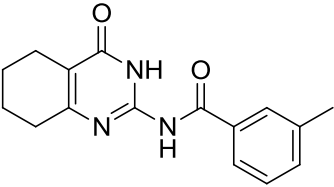
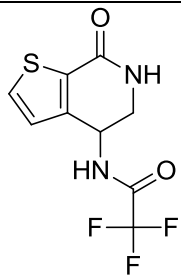
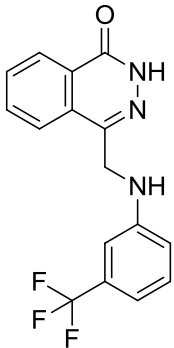
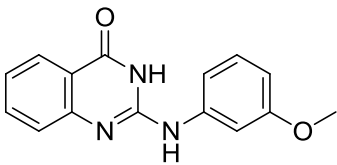
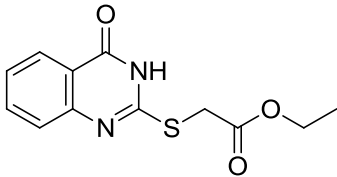
148	 <p>The structure shows two benzene rings connected by a carbamate group (-NH-CO-O-). The left ring has a methyl group at the 3-position. The right ring has a methoxycarbonyl group (-NH-CO-O-CH₃) at the 3-position.</p>	3-((Methoxycarbonyl)amino) phenyl m-tolylcarbamate [Phenmedipham]	0,171 ± 0,019
149	 <p>The structure shows two benzene rings connected by a carbamoyl group (-NH-CO-NH-). The left ring has fluorine atoms at the 2 and 6 positions. The right ring has fluorine atoms at the 2 and 4 positions and chlorine atoms at the 3 and 5 positions.</p>	N-((3,5-Dichloro-2,4- difluorophenyl)carbamoyl)- 2,6- difluorobenzamid [Teflubenzuron]	0,117 ± 0,043

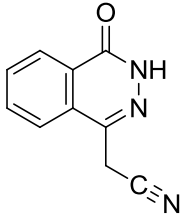
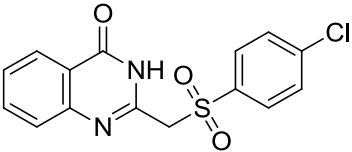
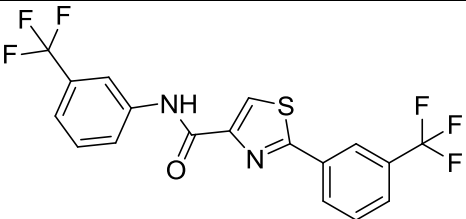
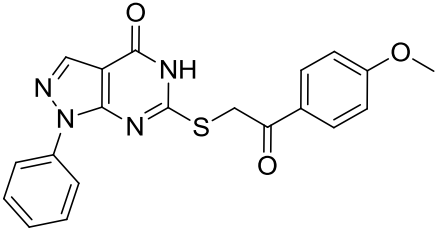
Tabelle A.2: Ergebnisse der Untersuchung der Substanzbibliotheken

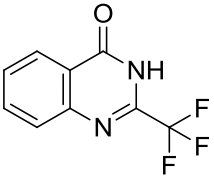
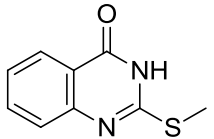
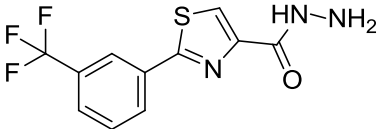
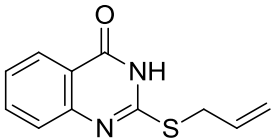
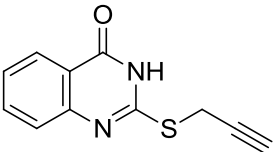
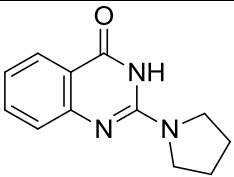
Nr.	Struktur	IUPAC-Name	Protein-Assay $IC_{50} \pm SF$ [μM]	Hefe-Assay $IC_{50}(HsPARP-1) \pm SF$ $IC_{50}(AtPARP-1) \pm SF$ [μM]	Wachstums- geschwindigkeit [d^{-1}] <i>L. minor</i> bei 10 μM Testsubstanz (Mittelwert $\pm SF$)
34		4-Phenyl- phthalazin-1(2H)- on	0,529 \pm 0,126	0,97 \pm 0,37 1,75 \pm 0,30	0,173 \pm 0,007
35		4-Benzyl- phthalazin-1(2H)- on	0,522 \pm 0,33	4,92 \pm 0,88 0,90 \pm 0,05	0,234 \pm 0,009

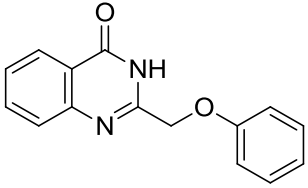
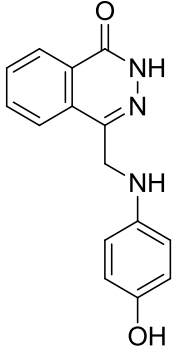
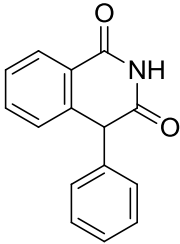
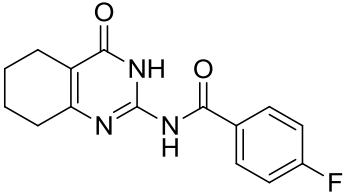
36		4-((Phenylamino)methyl)phthalazin-1(2H)-on	$0,08 \pm 0,046$	$1,65 \pm 2,12$ $0,073 \pm 0,03$	$0,152 \pm 0,01$
37		2-(((2-Chlorobenzyl)amino)methyl)chinazolin-4(3H)-on	$4,62 \pm 1,18$	$11,0 \pm 0,33$ $13,3 \pm 0,60$	$0,195 \pm 0,017$
38		2-(1-(Phenethylamino)ethyl)chinazolin-4(3H)-on	$3,74 \pm 1,17$	$2,03 \pm 0,28$ $1,97 \pm 0,95$	$0,258 \pm 0,012$
39		4-(2,3-Dihydro-1H-inden-5-yl)phthalazin-1(2H)-on	$0,81 \pm 0,07$	$2,27 \pm 0,10$ $19,3 \pm 1,18$	$0,243 \pm 0,023$

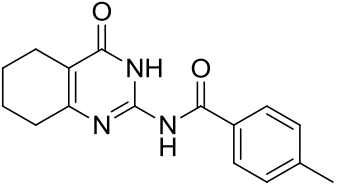
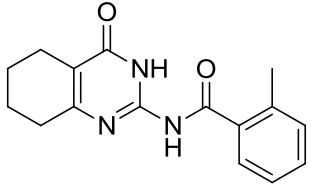
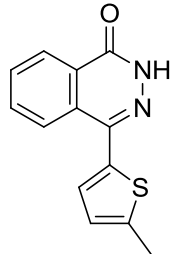
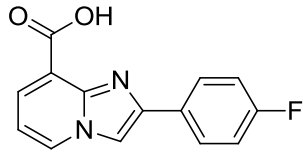
40		4-(((3s,5s,7s)-Adamantan-1-ylamino)methyl)phthalazin-1(2 <i>H</i>)-on	1,62 ± 1,17	n.b. 6,22 ± 0,01	0,238 ± 0,012
41		4-((4-(4-Chlorophenyl)piperazin-1-yl)methyl)phthalazin-1(2 <i>H</i>)-on	59,0 ± 1,13	>100 >100	0,189 ± 0,029
42		3-Methyl- <i>N</i> -(4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahydrochinazolin-2-yl)benzamid	11,05 ± 1,28	>100 >100	0,223 ± 0,011

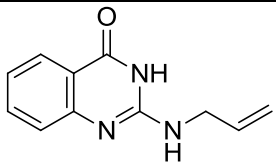
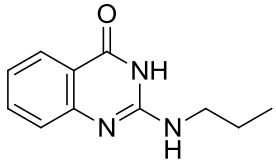
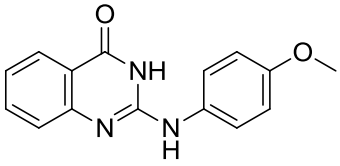
43		2,2,2-Trifluoro- <i>N</i> -(7-oxo-4,5,6,7-tetrahydrothieno[2,3-c]pyridin-4-yl)acetamid	$13,6 \pm 1,55$	>100 >100	$0,173 \pm 0,035$
44		4-(((3-(Trifluoromethyl)phenyl)amino)methyl)phthalazin-1(2 <i>H</i>)-on	$1,97 \pm 0,21$	$0,40 \pm 0,83$ $0,30 \pm 0,77$	$0,209 \pm 0,014$
45		2-((3-Methoxyphenyl)amino)chinazolin-4(3 <i>H</i>)-on	$0,484 \pm 0,162$	$20,9 \pm 0,66$ $0,45 \pm 0,18$	$0,151 \pm 0,027$
46		Ethyl 2-((4-oxo-3,4-dihydrochinazolin-2-yl)thio)acetat	$0,93 \pm 0,06$	$0,66 \pm 1,15$ $0,61 \pm 0,27$	$0,252 \pm 0,010$

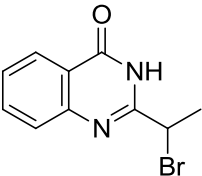
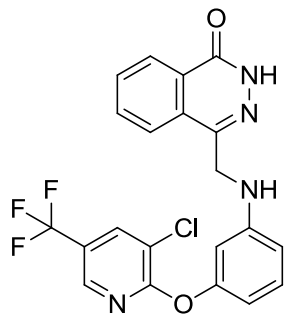
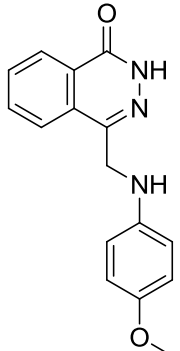
47		2-(4-Oxo-3,4-dihydrophthalazin-1-yl)acetonitril	$0,707 \pm 0,21$	$0,128 \pm 1,44$ $1,87 \pm 0,05$	$0,197 \pm 0,007$
48		2-(((4-Chlorophenyl)sulfonyl)methyl)chinazolin-4(3H)-on	$2,77 \pm 1,46$	$0,49 \pm 0,37$ $3,62 \pm 0,24$	$0,238 \pm 0,004$
49		N,2-bis(3-(Trifluoromethyl)phenyl)thiazol-4-carboxamid	>100	n.b. n.b.	$0,255 \pm 0,007$
50		6-((2-(4-Methoxyphenyl)-2-oxoethyl)thio)-1-phenyl-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4(5H)-on	>100	n.b. n.b.	$0,197 \pm 0,002$

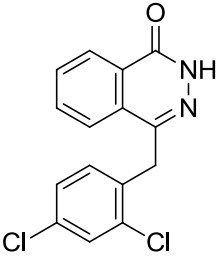
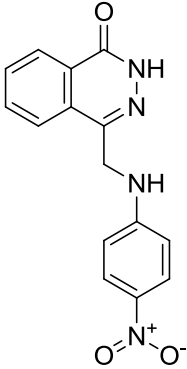
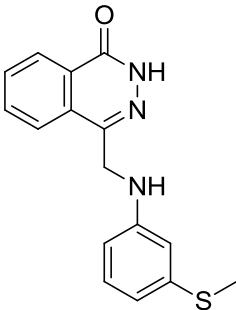
150		2-(Trifluoromethyl) chinazolin-4(3 <i>H</i>)- on	>100	n.b. n.b.	0,190 ± 0,007
151		2-(Methylthio) chinazolin-4(3 <i>H</i>)- on	1,46 ± 0,152	n.b. 1,30 ± 0,34	0,228 ± 0,018
152		2-(3- (Trifluoromethyl) phenyl)thiazol-4- carbohydrazid	>100	n.b. n.b.	0,175 ± 0,035
153		2-(Allylthio)- chinazolin-4(3 <i>H</i>)- on	3,62 ± 1,84	3,98 ± 0,10 2,11 ± 0,36	0,170 ± 0,008
154		2-(Prop-2-in-1- ylthio)- chinazolin-4(3 <i>H</i>)- on	15,5 ± 1,28	8,21 ± 0,34 5,20 ± 3,49	0,198 ± 0,014
155		2-(Pyrrolidin-1-yl)- chinazolin-4(3 <i>H</i>)- on	11,1 ± 1,22	>100 >100	0,144 ± 0,011

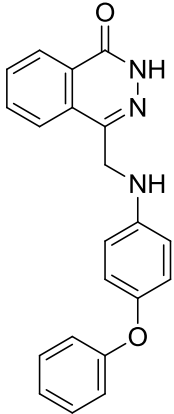
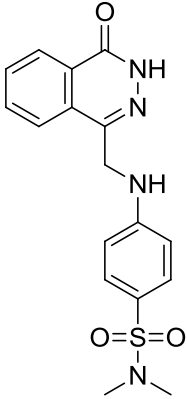
156		2-(Phenoxy)methyl- chinazolin-4(3 <i>H</i>)- on	31,09 ± 0,09	n.b. 45,0 ± 12,8	0,264 ± 0,010
157		4-(((4- Hydroxyphenyl) amino)methyl)- phthalazin-1(2 <i>H</i>)- on	3,62 ± 1,80	43,9 ± 0,94 2,62 ± 0,03	0,247 ± 0,009
158		4-Phenyl- isochinolin-1,3(2 <i>H</i> , 4 <i>H</i>)-dion	>100	n.b. n.b.	0,131 ± 0,007
159		4-Fluoro- <i>N</i> -(4-oxo- 3,4,5,6,7,8- hexahydro- chinazolin-2- yl)benzamid	15,5 ± 1,28	>100 >100	0,183 ± 0,028

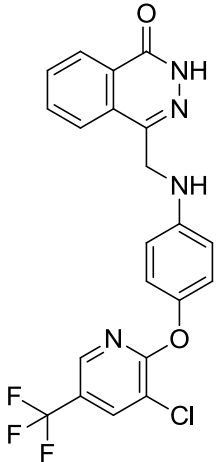
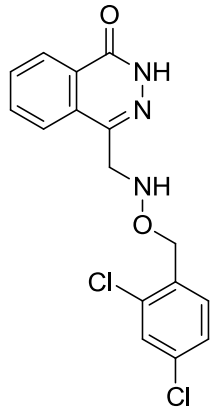
160		4-Methyl- <i>N</i> -(4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahydrochinazolin-2-yl)benzamid	$58,5 \pm 1,11$	>100 >100	$0,218 \pm 0,013$
161		2-Methyl- <i>N</i> -(4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahydrochinazolin-2-yl)benzamid	$14,3 \pm 1,69$	>100 >100	$0,214 \pm 0,019$
162		4-(5-Methylthiophen-2-yl)-phthalazin-1(2 <i>H</i>)-on	$6,38 \pm 1,09$	$22,9 \pm 1,36$ $3,23 \pm 0,138$	$0,208 \pm 0,031$
163		2-(4-Fluorophenyl)imidazo[1,2- <i>a</i>]pyridine-8-carbonsäure	>100	n.b. n.b.	$0,262 \pm 0,014$

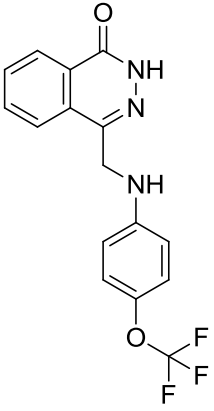
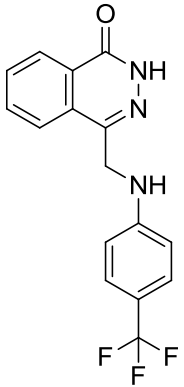
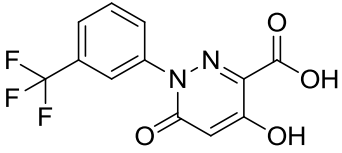
164		2-(Allylamino) chinazolin-4(3 <i>H</i>)- on	1,76 ± 1,49	1,80 ± 0,30 1,05 ± 0,58	0,160 ± 0,004
165		2-(Propylamino) chinazolin-4(3 <i>H</i>)- on	58,1 ± 1,13	>100 >100	0,175 ± 0,018
166		2-((4- Methoxyphenyl) amino) chinazolin-4(3 <i>H</i>)- on	1,79 ± 0,312	n.b. 3,11 ± 0,433	0,162 ± 0,007

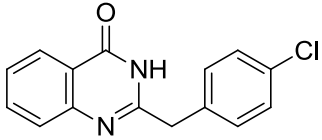
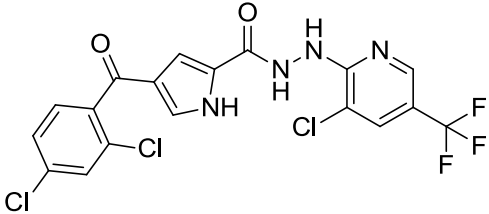
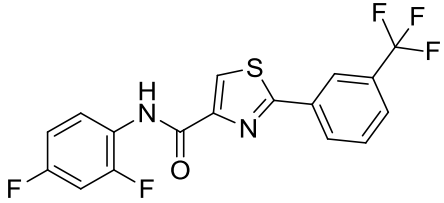
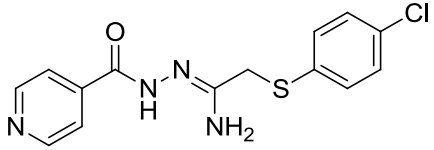
167		2-(1-Bromoethyl) chinazolin-4(3 <i>H</i>)- on	10,9 ± 1,14	11,0 ± 1,37 3,68 ± 0,567	0,193 ± 0,009
168		4-(((3-((3-Chloro-5- (trifluoromethyl) pyridin-2-yl) oxy)phenyl) amino)methyl)- phthalazin-1(2 <i>H</i>)- on	n.b.	2,47 ± 0,65 2,12 ± 0,67	0,207 ± 0,013
169		4-(((4- Methoxyphenyl) amino)methyl) phthalazin-1(2 <i>H</i>)- on	1,01 ± 0,113	0,27 ± 0,04 1,99 ± 0,06	0,186 ± 0,012

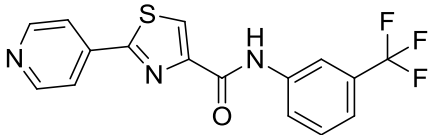
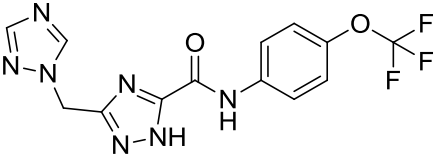
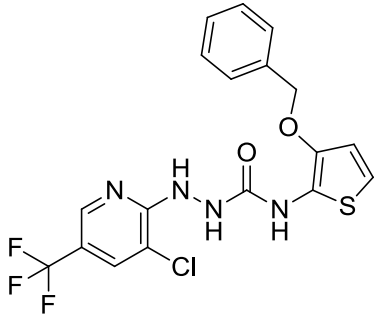
170		4-(2,4-Dichlorobenzyl)phthalazin-1(2H)-on	>100	n.b. n.b.	0,235 ± 0,006
171		4-((4-Nitrophenyl)amino)methylphthalazin-1(2H)-on	11,2 ± 1,41	4,49 ± 0,662 6,16 ± 0,80	0,232 ± 0,021
172		4-((3-(Methylthio)phenyl)amino)methylphthalazin-1(2H)-on	13,4 ± 1,22	11,3 ± 6,4 2,95 ± 0,04	0,237 ± 0,006

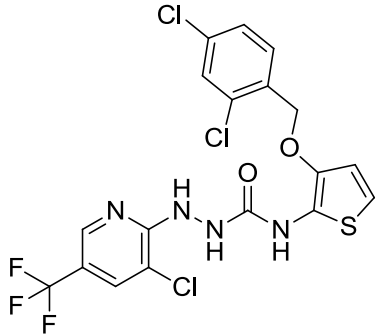
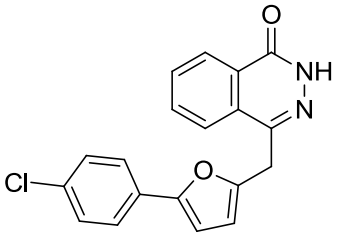
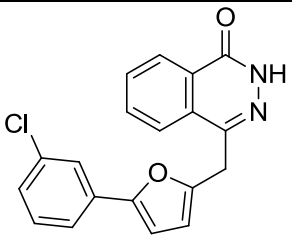
173	 <chem>O=C1N=NC(=C1)CN(C2=CC=C(C=C2)OC3=CC=CC=C3)C4=CC=CC=C4</chem>	4-(((4-Phenoxyphenyl)amino)methyl)phthalazin-1(2H)-on	$56,1 \pm 1,08$	>100 >100	$0,193 \pm 0,006$
174	 <chem>CN(C)S(=O)(=O)C1=CC=C(C=C1)NC(C2=CC=CC=C2)CN3C(=O)N=NC=C3</chem>	<i>N,N</i> -Dimethyl-4-(((4-oxo-3,4-dihydrophthalazin-1-yl)methyl)amino)benzenesulfonamid	$1,79 \pm 0,312$	$3,48 \pm 3,23$ $5,89 \pm 0,06$	$0,234 \pm 0,008$

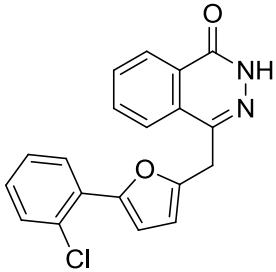
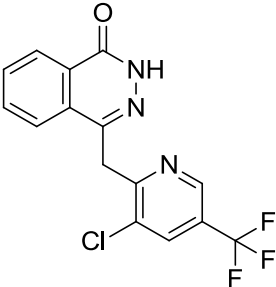
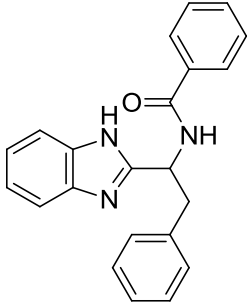
175		4-(((4-((3-Chloro-5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl)oxy)phenyl)amino)methyl)-phthalazin-1(2H)-on	6,25 ± 1,24	<p>>100</p> <p>>100</p>	0,213 ± 0,007
176		4-(((2,4-Dichlorobenzyl)oxy)amino)methyl)-phthalazin-1(2H)-on	18,93 ± 5,27	<p>>100</p> <p>9,88 ± 0,127</p>	0,211 ± 0,012

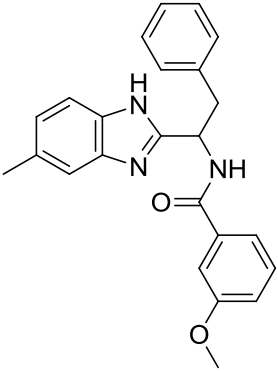
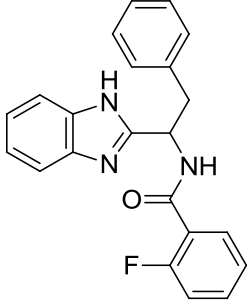
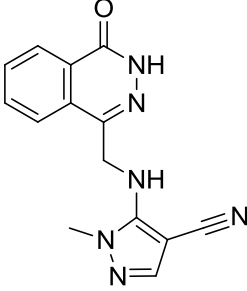
177		4-(((4-(Trifluoromethoxy)phenyl)amino)methyl)-phthalazin-1(2 <i>H</i>)-on	4,45 ± 1,35	n.b. 6,05 ± 0,01	0,223 ± 0,013
178		4-(((4-(Trifluoromethyl)phenyl)amino)methyl)phthalazin-1(2 <i>H</i>)-on	1,13 ± 0,28	4,73 ± 3,45 6,20 ± 0,03	0,222 ± 0,022
179		4-Hydroxy-6-oxo-1-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-1,6-dihydropyridazin-3-carbonsäure	>100	n.b. n.b.	0,239 ± 0,008

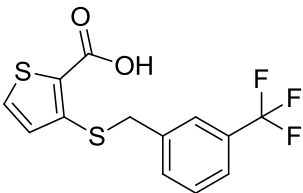
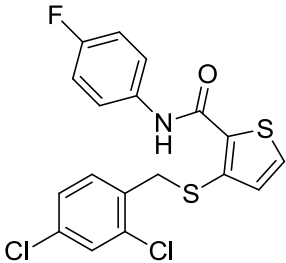
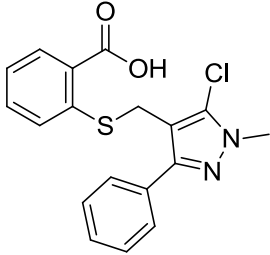
180		2-(4-Chlorobenzyl) chinazolin-4(3 <i>H</i>)- on	>100	n.b. n.b.	0,282 ± 0,039
181		<i>N</i> -(3-Chloro-5-(trifluoromethyl) pyridin-2-yl)-4-(2,4- dichlorobenzoyl)- 1 <i>H</i> -pyrrol-2- carbohydrazid	>100	n.b. n.b.	0,257 ± 0,011
182		<i>N</i> -(2,4- Difluorophenyl)-2- (3-(trifluoromethyl) phenyl)thiazol-4- carboxamid	>100	n.b. n.b.	0,211 ± 0,035
183		2-((4- Chlorophenyl)thio)- <i>N</i> -isonikotinoyl- aceto- hydrazonamid	>100	n.b. n.b.	0,227 ± 0,012

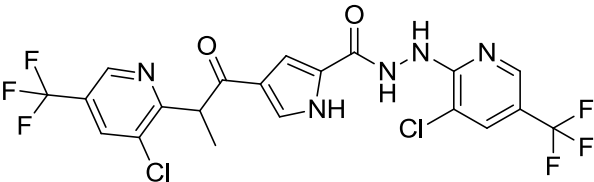
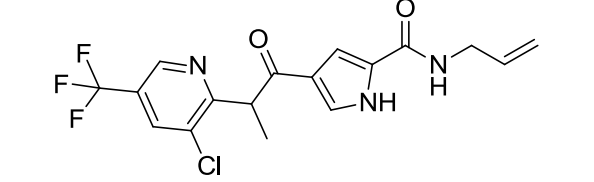
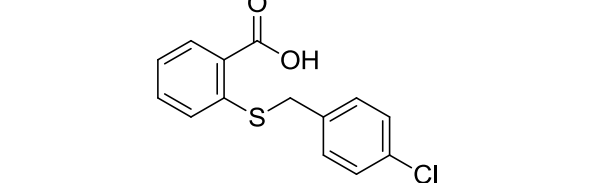
184		2-(Pyridin-4-yl)- <i>N</i> -(3-(trifluoromethyl)phenyl)thiazol-4-carboxamid	>100	n.b. n.b.	0,231 ± 0,010
185		3-((1 <i>H</i> -1,2,4-Triazol-1-yl)methyl)- <i>N</i> -(4-(trifluoromethoxy)phenyl)-1 <i>H</i> -1,2,4-triazol-5-carboxamid	>100	n.b. n.b.	0,242 ± 0,013
186		<i>N</i> -(3-(Benzyloxy)thiophen-2-yl)-2-(3-chloro-5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl)hydrazine-carboxamid	>100	n.b. n.b.	0,247 ± 0,014

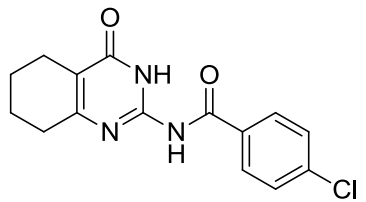
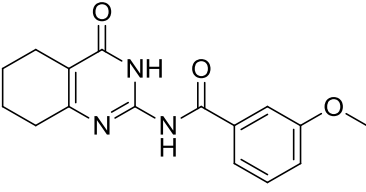
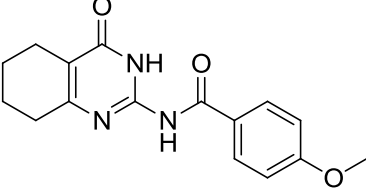
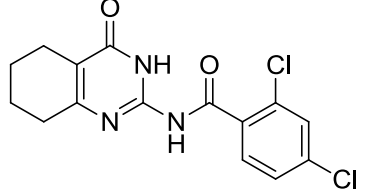
187		<p>2-(3-Chloro-5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl)-<i>N</i>-(3-((2,4-dichlorobenzyl)oxy)thiophen-2-yl)hydrazinecarboxamid</p>	>100	<p>n.b. n.b.</p>	0,235 ± 0,004
188		<p>4-((5-(4-Chlorophenyl)furan-2-yl)methyl)phthalazin-1(2<i>H</i>)-on</p>	>100	<p>n.b. n.b.</p>	0,205 ± 0,007
189		<p>4-((5-(3-Chlorophenyl)furan-2-yl)methyl)phthalazin-1(2<i>H</i>)-on</p>	>100	<p>n.b. n.b.</p>	0,225 ± 0,011

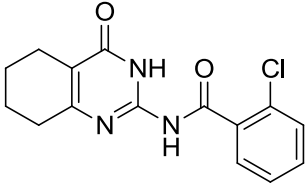
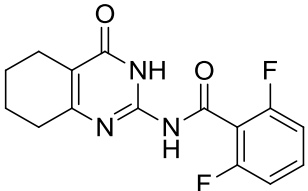
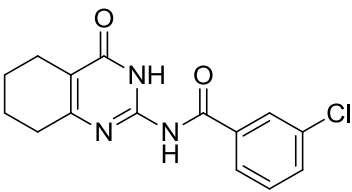
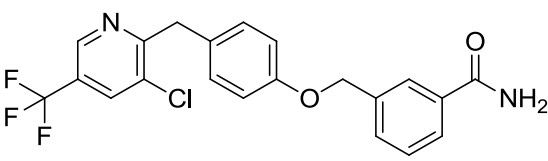
190		4-((5-(2-Chlorophenyl)furan-2-yl)methyl)phthalazin-1(2H)-on	18,4 ± 1,27	20,6 ± 1,35 27,7 ± 1,30	0,260 ± 0,005
191		4-((3-Chloro-5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl)methyl)phthalazin-1(2H)-on	8,31 ± 1,19	19,8 ± 0,29 2,35 ± 0,03	0,181 ± 0,009
192		N-(1-(1H-Benzo[d]imidazol-2-yl)-2-phenylethyl)benzamid	>100	n.b. n.b.	0,218 ± 0,003

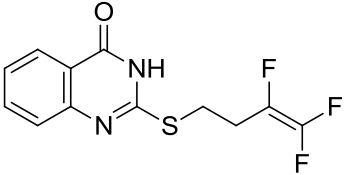
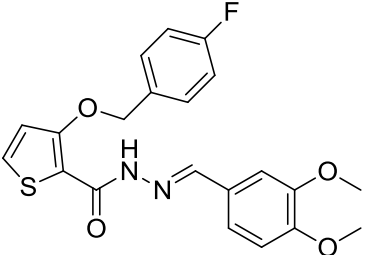
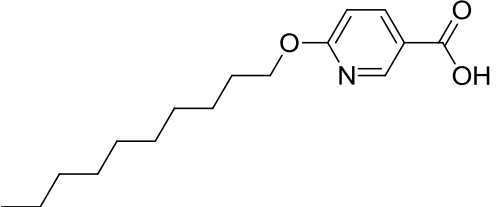
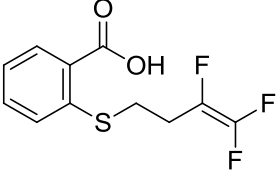
193		3-Methoxy- <i>N</i> -(1-(5-methyl-1 <i>H</i> -benzo[d]imidazol-2-yl)-2-phenylethyl)benzamid	>100	n.b. n.b.	0,237 ± 0,008
194		<i>N</i> -(1-(1 <i>H</i> -Benzo[d]imidazol-2-yl)-2-phenylethyl)-2-fluorobenzamid	>100	n.b. n.b.	0,221 ± 0,012
195		1-Methyl-5-(((4-oxo-3,4-dihydrophthalazin-1-yl)methyl)amino)-1 <i>H</i> -pyrazol-4-carbonitril	>100	>100 >100	0,228 ± 0,015

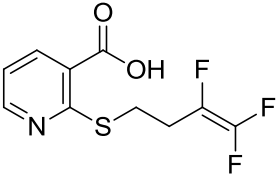
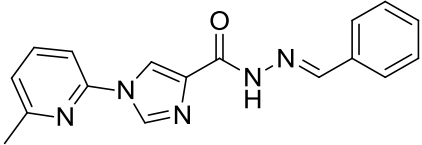
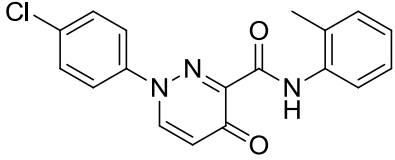
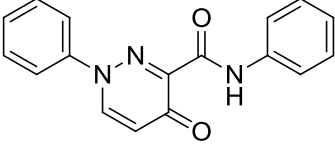
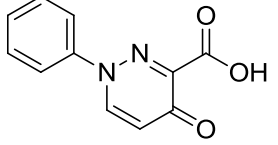
196		3-((3-(Trifluoromethyl)benzyl)thio)thiophen-2-carbonsäure	>100	n.b. n.b.	0,234 ± 0,01
197		3-((2,4-Dichlorobenzyl)thio)-N-(4-fluorophenyl)thiophen-2-carboxamid	>100	n.b. n.b.	0,220 ± 0,016
198		2-(((5-Chloro-1-methyl-3-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)methyl)thio)benzoesäure	>100	n.b. n.b.	0,228 ± 0,013

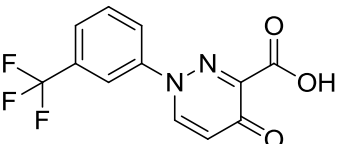
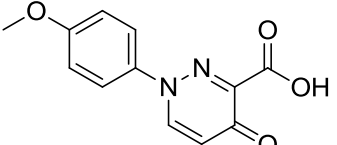
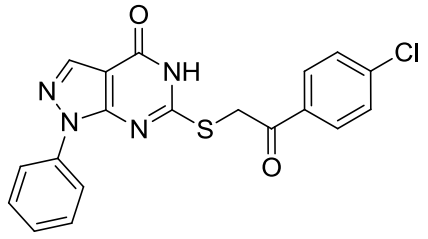
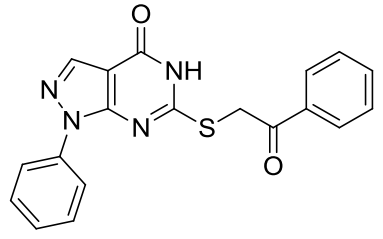
199		<p><i>N</i>-(3-Chloro-5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl)-4-(2-(3-chloro-5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl)propanoyl)-1<i>H</i>-pyrrol-2-carbohydrazid</p>	>100	<p>n.b. n.b.</p>	0,228 ± 0,004
200		<p><i>N</i>-Allyl-4-(2-(3-chloro-5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl)propanoyl)-1<i>H</i>-pyrrol-2-carboxamid</p>	>100	<p>n.b. n.b.</p>	0,236 ± 0,019
201		<p>2-((4-Chlorobenzyl)thio)benzoessäure</p>	>100	<p>n.b. n.b.</p>	0,212 ± 0,019

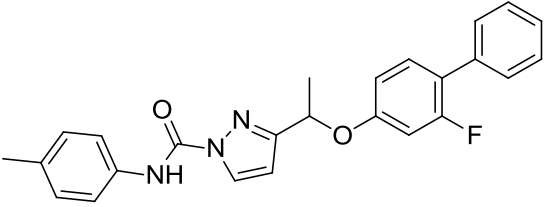
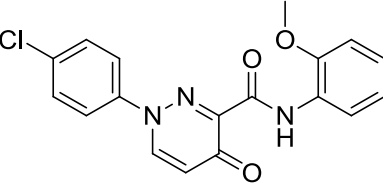
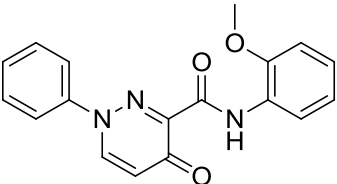
202		4-Chloro- <i>N</i> -(4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahydrochinazolin-2-yl)benzamid	>100	n.b. n.b.	0,235 ± 0,009
203		3-Methoxy- <i>N</i> -(4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahydrochinazolin-2-yl)benzamid	20,1 ± 1,13	n.b. 57,2 ± 1,05	0,199 ± 0,002
204		4-Methoxy- <i>N</i> -(4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahydrochinazolin-2-yl)benzamid	>100	n.b. n.b.	0,241 ± 0,012
205		2,4-Dichloro- <i>N</i> -(4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahydrochinazolin-2-yl)benzamid	>100	n.b. n.b.	0,229 ± 0,012

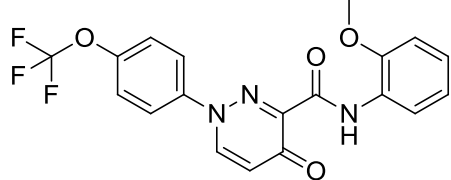
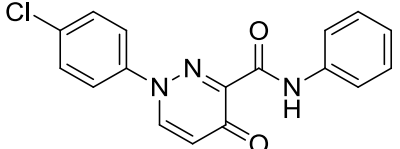
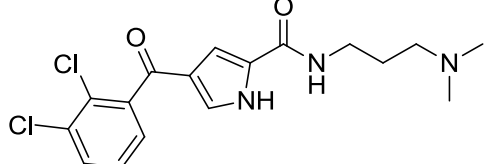
206		2-Chloro- <i>N</i> -(4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahydrochinazolin-2-yl)benzamid	>100	n.b. n.b.	0,203 ± 0,033
207		2,6-Difluoro- <i>N</i> -(4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahydrochinazolin-2-yl)benzamid	20,7 ± 1,08	n.b. 69,1 ± 1,02	0,215 ± 0,0156
208		3-Chloro- <i>N</i> -(4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahydrochinazolin-2-yl)benzamid	>100	>100 >100	0,229 ± 0,017
209		3-((4-((3-Chloro-5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl)methyl)phenoxy)methyl)benzamid	58,5 ± 7,34	35,0 ± 1,09 39,4 ± 1,01	0,193 ± 0,021

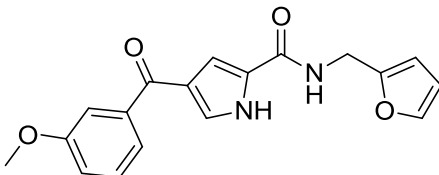
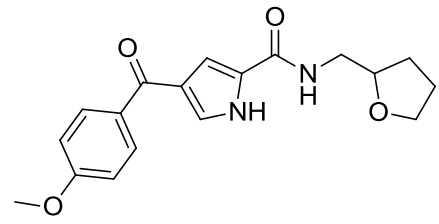
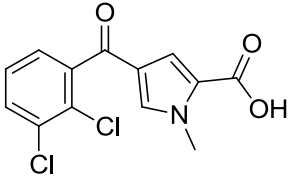
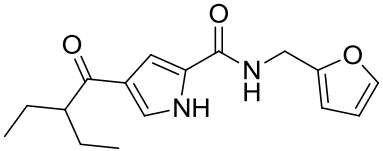
210		2-((3,4,4-Trifluorobut-3-en-1-yl)thio)chinazolin-4(3 <i>H</i>)-on	19,66 ± 1,22	11,46 ± 0,309 14,13 ± 1,26	0,237 ± 0,027
211		<i>N</i> -(3,4-Dimethoxybenzylidene)-3-((4-fluorobenzyl)oxy)thiophen-2-carbohydrazid	>100	n.b. n.b.	0,236 ± 0,0010
212		6-(Decyloxy)nikotinsäure	>100	n.b. n.b.	0,147 ± 0,009
213		2-((3,4,4-Trifluorobut-3-en-1-yl)thio)benzoesäure	>100	n.b. n.b.	0,226 ± 0,014

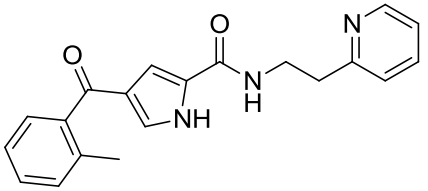
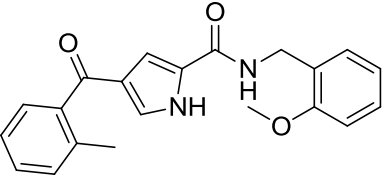
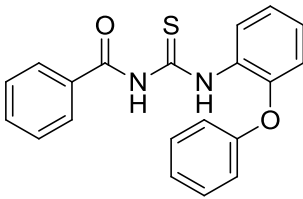
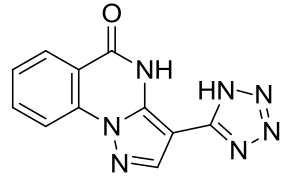
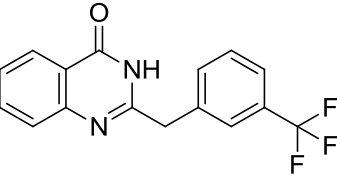
214		2-((3,4,4-Trifluorobut-3-en-1-yl)thio)nikotinsäure	>100	n.b. n.b.	0,249 ± 0,006
215		<i>N</i> -Benzylidene-1-(6-methylpyridin-2-yl)-1 <i>H</i> -imidazole-4-carbohydrazid	>100	n.b. n.b.	0,241 ± 0,013
216		1-(4-Chlorophenyl)-4-oxo- <i>N</i> -(<i>o</i> -tolyl)-1,4-dihydropyridazin-3-carboxamid	>100	n.b. n.b.	0,182 ± 0,014
217		4-Oxo- <i>N</i> ,1-diphenyl-1,4-dihydropyridazin-3-carboxamid	>100	n.b. n.b.	0,185 ± 0,007
218		4-Oxo-1-phenyl-1,4-dihydropyridazin-3-carbonsäure	>100	n.b. n.b.	0,175 ± 0,009

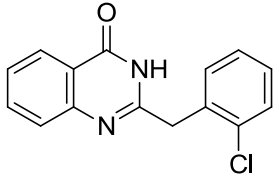
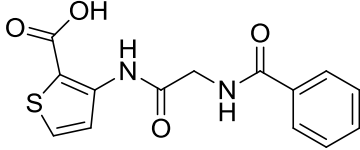
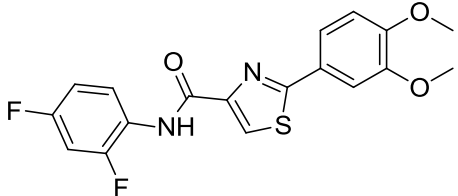
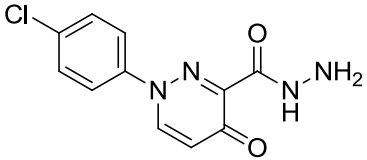
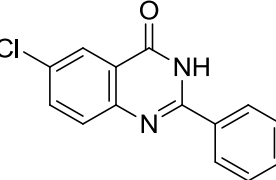
219		4-Oxo-1-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-1,4-dihydropyridazin-3-carbonsäure	>100	n.b. n.b.	0,187 ± 0,007
220		1-(4-Methoxyphenyl)-4-oxo-1,4-dihydropyridazin-3-carbonsäure	>100	n.b. n.b.	0,175 ± 0,010
221		6-((2-(4-Chlorophenyl)-2-oxoethyl)thio)-1-phenyl-1 <i>H</i> -pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4(5 <i>H</i>)-on	>100	n.b. n.b.	0,178 ± 0,009
222		6-((2-Oxo-2-phenylethyl)thio)-1-phenyl-1 <i>H</i> -pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4(5 <i>H</i>)-on	>100	31,99 ± 1,07 24,2 ± 1,14	0,240 ± 0,006

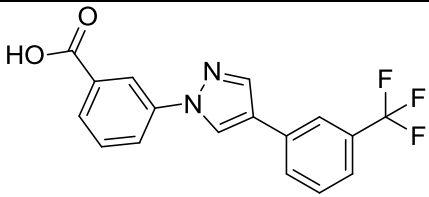
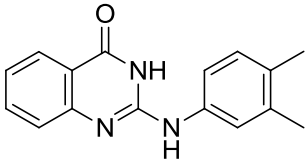
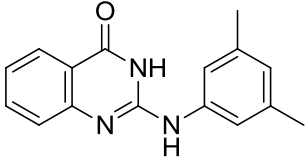
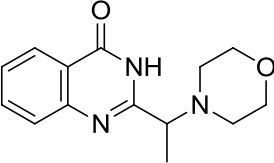
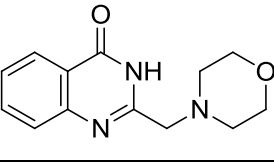
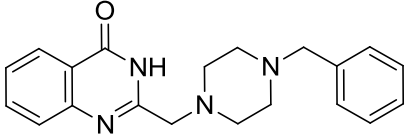
223		<p>3-(1-((2-Fluoro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)oxy)ethyl)-<i>N</i>-(<i>p</i>-tolyl)-1<i>H</i>-pyrazol-1-carboxamid</p>	>100	<p>n.b. n.b.</p>	0,231 ± 0,020
224		<p>1-(4-Chlorophenyl)-<i>N</i>-(2-methoxyphenyl)-4-oxo-1,4-dihydropyridazin-3-carboxamid</p>	>100	<p>n.b. n.b.</p>	0,186 ± 0,007
225		<p><i>N</i>-(2-Methoxyphenyl)-4-oxo-1-phenyl-1,4-dihydropyridazin-3-carboxamid</p>	>100	<p>n.b. n.b.</p>	0,181 ± 0,011

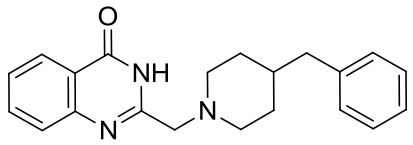
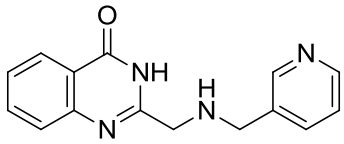
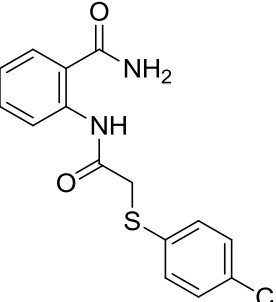
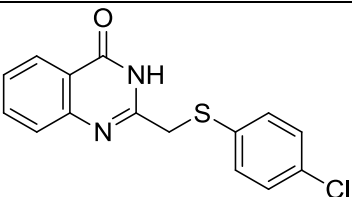
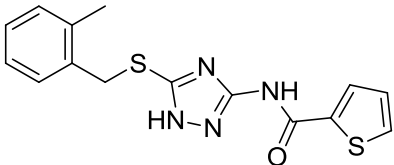
226		<p><i>N</i>-(2-Methoxyphenyl)-4-oxo-1-(4-(trifluoromethoxy)phenyl)-1,4-dihydropyridazin-3-carboxamid</p>	>100	<p>n.b. n.b.</p>	0,177 ± 0,014
227		<p>1-(4-Chlorophenyl)-4-oxo-<i>N</i>-phenyl-1,4-dihydropyridazin-3-carboxamid</p>	>100	<p>n.b. n.b.</p>	0,189 ± 0,009
228		<p>4-(2,3-Dichlorobenzoyl)-<i>N</i>-(3-(dimethylamino)propyl)-1<i>H</i>-pyrrol-2-carboxamid</p>	>100	<p>n.b. n.b.</p>	0,161 ± 0,010

229		<i>N</i> -(Furan-2-ylmethyl)-4-(3-methoxybenzoyl)-1 <i>H</i> -pyrrol-2-carboxamid	>100	n.b. n.b.	0,231 ± 0,029
230		4-(4-Methoxybenzoyl)- <i>N</i> -((tetrahydrofuran-2-yl)methyl)-1 <i>H</i> -pyrrol-2-carboxamid	>100	n.b. n.b.	0,194 ± 0,013
231		4-(2,3-Dichlorobenzoyl)-1-methyl-1 <i>H</i> -pyrrol-2-carbonsäure	>100	n.b. n.b.	0,181 ± 0,010
232		4-(2-Ethylbutanoyl)- <i>N</i> -(furan-2-ylmethyl)-1 <i>H</i> -pyrrol-2-carboxamid	>100	n.b. n.b.	0,199 ± 0,008

233		4-(2-Methylbenzoyl)- <i>N</i> -(2-(pyridin-2-yl)ethyl)-1 <i>H</i> -pyrrol-2-carboxamid	>100	n.b. n.b.	0,196 ± 0,016
234		<i>N</i> -(2-Methoxybenzyl)-4-(2-methylbenzoyl)-1 <i>H</i> -pyrrol-2-carboxamid	>100	n.b. n.b.	0,182 ± 0,003
235		<i>N</i> -((2-Phenoxyphenyl) carbamothioyl) benzamid	>100	n.b. n.b.	0,163 ± 0,009
236		3-(1 <i>H</i> -Tetrazol-5-yl) pyrazolo[1,5- <i>a</i>] chinazolin-5(4 <i>H</i>)-on	9,68 ± 1,13	7,15 ± 0,02 3,70 ± 0,51	0,279 ± 0,013
237		2-(3-(Trifluoromethyl) benzyl) chinazolin-4(3 <i>H</i>)-on	n.b.	n.b. 1,00 ± 0,183	0,185 ± 0,040

238		2-(2-Chlorobenzyl) chinazolin-4(3 <i>H</i>)- on	79,4 ± 1,05	>100 >100	0,260 ± 0,009
239		3-(2-Benzamido- acetamido)thiophe- n-2-carbonsäure	>100	n.b. n.b.	0,172 ± 0,013
240		<i>N</i> -(2,4- Difluorophenyl)-2- (3,4- dimethoxyphenyl) thiazol-4- carboxamid	>100	n.b. n.b.	0,170 ± 0,016
241		1-(4- Chlorophenyl)-4- oxo-1,4- dihydropyridazin-3- carbohydrazid	>100	n.b. n.b.	0,160 ± 0,013
242		6-Chloro-2-phenyl- chinazolin-4(3 <i>H</i>)- on	>100	n.b. n.b.	0,158 ± 0,012

243		3-(4-(3-(Trifluoromethyl)phenyl)-1H-pyrazol-1-yl)benzoic acid	>100	n.b. n.b.	0,183 ± 0,010
244		2-((3,4-Dimethylphenyl)amino)chinazolin-4(3H)-on	76,1 ± 1,04	>100 >100	0,177 ± 0,019
245		2-((3,5-Dimethylphenyl)amino)chinazolin-4(3H)-on	>100	n.b. n.b.	0,232 ± 0,017
246		2-(1-Morpholinoethyl)chinazolin-4(3H)-on	55,2 ± 1,23	>100 >100	0,158 ± 0,017
247		2-(Morpholinomethyl)chinazolin-4(3H)-on	19,8 ± 1,12	>100 48,66 ± 15,6	0,216 ± 0,032
248		2-((4-Benzylpiperazin-1-yl)methyl)chinazolin-4(3H)-on	6,28 ± 1,18	5,88 ± 0,432 9,24 ± 0,37	0,252 ± 0,009

249		2-((4-Benzylpiperidin-1-yl)methyl)chinazolin-4(3H)-on	57,9 ± 1,10	>100 54,9 ± 3,85	0,244 ± 0,008
250		2-(((Pyridin-3-ylmethyl)amino)methyl)chinazolin-4(3H)-on	1,58 ± 1,20	>100 >100	0,208 ± 0,009
251		2-(2-((4-Chlorophenyl)thio)acetamido)benzamid	>100	n.b. n.b.	0,138 ± 0,035
252		2-(((4-Chlorophenyl)thio)methyl)chinazolin-4(3H)-on	>100	n.b. n.b.	0,143 ± 0,006
253		N-(5-((2-Methylbenzyl)thio)-1H-1,2,4-triazol-3-yl)thiophen-2-carboxamid	>100	n.b. n.b.	0,153 ± 0,023

5. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Geißler
Vorname: Torsten
Geburtsdatum: 6. Dezember 1983
Geburtsort: Leipzig

Ausbildung

Oktober 2003 – Dezember 2007 Studium der Biotechnologie an der Hochschule Anhalt (FH)

April 2007 Diplomarbeit zum Thema: "Isolierung von Sekundärmetaboliten aus höheren Pilzen"

Dezember 2007 Abschluss als Diplom-Ingenieur (FH)
Abschluss als Jahrgangsbester
Durchschnittsnote: 1,2 (sehr gut)

Seit Januar 2008 Doktorarbeit am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie; Abteilung Natur- und Wirkstoffchemie zum Thema:
„Entwicklung von Assays zur Untersuchung chemisch induzierter Trockenstresstoleranz“ unter Betreuung von Professor Dr. Ludger A. Wessjohann

Preise

April 2008 Biotechnologiepreis der Hochschule Anhalt
Juni 2009 Posterpreis auf der Plant Science Student Conference

Publikationen

Geissler, T., Wessjohann, L. A whole plant microtiter plate-assay for drought stress tolerance inducing effects. *Journal of Plant Growth Regulation* **2011**, *30*, 504-511.

Geissler, T.; Brandt, W.; Porzel, A.; Schlenzig, D.; Kehlen, A.; Wessjohann, L., Arnold, N. Acetylcholinesterase inhibitors from the toadstool *Cortinarius infractus*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2010**, *18*, 2173-2177.

Quang, D. N.; Spitteller, P.; Porzel, A.; Schmidt, J.; Geissler, T.; Arnold, N.; Wessjohann, L. Alkaloids from the mushroom *Pseudobaeospora pyrifera*, pyriferines A-C. *Journal of Natural Products*. **2008**, *71*, 1620-1622.

6. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich diese Dissertation selbstständig ohne Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Alle den benutzten Quellen wörtlich oder sinngemäß entnommenen Stellen sind als solche einzeln kenntlich gemacht.

Ort, Datum, Unterschrift

7. Literaturverzeichnis

Die Abkürzungen der Zeitschriften wurden der Datenbank von ISI Web of Knowledge entnommen.

- Abeti, R., Abramov, A. Y. und Duchon, M. R. 2011. β -Amyloid activates PARP causing astrocytic metabolic failure and neuronal death. *Brain* **134**: 1658-1672.
- Ahmad, S., Wahid, A., Rasul, E. und Wahid, A. 2005. Comparative morphological and physiological responses of green gram genotypes to salinity applied at different growth stages. *Bot. Bull. of Acad. Sinica* **46**: 135-142.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Walter, P. 2008. *Molecular biology of the cell*. Garland science, Taylor & Francis Group
- Amé, J. C., Spenlehauer, C. und de Murcia, G. 2004. The PARP superfamily. *Bioessays* **26**: 882-893.
- Amor, Y., Babiychuk, E., Inze, D. und Levine, A. 1998. The involvement of poly(ADP-ribose) polymerase in the oxidative stress responses in plants. *FEBS Lett.* **440**: 1-7.
- Anke, T., Oberwinkler, F., Steglich, W. und Schramm, G. 1977. The strobilurins - new antifungal antibiotics from the basidiomycete *Strobilurus tenacellus*. *J. Antibiot.* **30**: 806-810.
- Aroca, R., Porcel, R. und Ruiz-Lozano, J. M. 2007. How does arbuscular mycorrhizal symbiosis regulate root hydraulic properties and plasma membrane aquaporins in *Phaseolus vulgaris* under drought, cold or salinity stresses? *New Phytol.* **173**: 808-816.
- Ausubel, F. M. 2000. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, New York. pp. 1296-1298
- Babiychuk, E., Cottrill, P. B., Storozhenko, S., Fuangthong, M., Chen, Y. M., O'Farrell, M. K., Van Montagu, M., Inze, D. und Kushnir, S. 1998. Higher plants possess two structurally different poly(ADP-ribose) polymerases. *Plant J.* **15**: 635-645.
- Banasik, M., Komura, H., Shimoyama, M. und Ueda, K. 1992. Specific inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase and mono(ADP-ribosyl)transferase. *J. Biol. Chem.* **267**: 1569-1575.
- Bartels, D. und Sunkar, R. 2005. Drought and salt tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **24**: 23-58.
- Bartlett, D. W., Clough, J. M., Godwin, J. R., Hall, A. A., Hamer, M. und Parr-Dobrzanski, B. 2002. The strobilurin fungicides. *Pest Manag. Sci.* **58**: 649-662.

- Bartoli, C. G., Yu, J., Gómez, F., Fernández, L., McIntosh, L. und Foyer, C. H. 2006. Interrelationships between light and respiration in the control of ascorbic acid synthesis and accumulation in *Arabidopsis thaliana* leaves. *J. Exp. Bot.* **57**: 1621-1631.
- Bashandy, T., Guilleminot, J., Vernoux, T., Caparros-Ruiz, D., Ljung, K., Meyer, Y. und Reichheld, J. P. 2010. Interplay between the NADP-Linked Thioredoxin and Glutathione Systems in Arabidopsis Auxin Signaling. *Plant Cell* **22**: 376-391.
- Bates, L. S., Waldren, R. P. und Teare, I. D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* **39**: 205-207.
- Beck, C. L. 2005. Einfluss von Fungiziden auf die Ertragsphysiologie von Weizen. Dissertation. Rheinische Friedrich-Willhelm Universität Bonn.
- Beck, E. H., Fettig, S., Knake, C., Hartig, K. und Bhattarai, T. 2007. Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. *J. Bioscience* **32**: 501-510.
- Becker, T. 1999. Gentechnik und Verbraucher. Landinfo 3/99. Ministerium ländlicher Raum. pp. 20-26. <https://marktlehre.uni-hohenheim.de/fileadmin/einrichtungen/marktlehre/Forschung/Verbraucherverhalten/gentech.pdf>, 29.03.2012
- Benoit, J. B., Lopez-Martinez, G., Elnitsky, M. A., Lee, R. E. und Denlinger, D. L. 2009. Dehydration-induced cross tolerance of *Belgica antarctica* larvae to cold and heat is facilitated by trehalose accumulation. *Comp. Biochem. Phys. A* **152**: 518-523.
- Boyer, J. S. 1982. Plant Productivity and Environment. *Sci.* **218**: 443-448.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Bray, E. A., Bailey-Serres, J. und Weretilnyk, E. 2002. Responses to abiotic stresses. *In* Biochemistry & molecular biology of plants. Eds.: Buchanan, B., Gruissem, W. und Jones, R. American society of plants physiologists, Rockville, MD. pp. 1158-1203.
- Briggs, A. G. und Bent, A. F. 2011. Poly(ADP-ribosyl)ation in plants. *Trends Plant Sci.* **16**: 372-380.
- Buchanan, B. B. und Luan, S. 2005. Redox regulation in the chloroplast thylakoid lumen: a new frontier in photosynthesis research. *J. Exp. Bot.* **56**: 1439-1447.
- Buki, K. G., Bauer, P. I., Mendeleyev, J., Hakam, A. und Kun, E. 1991. Destabilization of Zn²⁺ coordination in ADP-ribose transferase (polymerizing) by 6-nitroso-1,2-benzopyrone coincidental with inactivation of the polymerase but not the DNA binding function. *FEBS Lett.* **290**: 181-185.
- Capell, T., Bassie, L. und Christou, P. 2004. Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 9909-9914.

- Chai, M. F., Chen, Q. J., An, R., Chen, Y. M., Chen, J. und Wang, X. C. 2005. NADK2, an Arabidopsis chloroplastic NAD kinase, plays a vital role in both chlorophyll synthesis and chloroplast protection. *Plant Mol. Biol.* **59**: 553-564.
- Chai, M. F., Wei, P. C., Chen, Q. J., An, R., Chen, J., Yang, S. und Wang, X. C. 2006. NADK3, a novel cytoplasmic source of NADPH, is required under conditions of oxidative stress and modulates abscisic acid responses in Arabidopsis. *Plant J.* **47**: 665-674.
- Chambon, P., Mandel, P. und Weill, J. D. 1963. Nicotinamide mononucleotide activation of a new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **11**: 39-43.
- Chaves, M. M., Maroco, J. und Pereira, J. 2003. Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. *Func. Plant Biol.* **30**: 239-264.
- Chen, T. H. H. und Murata, N. 2008. Glycinebetaine: an effective protectant against abiotic stress in plants. *Trends Plant Sci.* **13**: 499-505.
- Chen, Y. M., Shall, S. und O'Farrell, M. 1994. Poly(ADP-ribose) polymerase in plant nuclei. *Eur. J. Biochem.* **224**: 135-142.
- Chiarugi, A. 2002. Poly(ADP-ribose) polymerase: killer or conspirator? The 'suicide hypothesis' revisited. *Trends Pharmacol. Sci.* **23**: 122-129.
- Chiarugi, A. und Moskowitz, M. A. 2002. PARP-1--a perpetrator of apoptotic cell death? *Sci.* **297**: 200-201.
- Cho, K. H., Toler, H., Lee, J., Ownley, B., Stutz, J. C., Moore, J. L. und Auge, R. M. 2006. Mycorrhizal symbiosis and response of sorghum plants to combined drought and salinity stresses. *J. Plant Physiol.* **163**: 517-528.
- Cockcroft, X. I., Dillon, K. J., Dixon, L., Drzewiecki, J., Kerrigan, F., Loh, J., Martin, N. M. B., Menear, K. A. und Smith, G. C. M. 2006. Phthalazinones 2: optimisation and synthesis of novel potent inhibitors of poly(ADP-ribose)polymerase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**: 1040-1044.
- Corda, D. und Di Girolamo, M. 2003. Functional aspects of protein mono-ADP-ribosylation. *EMBO J.* **22**: 1953-1958.
- Cornic, G. und Massacci, A. 1996. Leaf photosynthesis under drought stress. *In* Photosynthesis and the environment. Ed.: Baker, N. R. Kluwer Academic Publishers, Niederlande. pp. 347-366
- Cutler, S., Ghassemian, M., Bonetta, D., Cooney, S. und McCourt, P. 1996. A protein farnesyl transferase involved in abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. *Sci.* **273**: 1239-1241.
- D'Agostino, R. B. und Stephens, M. A. 1986. Goodness-of-fit techniques. Marcel Dekker, New York.

- D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I. und Poirier, G. G. 1999. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem. J.* **342**: 249-268.
- DIN EN ISO 20079:2006-12 Water quality - determination of the toxic effect of water constituents and waste water to duckweed (*Lemna minor*) - Duckweed growth inhibition test, Beuth Verlag, pp. 1-28
- De Block, M., Verduyn, C., De Brouwer, D. und Cornelissen, M. 2005. Poly(ADP-ribose) polymerase in plants affects energy homeostasis, cell death and stress tolerance. *Plant J.* **41**: 95-106.
- Decottignies, A. und Goffeau, A. 1997. Complete inventory of the yeast ABC proteins. *Nat. Genet.* **15**: 137-145.
- Delaney, C. A., Wang, L. Z., Kyle, S., White, A. W., Calvert, A. H., Curtin, N. J., Durkacz, B. W., Hostomsky, Z. und Newell, D. R. 2000. Potentiation of temozolomide and topotecan growth inhibition and cytotoxicity by novel poly(adenosine diphosphoribose) polymerase inhibitors in a panel of human tumor cell lines. *Clin. Cancer Res.* **6**: 2860-2867.
- Delauney, A. J. und Verma, D. P. S. 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.* **4**: 215-223.
- Doucet-Chabeaud, G., Godon, C., Brutesco, C., de Murcia, G. und Kazmaier, M. 2001. Ionising radiation induces the expression of PARP-1 and PARP-2 genes in Arabidopsis. *Mol. Genet. Genomics* **265**: 954-963.
- Du, L. N., Zhang, X. P., Han, Y. Y., Burke, N. A., Kochanek, P. M., Watkins, S. C., Graham, S. H., Carcillo, J. A., Szabo, C. und Clark, R. S. B. 2003. Intra-mitochondrial poly(ADP-ribosylation) contributes to NAD(+) depletion and cell death induced by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **278**: 18426-18433.
- Dure, L., Greenway, S. C. und Galau, G. A. 1981. Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination - changing messenger ribonucleic-acid populations as shown by *in vitro* and *in vivo* protein-synthesis. *Biochemistry* **20**: 4162-4168.
- EG440/2008 zur Festlegung von Prüfmethode n gemäß der Verordnung Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe. <http://www.reach-info.de/verordnungstext.htm>, 29.03.2012
- Estelle, M. A. und Somerville, C. 1987. Auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* with an altered morphology. *Mol. Gen. Genet.* **206**: 200-206.
- Estrada-Campuzano, G., Miralles, D. J. und Slafer, G. A. 2008. Genotypic variability and response to water stress of pre- and post-anthesis phases in triticale. *Eur. J. Agron.* **28**: 171-177.

- European Food Safety Authority 2010. Special Eurobarometer 354 - Food-related risks. Brüssel. www.efsa.europa.eu/en/factsheet/docs/reporten.pdf, 29.03.2012
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D. und Basra, S. M. A. 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agron. Sustain. Dev.* **29**: 185-212.
- Fernandez, J. A., Balenzategui, L., Banon, S. und Franco, J. A. 2006. Induction of drought tolerance by paclobutrazol and irrigation deficit in *Phillyrea angustifolia* during the nursery period. *Sci. Hortic-Amsterdam* **107**: 277-283.
- Ferraris, D. V. 2010. Evolution of Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 (PARP-1) Inhibitors. From Concept to Clinic. *J. Med. Chem.* **53**: 4561-4584.
- Fletcher, R. A. und Hofstra, G. 1988. Triazoles as potential plant protectants. *In Sterol biosynthesis inhibitors: pharmaceutical and agrochemical aspects*. Eds.: Berg D. und Plembel M. VCH Publishers, Weinheim. pp. 321-331.
- Foyer, C. H. und Noctor, G. 2011. Ascorbate and glutathione: The Heart of the Redox Hub. *Plant Physiol.* **155**: 2-18.
- Frottin, F., Espagne, C., Traverso, J. A., Mauve, C., Valot, B., Lelarge-Trouverie, C., Zivy, M., Noctor, G., Meinel, T. und Giglione, C. 2009. Cotranslational proteolysis dominates glutathione homeostasis to support proper growth and development. *Plant Cell* **21**: 3296-3314.
- Frye, R. A. 1999. Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **260**: 273-279.
- Fujita, Y., Fujita, M., Satoh, R., Maruyama, K., Parvez, M. M., Seki, M., Hiratsu, K., Ohme-Takagi, M., Shinozaki, K. und Yamaguchi-Shinozaki, K. 2005. AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell* **17**: 3470-3488.
- Furihata, T., Maruyama, K., Fujita, Y., Umezawa, T., Yoshida, R., Shinozaki, K. und Yamaguchi-Shinozaki, K. 2006. Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 1988-1993.
- Gagné, J. P., Hunter, J. M., Labrecque, B., Chabot, B. und Poirier, G. G. 2003. A proteomic approach to the identification of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins as a new family of poly(ADP-ribose)-binding proteins. *Biochem. J.* **371**: 331-340.
- Gamborg, O. L., Miller, R. A. und Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* **50**: 151-158.
- Garg, A. K., Kim, J. K., Owens, T. G., Ranwala, A. P., Do Choi, Y., Kochian, L. V. und Wu, R. J. 2002. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 15898-15903.

- Gebbing, T. und Schnyder, H. 1999. Pre-anthesis reserve utilization for protein and carbohydrate synthesis in grains of wheat. *Plant Physiol.* **121**: 871-878.
- Geissler, T. und Wessjohann, L. 2011. A whole-plant microtiter plate assay for drought stress tolerance-inducing effects. *J. Plant Growth Regul.* **30**: 504-511.
- Goddijn, O. J. M. und van Dun, K. 1999. Trehalose metabolism in plants. *Trends Plant Sci.* **4**: 315-319.
- Golovina, E. A., Hoekstra, F. A. und Hemminga, M. A. 1998. Drying increases intracellular partitioning of amphiphilic substances into the lipid phase - Impact on membrane permeability and significance for desiccation tolerance. *Plant Physiol.* **118**: 975-986.
- Goyal, K., Walton, L. J. und Tunnacliffe, A. 2005. LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochem. J.* **388**: 151-157.
- Grace, S. C. und Logan, B. A. 1996. Acclimation of Foliar Antioxidant Systems to Growth Irradiance in Three Broad-Leaved Evergreen Species. *Plant Physiol.* **112**: 1631-1640.
- Griffin, R. J., Srinivasan, S., Bowman, K., Calvert, A. H., Curtin, N. J., Newell, D. R., Pemberton, L. C. und Golding, B. T. 1998. Resistance-modifying agents. 5. synthesis and biological properties of quinazolinone inhibitors of the DNA repair enzyme poly(ADP-ribose) polymerase (PARP). *J. Med. Chem.* **41**: 5247-5256.
- Griffith, O. W. 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione-reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* **106**: 207-212.
- Grossman, A. und Takahashi, H. 2001. Macronutrient utilisation by photosynthetic eukaryotes and the fabric of interactions. *Annu. Rev. Plant. Phys.* **52**: 163-210.
- Grossmann, K. und Retzlaff, G. 1997. Bioregulatory effects of the fungicidal strobilurin kresoxim-methyl in wheat (*Triticum aestivum*). *Pestic. Sci.* **50**: 11-20.
- Grozinger, C. M., Chao, E. D., Blackwell, H. E., Moazed, D. und Schreiber, S. L. 2001. Identification of a class of small molecule inhibitors of the sirtuin family of NAD-dependent deacetylases by phenotypic screening. *J. Biol. Chem.* **276**: 38837-38843.
- Hamayun, M., Khan, S. A., Iqba, I., Na, C. I., Khan, A. L., Hwang, Y. H., Lee, B. H. und Lee, I. J. 2009. *Chrysosporium pseudomercurarium* produces gibberellins and promotes plant growth. *J. Microbiol.* **47**: 425-430.
- Hatakeyama, K., Nemoto, Y., Ueda, K. und Hayaishi, O. 1986. Purification and characterization of poly(ADP-ribose) glycohydrolase - different modes of action on large and small poly(ADP-ribose). *J. Biol. Chem.* **261**: 4902-4911.
- Hattori, K., Kido, Y., Yamamoto, H., Ishida, J., Kamijo, K., Murano, K., Ohkubo, M., Kinoshita, T., Iwashita, A., Mihara, K., Yamazaki, S., Matsuoka, N., Teramura, Y. und Miyake, H. 2004. Rational approaches to discovery of orally active and brain-penetrable quinazolinone inhibitors of poly(ADP-ribose)polymerase. *J. Med. Chem.* **47**: 4151-4154.

- Hegan, D. C., Lu, Y. H., Stachelek, G. C., Crosby, M. E., Bindra, R. S. und Glazer, P. M. 2010. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase down-regulates BRCA1 and RAD51 in a pathway mediated by E2F4 and p130. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **107**: 2201-2206.
- Heldt, H. W. 2005. *Plant biochemistry*. Elsevier Academic Press, Burlington, USA. pp. 195-211
- Higo, A., Kato, H., Ohmori, K., Ikeuchi, M. und Ohmori, M. 2006. The role of a gene cluster for trehalose metabolism in dehydration tolerance of the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Microbiology+* **152**: 979-987.
- Hoekstra, F. A., Golovina, E. A. und Buitink, J. 2001. Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends Plant Sci.* **6**: 431-438.
- Hofstra, G., Krieg, L. C. und Fletcher, R. A. 1989. Uniconazole reduces ethylene and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and increases spermine levels in mung bean seedlings. *J. Plant Growth Regul.* **8**: 45-51.
- Hohl, M. und Schopfer, P. 1991. Water relations of growing maize coleoptiles - comparison between mannitol and polyethylene glycol-6000 as external osmotica for adjusting turgor pressure. *Plant Physiol.* **95**: 716-722.
- Hong, L. und Goldstein, B. M. 1992. Carboxamide group conformation in the nicotinamide and thiazole-4-carboxamide rings - implications for enzyme binding. *J. Med. Chem.* **35**: 3560-3567.
- Hong, Z. L., Lakkineni, K., Zhang, Z. M. und Verma, D. P. S. 2000. Removal of feedback inhibition of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiol.* **122**: 1129-1136.
- Hruz, T., Laule, O., Szabo, G., Wessendorp, F., Bleuler, S., Oertle, L., Widmayer, P., Gruissem, W. und Zimmermann, P. 2008. Genevestigator V3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Adv. Bioinf.* **2008**: Article ID 420747.
- Hsieh, T. H., Lee, J. T., Yang, P. T., Chiu, L. H., Charng, Y. Y., Wang, Y. C. und Chan, M. T. 2002. Heterology expression of the Arabidopsis C-repeat/dehydration response element binding factor 1 gene confers elevated tolerance to chilling and oxidative stresses in transgenic tomato. *Plant Physiol.* **129**: 1086-1094.
- Hua, Z. M., Yang, X. und Fromm, M. E. 2006. Activation of the NaCl- and drought-induced RD29A and RD29B promoters by constitutively active Arabidopsis MAPKK or MAPK proteins. *Plant Cell Environ.* **29**: 1761-1770.
- Hubbard, K. E., Nishimura, N., Hitomi, K., Getzoff, E. D. und Schroeder, J. I. 2010. Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions. *Genes Dev.* **24**: 1695-1708

- Huletsky, A., de Murcia, G., Muller, S., Hengartner, M., Menard, L., Lamarre, D. und Poirier, G. G. 1989. The effect of poly(ADP-ribosyl)ation on native and H1-depleted chromatin. a role of poly(ADP-ribosyl)ation on core nucleosome structure. *J. Biol. Chem.* **264**: 8878-8886.
- Hunt, L. und Gray, J. E. 2009. The relationship between pyridine nucleotides and seed dormancy. *New Phytol.* **181**: 62-70.
- Ingram, J. und Bartels, D. 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant. Phys.* **47**: 377-403.
- Islam, M. A., Blake, T. J., Kocacinar, F. und Lada, R. 2003. Ambiol, spermine, and aminoethoxyvinylglycine prevent water stress and protect membranes in *Pinus strobus* L. under drought. *Trees-Struct. Funct.* **17**: 278-284.
- Iwashita, A., Hattori, K., Yamamoto, H., Ishida, J., Kido, Y., Kamijo, K., Murano, K., Miyake, H., Kinoshita, T., Warizaya, M., Ohkubo, M., Matsuoka, N. und Mutoh, S. 2005. Discovery of quinazolinone and quinoxaline derivatives as potent and selective poly(ADP-ribose) polymerase-1/2 inhibitors. *FEBS Lett.* **579**: 1389-1393.
- Jansen, M., Gilmer, F., Biskup, B., Nagel, K. A., Rascher, U., Fischbach, A., Briem, S., Dreissen, G., Tittmann, S., Braun, S., De Jaeger, I., Metzloff, M., Schurr, U., Scharr, H. und Walter, A. 2009. Simultaneous phenotyping of leaf growth and chlorophyll fluorescence via GROWSCREEN FLUORO allows detection of stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* and other rosette plants. *Func. Plant Biol.* **36**: 902-914.
- Jaspers, P., Overmyer, K., Wrzaczek, M., Vainonen, J. P., Blomster, T., Salojarvi, J., Reddy, R. A. und Kangasjarvi, J. 2010. The RST and PARP-like domain containing SRO protein family: analysis of protein structure, function and conservation in land plants. *BMC Genomics* **11**.
- Kaiser, P., Auer, B. und Schweiger, M. 1992. Inhibition of cell proliferation in *Saccharomyces cerevisiae* by expression of human NAD⁺ ADP-ribosyltransferase requires the DNA binding domain ("zinc fingers"). *Mol. Gen. Genet.* **232**: 231-239.
- Kaiser, W. M. 1979. Reversible inhibition of the calvin cycle and activation of oxidative pentose-phosphate cycle in isolated intact chloroplasts by hydrogen-peroxide. *Planta* **145**: 377-382.
- Kang, J. Y., Choi, H. I., Im, M. Y. und Kim, S. Y. 2002. Arabidopsis basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. *Plant Cell* **14**: 343-357.
- Kim, J. B., Kang, J. Y. und Kim, S. Y. 2004. Over-expression of a transcription factor regulating ABA-responsive gene expression confers multiple stress tolerance. *Plant Biotechnol. J.* **2**: 459-466.

- Kim, T. H., Bohmer, M., Hu, H. H., Nishimura, N. und Schroeder, J. I. 2010. Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **61**: 561-591.
- Kinoshita, T., Nakanishi, I., Warizaya, M., Iwashita, A., Kido, Y., Hattori, K. und Fujii, T. 2004. Inhibitor-induced structural change of the active site of human poly(ADP-ribose) polymerase. *FEBS Lett.* **556**: 43-46.
- Kopischke, M. 2007. Charakterisierung der *Arabidopsis thaliana*-Mutante "enhanced response to phytophthora1". Diplomarbeit Martin-Luther Universityät Halle-Wittenberg (durchgeführt am Leibniz Institut für Pflanzenbiochemie Halle/Saale).
- Koshland, D. E. 1958. Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **44**: 98-104.
- Kramer, P. J. und Boyer, J. S. 1995. Water relations of plants and soils. Academic Press, London. pp. 16-41
- Lawlor, D. W. 1995. The effects of water deficit on photosynthesis. *In* Environment and plant metabolism. Ed.: Smirnoff N. pp. 129-160.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R. und Lamb, C. 1994. H₂O₂ from oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**: 583-593.
- Levitt, J. 1972. Responses of plants to environmental stresses. Academic Press, New York. pp. 1-607
- Li, L. und van Staden, J. 1998. Effects of plant growth regulators on the antioxidant system in callus of two maize cultivars subjected to water stress. *Plant Growth Regul.* **24**: 55-66.
- Loescher, W. H. und Everard, J. D. 2000. Regulation of sugar alcohol biosynthesis. *In* Photosynthesis: physiology and metabolism. Leegood R.C., Sharkey T.D. und Caemmerer S. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 275-299.
- Loh, V. M., Cockcroft, X. I., Dillon, K. J., Dixon, L., Drzewiecki, J., Eversley, P. J., Gomez, S., Hoare, J., Kerrigan, F., Matthews, I. T. W., Menear, K. A., Martin, N. M. B., Newton, R. F., Paul, J., Smith, G. C. M., Vile, J. und Whittle, A. J. 2005. Phthalazinones. part 1: the design and synthesis of a novel series of potent inhibitors of poly(ADP-ribose)polymerase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**: 2235-2238.
- Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A. und Grill, E. 2009. Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Sci.* **324**: 1064-1068.
- Mahajan, S. und Tuteja, N. 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Arch. Biochem. Biophys.* **444**: 139-158.
- Malavasi, F., Deaglio, S., Funaro, A., Ferrero, E., Horenstein, A. L., Ortolan, E., Vaisitti, T. und Aydin, S. 2008. Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiol. Rev.* **88**: 841-886.

- Marsischky, G. T., Wilson, B. A. und Collier, R. J. 1995. Role of glutamic-acid-988 of human poly-ADP-ribose polymerase in polymer formation - evidence for active-site similarities to the ADP-ribosylating toxins. *J. Biol. Chem.* **270**: 3247-3254.
- Maruyama, H., Koyama, R., Oi, T., Yagi, M., Takeda, M., Kanechi, M., Inagaki, N. und Uno, Y. 2008. *In vitro* evaluation of osmotic stress tolerance using a novel root recovery assay. *Plant Cell Tiss. Org.* **95**: 101-106.
- Mascher, R., Nagy, E., Lippmann, B., Hornlein, S., Fischer, S., Scheiding, W., Neagoe, A. und Bergmann, H. 2005. Improvement of tolerance to paraquat and drought in barley (*Hordeum vulgare* L.) by exogenous 2-aminoethanol: effects on superoxide dismutase activity and chloroplast ultrastructure. *Plant Sci.* **168**: 691-698.
- Matsuda, K., Buckingham, S. D., Kleier, D., Rauh, J. J., Grauso, M. und Sattelle, D. B. 2001. Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **22**: 573-580.
- Mckersie, B. D., Hoekstra, F. A. und Krieg, L. C. 1990. Differences in the susceptibility of plant membrane-lipids to peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta* **1030**: 119-126.
- Mckersie, B. D., Murnaghan, J., Jones, K. S. und Bowley, S. R. 2000. Iron-superoxide dismutase expression in transgenic alfalfa increases winter survival without a detectable increase in photosynthetic oxidative stress tolerance. *Plant Physiol.* **122**: 1427-1437.
- Meinhard, M. und Grill, E. 2001. Hydrogen peroxide is a regulator of ABI1, a protein phosphatase 2C from Arabidopsis. *FEBS Lett.* **508**: 443-446.
- Meister, A. 1994. Glutathione ascorbic-acid antioxidant system in animals. *J. Biol. Chem.* **269**: 9397-9400.
- Mendeleyev, J., Kirsten, E., Hakam, A., Buki, K. G. und Kun, E. 1995. Potential chemotherapeutic activity of 4-iodo-3-nitrobenzamide: Metabolic reduction to the 3-nitroso derivative and induction of cell death in tumor cells in culture. *Biochem. Pharmacol.* **50**: 705-714.
- Messner, S., Altmeyer, M., Zhao, H. T., Pozivil, A., Roschitzki, B., Gehrig, P., Rutishauser, D., Huang, D. Z., Caflisch, A. und Hottiger, M. O. 2010. PARP1 ADP-ribosylates lysine residues of the core histone tails. *Nucleic Acids Res.* **38**: 6350-6362.
- Meyer, R. G., Meyer-Ficca M. I., Jacobsen E. I. und Jacobsen M. K. 2006. Enzymes in poly (ADP-ribose) metabolism. *In Poly(ADP-ribosyl)ation*. Ed.: Bürkle A. Springer, New York. pp. 1-12.
- Meyer, R. G., Meyer-Ficca, M. L., Whatcott, C. J., Jacobson, E. L. und Jacobson, M. K. 2007. Two small enzyme isoforms mediate mammalian mitochondrial poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) activity. *Exp. Cell Res.* **313**: 2920-2936.

- Michel, B. E. und Kaufmann, M. R. 1973. Osmotic Potential of Polyethylene-Glycol 6000. *Plant Physiol.* **51**: 914-916.
- Miknyoczki, S. J., Jones-Bolin, S., Pritchard, S., Hunter, K., Zhao, H., Wan, W., Ator, M., Bihovsky, R., Hudkins, R., Chatterjee, S., Klein-Szanto, A., Dionne, C. und Ruggeri, B. 2003. Chemopotentiation of Temozolomide, Irinotecan, and Cisplatin Activity by CEP-6800, a Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitor. *Mol. Cancer Ther.* **2**: 371-382.
- Minaga, T. und Kun, E. 1983. Probable Helical Conformation of Poly(ADP-Ribose) - the Effect of Cations on Spectral Properties. *J. Biol. Chem.* **258**: 5726-5730.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. und Van Breusegem, F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* **9**: 490-498.
- Miwa, M. und Sugimura, T. 1984. Structure of poly(ADP-ribose). *Methods in Enzymology* **106**: 441-450.
- Miwa, M. und Sugimura, T. 1971. Splitting of the ribose-ribose linkage of poly(adenosine diphosphate-ribose) by a calf thymus extract. *J. Biol. Chem.* **246**: 6362-6364.
- Miyashiro, J., Woods, K. W., Park, C. H., Liu, X., Shi, Y., Johnson, E. F., Bouska, J. J., Olson, A. M., Luo, Y., Fry, E. H., Giranda, V. L. und Penning, T. D. 2009. Synthesis and SAR of novel tricyclic quinoxalinone inhibitors of poly(ADP-ribose)polymerase-1 (PARP-1). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**: 4050-4054.
- Monakhova, O. und Chernyad'ev, I. 2007. A protector effect of cytokinin preparations on the photosynthetic apparatus of wheat plants under water deficiency conditions. *Appl. Biochem. Micro+* **43**: 641-649.
- Monod, J. 1949. The Growth of Bacterial Cultures. *Annu. Rev. Microbiol.* **3**: 371-394.
- Müller-Steffner, H. M., Augustin, A. und Schuber, F. 1996. Mechanism of cyclization of pyridine nucleotides by bovine spleen NAD(+) glycohydrolase. *J. Biol. Chem.* **271**: 23967-23972.
- Munne-Bosch, S., Shikanai, T. und Asada, K. 2005. Enhanced ferredoxin-dependent cyclic electron flow around photosystem I and α -tocopherol quinone accumulation in water-stressed *ndhB*-inactivated tobacco mutants. *Planta* **222**: 502-511.
- Murashige, T. und Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum* **15**: 473-497.
- Murray, C. W., Verdonk, M. L. 2007. Entropic consequences of linking ligands *In*. Fragment-based approaches in drug discovery. Eds.: Jahnke, W., Erlanson, D. A., Mannhold, R., Kubinyi, H. und Folkers, G John Wiley & Sons, Weinheim. pp. 55-66
- Nanjo, T., Kobayashi, M., Yoshiba, Y., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. und Shinozaki, K. 1999. Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **461**: 205-210.

- Noctor, G., Queval, G., Mhamdi, A., Chaouch, S. und Foyer, C. H. 2011. Glutathione. The Arabidopsis Book e0142. doi:10.1043/tab.0142
- Nordlee, J. A., Taylor, S. L., Townsend, J. A., Thomas, L. A. und Bush, R. K. 1996. Identification of a brazil-nut allergen in transgenic soybeans. New Engl. J. Med. **334**: 688-692.
- Nuccio, M. L., Russell, B. L., Nolte, K. D., Rathinasabapathi, B., Gage, D. A. und Hanson, A. D. 1998. The endogenous choline supply limits glycine betaine synthesis in transgenic tobacco expressing choline monooxygenase. Plant J. **16**: 487-496.
- OECD Guidelines for Testing of Chemicals Sektion 2. Effects on Biotic Systems. Test No. 221: *Lemna* sp. Growth Inhibition Test. http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-2-effects-on-biotic-systems_20745761, 29.03.2012
- Oelmuller, R., Sherameti, I., Tripathi, S. und Varma, A. 2009. *Piriformospora indica*, a cultivable root endophyte with multiple biotechnological applications. Symbiosis **49**: 1-17.
- Oh, S. J., Song, S. I., Kim, Y. S., Jang, H. J., Kim, S. Y., Kim, M., Kim, Y. K., Nahm, B. H. und Kim, J. K. 2005. Arabidopsis CBF3/DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. Plant Physiol. **138**: 341-351.
- Oka, J., Ueda, K., Hayaishi, O., Komura, H. und Nakanishi, K. 1984. ADP-ribosyl protein lyase - purification, properties, and identification of the product. J. Biol. Chem. **259**: 986-995.
- Okazaki, I. J. und Moss, J. 1999. Characterization of glycosylphosphatidylinositol-anchored, secreted, and intracellular vertebrate mono-ADP-ribosyltransferases. Ann. Rev. Nutr. **19**: 485-509.
- Park, E. J., Jeknic, Z., Sakamoto, A., DeNoma, J., Yuwansiri, R., Murata, N. und Chen, T. H. H. 2004. Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in tomato protects seeds, plants, and flowers from chilling damage. Plant J. **40**: 474-487.
- Park, S. Y., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D. R., Fujii, H., Zhao, Y., Lumba, S., Santiago, J., Rodrigues, A., Chow, T. F. F., Alfred, S. E., Bonetta, D., Finkelstein, R., Provar, N. J., Desveaux, D., Rodriguez, P. L., McCourt, P., Zhu, J. K., Schroeder, J. I., Volkman, B. F. und Cutler, S. R. 2009. Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL Family of START proteins. Sci. **324**: 1068-1071.
- Parry, M. A. J., Andralojc, P. J., Khan, S., Lea, P. J. und Keys, A. J. 2002. Rubisco activity: effects of drought stress. Ann. Bot. -London **89**: 833-839.

- Pavri, R., Lewis, B., Kim, T. K., Dilworth, F. J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., de Murcia, G., Evans, R., Chambon, P. und Reinberg, D. 2005. PARP-1 determines specificity in a retinoid signaling pathway via direct modulation of mediator. *Mol. Cell* **18**: 83-96.
- Payne, J. F. und Bal, A. K. 1976. Cytological detection of poly (ADP-ribose) polymerase. *Exp. Cell Res.* **99**: 428-432.
- Pei, Z. M., Ghassemian, M., Kwak, C. M., McCourt, P. und Schroeder, J. I. 1998. Role of farnesyltransferase in ABA regulation of guard cell anion channels and plant water loss. *Sci.* **282**: 287-290.
- Pellny, T. K., Locato, V., Vivancos, P. D., Markovic, J., De Gara, L., Pallardo, F. V. und Foyer, C. H. 2009. Pyridine nucleotide cycling and control of intracellular redox state in relation to poly (ADP-ribose) polymerase activity and nuclear localization of glutathione during exponential growth of Arabidopsis cells in culture. *Mol. Plant* **2**: 442-456.
- Perkins, E., Sun, D. X., Nguyen, A., Tulac, S., Francesco, M., Tavana, H., Nguyen, H., Tugendreich, S., Barthmaier, P., Couto, J., Yeh, E., Thode, S., Jarnagin, K., Jain, A., Morgans, D. und Melese, T. 2001. Novel inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase/PARP1 and PARP2 identified using a cell-based screen in yeast. *Cancer Res.* **61**: 4175-4183.
- Petrucco, S. 2003. Sensing DNA damage by PARP-like fingers. *Nucleic Acids Res.* **31**: 6689-6699.
- Peukert, S. und Schwahn, U. 2004. New inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP). *Expert Opin. Ther. Pat.* **14**: 1531-1551.
- Preiss, J., Schlaeger, R. und Hiltz, H. 1971. Specific inhibition of poly adribose polymerase by thymidine and nicotinamide in HeLa cells. *FEBS Lett.* **19**: 244-246.
- Puchta, H., Swoboda, P. und Hohn, B. 1995. Induction of intrachromosomal homologous recombination in whole plants. *Plant J.* **7**: 203-210.
- Rabie, G. H. 2005. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and kinetin on the response of mungbean plants to irrigation with seawater. *Mycorrhiza* **15**: 225-230.
- Rademacher, W. 2000. Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. *Annu. Rev. Plant. Phys.* **51**: 501-531.
- Redman, R. S., Sheehan, K. B., Stout, R. G., Rodriguez, R. J. und Henson, J. M. 2002. Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Sci.* **298**: 1581.
- Ren, T. R., Xie, Y. H., Zhu, W. W., Li, Y. H. und Zhang, Y. 2007. Activities and toxicity of a novel plant growth regulator 2-furan-2-yl-[1,3] dioxolane. *J. Plant Growth Regul.* **26**: 362-368.

- Rhodes, D., Nadolska-Orczyk, A. und Rich, P. J. 2002. Salinity, osmolytes and compatible solutes. *In* Salinity: environment - plants - molecules. Eds.: Läuchli, A. und Lüttge, U. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 181-204.
- Rizhsky, L., Liang, H. J. und Mittler, R. 2002. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiol.* **130**: 1143-1151.
- Roberts, J. K., DeSimone, N. A., Lingle, W. L. und Dure, L. 1993. Cellular concentrations and uniformity of cell-type accumulation of two LEA proteins in cotton embryos. *Plant Cell* **5**: 769-780.
- Rodrigues, M. L., Pacheco, C. M. A. und Chaves, M. M. 1995. Soil-plant water relations, root distribution and biomass partitioning in *Lupinus albus* L. under drought conditions. *J. Exp. Bot.* **46**: 947-956.
- Romero, C., Belles, J. M., Vaya, J. L., Serrano, R. und Culiñez-Macia, F. A. 1997. Expression of the yeast trehalose-6-phosphate synthase gene in transgenic tobacco plants: pleiotropic phenotypes include drought tolerance. *Planta* **201**: 293-297.
- Roosens, N. H., Al Bitar, F., Loenders, K., Angenon, G. und Jacobs, M. 2002. Overexpression of ornithine- Δ -aminotransferase increases proline biosynthesis and confers osmotolerance in transgenic plants. *Mol. Breeding* **9**: 73-80.
- Rosenthal, F., Nanni, P., Roschitzki, B., Gehrig, P. und Hottiger, M. 2011. ARTD1/PARP1 ADP-ribosylates lysine residues of the core histone tails. *FEBS J.* **278**: 15.
- Rouchaud, J., Gustin, F. und Wauters, A. 1996. Imidacloprid insecticide soil metabolism in sugar beet field crops. *B. Environ. Contam. Tox.* **56**: 29-36.
- Ruf, A., DeMurcia, J. M., DeMurcia, G. M. und Schulz, G. E. 1996. Structure of the catalytic fragment of poly(ADP-ribose) polymerase from chicken. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 7481-7485.
- Ruf, A., Rolli, V., de Murcia, G. und Schulz, G. E. 1998. The mechanism of the elongation and branching reaction of poly(ADP-ribose) polymerase as derived from crystal structures and mutagenesis. *J. Mol. Biol.* **278**: 57-65.
- Ruiz-Lozano, J. M. 2003. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza* **13**: 309-317.
- Saez, A., Robert, N., Maktabi, M. H., Schroeder, J.I., Serrano, R. und Rodriguez, P.L. 2006. Enhancement of abscisic acid sensitivity and reduction of water consumption in *Arabidopsis* by combined inactivation of the protein phosphatases type 2C ABI1 and HAB1. *Plant Physiol.* **141**: 1389-1399.
- Saito, S., Okamoto, M., Okamoto, M., Kushiro, T., Koshihara, T., Kamiya, Y., Hirai, N., Todoroki, Y., Sakata, K., Nambara, E. und Mizutani, M. 2006. A plant growth retardant, uniconazole, is a potent inhibitor of ABA catabolism in *Arabidopsis*. *Biosci. Biotech. Bioch.* **70**: 1731-1739.

- Scandalios, J. G. 1997. Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Woodbury, NY.
- Scheuring, J. und Schramm, V. L. 1995. Stereochemistry of the ADP-ribosylation catalyzed by pertussis toxin. *J. Am. Chem. Soc.* **117**: 12653-12654.
- Scheuring, J. und Schramm, V. L. 1997. Pertussis toxin: transition state analysis for ADP-ribosylation of G-protein peptide α_{i3} C20. *Biochemistry-US* **36**: 8215-8223.
- Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J. C. und de Murcia, G. 2006. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* **7**: 517-528.
- Schulz, U. und Scheinpflug, H. 1988. Sterol biosynthesis inhibiting fungicides. *In Sterol biosynthesis inhibitors: pharmaceutical and agrochemical aspects.* Eds.: Berg D. und Plembel M. VCH Publishers, Weinheim. pp. 215-261.
- Serraj, R. und Sinclair, T. R. 2002. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? *Plant Cell Environ.* **25**: 333-341.
- Sestili, P., Spadoni, G., Balsamini, C., Scovassi, I., Cattabeni, F., Duranti, E., Cantoni, O., Higgins, D. und Thomson, C. 1990. Structural requirements for inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *J. Cancer Res. Clin.* **116**: 615-622.
- Shall, S. und de Murcia, G. 2000. Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model? *Mutat. Res. -DNA Repair* **460**: 1-15.
- Sharma, A. K., Singh, D. P., Kumar, J., Singh, A., Tewari, A. N., Singh, K. P., Karwasra, S. S. und Grewal, A. S. 2001. Efficacy of thifluzamide in the control of loose smut of wheat (*Triticum aestivum*) caused by *Ustilago segetum*. *Indian J. Agr. Sci.* **71**: 648-649.
- Shinkwin, A. E., Whish, W. J. D. und Threadgill, M. D. 1999. Synthesis of thiophenecarboxamides, thieno [3,4-c] pyridin-4(5H)-ones and thieno[3,4-d]pyrimidin-4(3H)-ones and preliminary evaluation as inhibitors of poly(ADP-ribose)polymerase (PARP). *Bioorgan. Med. Chem* **7**: 297-308.
- Shou, H. X., Bordallo, P. und Wang, K. 2004. Expression of the Nicotiana protein kinase (NPK1) enhanced drought tolerance in transgenic maize. *J. Exp. Bot.* **55**: 1013-1019.
- Smirnoff, N. 1993. Tansley Review .52. the role of active oxygen in the response of plants to water-deficit and desiccation. *New Phytologist* **125**: 27-58.
- Smirnoff, N. und Cumbes, Q. J. 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* **28**: 1057-1060.
- Smith, S. 2001. The world according to PARP. *Trends Biochem. Sci.* **26**: 174-179.
- Sonnleitner, B. und Chmiel, H. 2011. Wachstum: Kinetik und Prozessführung. *In Bioprozesstechnik.* Ed.: Chmiel, H. Elsevier, Spektrum, Akad. Verlag, pp. 99-149.

- Soos, J., Engelhardt, J. I., Siklos, L., Havas, L. und Majtenyi, K. 2004. The expression of PARP, NF-kappa B and parvalbumin is increased in Parkinson disease. *Neuroreport* **15**: 1715-1718.
- Spollen, W. G., Sharp, R. E., Saab, I. N. und Wu, Y. 1993. Regulation of cell expansion in roots and shoots at low water potentials. *In* Water Deficits: Plant responses from cell to community. Eds.: Smith J.A.C. und Griffiths H. BIOS Scientific Publishers, Oxford. pp. 37-52.
- Subramanian, K. S. und Charest, C. 1999. Acquisition of N by external hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus and its impact on physiological responses in maize under drought-stressed and well-watered conditions. *Mycorrhiza* **9**: 69-75.
- Takeda, S., Tadele, Z., Hofmann, I., Probst, A. V., Angelis, K. J., Kaya, H., Araki, T., Mengiste, T., Scheid, O. M., Shibahara, K. I., Scheel, D. und Paszkowski, J. 2004. BRU1, a novel link between responses to DNA damage and epigenetic gene silencing in Arabidopsis. *Gene Dev.* **18**: 782-793.
- Teisseire, H. und Vernet, G. 2000. Ascorbate and glutathione contents in duckweed *Lemna minor* as biomarkers of the stress generated by copper, folpet and diuron. *Biomarkers* **5**: 263-273.
- Tentori, L., Leonetti, C., Scarsella, M., d'Amati, G., Portarena, I., Zupi, G., Bonmassar, E. und Graziani, G. 2002. Combined treatment with temozolomide and poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor enhances survival of mice bearing hematologic malignancy at the central nervous system site. *Blood* **99**: 2241-2244.
- Thielert, W. 2006. A unique product: The story of the imidacloprid stress shield. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* **59**: 73-86.
- Tian, R. H., Zhang, G. Y., Yan, C. H. und Dai, Y. R. 2000. Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase and activation of caspase-3-like protease in heat shock-induced apoptosis in tobacco suspension cells. *FEBS Lett.* **474**: 11-15.
- Tiwari, B. S., Belenghi, B. und Levine, A. 2002. Oxidative stress increased respiration and generation of reactive oxygen species, resulting in ATP depletion, opening of mitochondrial permeability transition, and programmed cell death. *Plant Physiol.* **128**: 1271-1281.
- Todorov, D., Alexieva, V. und Karanov, E. 1998. Effect of putrescine, 4-PU-30, and abscisic acid on maize plants grown under normal, drought, and rewatering conditions. *J. Plant Growth Regul.* **17**: 197-203.
- Tollenaar, M. und Lee, E. A. 2002. Yield potential, yield stability and stress tolerance in maize. *Field Crop. Res.* **75**: 161-169.
- Tomlin, C. D. S. 1995. The pesticide manual: incorporating The Agrochemicals handbook; a world compendium. British Crop Protection Council, Farnham.

- Umezawa, T., Yoshida, R., Maruyama, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. und Shinozaki, K. 2004. SRK2C, a SNF1-related protein kinase 2, improves drought tolerance by controlling stress-responsive gene expression in *Arabidopsis thaliana*. P. Natl. Acad. Sci. USA **101**: 17306-17311.
- Urao, T., Yakubov, B., Satoh, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Seki, M., Hirayama, T. und Shinozaki, K. 1999. A Transmembrane Hybrid-Type Histidine Kinase in Arabidopsis Functions as an Osmosensor. The Plant Cell Online **11**: 1743-1754.
- Vanden Bosche, H. 1988. Mode of action of pyridine, pyrimidine and azole antifungals. In Sterol Biosynthesis Inhibitors: Pharmaceutical and Agrochemical Aspects. Eds.: Berg D. und Plembel M. VCH Publishers, Weinheim. pp. 79-119.
- Vanderauwera, S., De Block, M., van de Steene, N., de Cottet, B. V., Metzlauff, M. und Van Breusegem, F. 2007. Silencing of poly(ADP-ribose) polymerase in plants alters abiotic stress signal transduction. P. Natl. Acad. Sci. USA **104**: 15150-15155.
- Vanderauwera, S., Zimmermann, P., Rombauts, S., Vandenabeele, S., Langebartels, C., Gruissem, W., Inzé, D. und Van Breusegem, F. 2005. Genome-wide analysis of hydrogen peroxide-regulated gene expression in Arabidopsis reveals a high light-induced transcriptional cluster involved in anthocyanin biosynthesis. Plant Physiol. **139**: 806-821.
- Verbruggen, N. und Hermans, C. 2008. Proline accumulation in plants: a review. Amino Acids **35**: 753-759.
- Verslues, P. E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J. H. und Zhu, J. K. 2006. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. Plant J. **45**: 523-539.
- Virag, L. und Szabo, C. 2002. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. Pharmacol. Rev. **54**: 375-429.
- Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Huckelhoven, R., Neumann, C., von Wettstein, D., Franken, P. und Kogel, K. H. 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. P. Natl. Acad. Sci. USA **102**: 13386-13391.
- Wang, Y., Beath, M., Chalifoux, M., Ying, J. F., Uchacz, T., Sarvas, C., Griffiths, R., Kuzma, M., Wan, J. X. und Huang, Y. F. 2009. Shoot-specific down-regulation of protein farnesyltransferase (α -Subunit) for yield protection against drought in canola. Mol. Plant **2**: 191-200.
- Wang, Y., Ying, J. F., Kuzma, M., Chalifoux, M., Sample, A., McArthur, C., Uchacz, T., Sarvas, C., Wan, J. X., Dennis, D. T., McCourt, P. und Huang, Y. F. 2005. Molecular

- tailoring of farnesylation for plant drought tolerance and yield protection. *Plant J.* **43**: 413-424.
- Watson, C. Y., Whish, W. J. D. und Threadgill, M. D. 1998. Synthesis of 3-substituted benzamides and 5-substituted isoquinolin-1(2H)-ones and preliminary evaluation as inhibitors of poly(ADP-ribose)polymerase (PARP). *Bioorgan. Med. Chem* **6**: 721-734.
- Weltin, D., Holl, V., Hyun, J. W., Dufour, P., Marchal, J. und Bischoff, P. 1997. Effect of 6(5H)-phenanthridinone, a poly(ADP-ribose)polymerase inhibitor, and ionizing radiation on the growth of cultured lymphoma cells. *Int. J. Radiat. Biol.* **72**: 685-692.
- Whitby, A. J. und Whish, W. J. D. 1977. Poly(Adenosine Diphosphate Ribose) in Wheat. *Biochem. Soc. T.* **5**: 948-949.
- Whitby, A. J. und Whish, W. J. D. 1978. Poly(Adenosine Diphosphate Ribose) Glycohydrolase in Germinating Wheat Embryos. *Biochem. Soc. T.* **6**: 619-620.
- Willmitzer, L. 1979. Demonstration of *in vitro* covalent modification of chromosomal proteins by poly(ADP)ribosylation in plant nuclei. *FEBS Lett.* **108**: 13-16.
- Xiao, B. Z., Chen, X., Xiang, C. B., Tang, N., Zhang, Q. F. und Xiong, L. Z. 2009. Evaluation of seven function-known candidate genes for their effects on improving drought resistance of transgenic rice under field conditions. *Mol. Plant* **2**: 73-83.
- Yang, S., Vanderbeld, B., Wan, J. und Huang, Y. 2010. Narrowing down the targets: towards successful genetic engineering of drought-tolerant crops. *Mol. Plant* **3**: 469-490.
- Yang, Y., Sulpice, R., Himmelbach, A., Meinhard, M., Christmann, A. und Grill, E. 2006. Fibrillin expression is regulated by abscisic acid response regulators and is involved in abscisic acid-mediated photoprotection. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 6061-6066.
- Yokota, A., Kawasaki, S., Iwano, M., Nakamura, C., Miyake, C. und Akashi, K. 2002. Citrulline and DRIP-1 protein (ArgE homologue) in drought tolerance of wild watermelon. *Ann. Bot. -London* **89**: 825-832.
- Yoshida, T., Nishimura, N., Kitahata, N., Kuromori, T., Ito, T., Asami, T., Shinozaki, K. und Hirayama, T. 2006. ABA-Hypersensitive germination3 encodes a protein phosphatase 2C (AtPP2CA) that strongly regulates abscisic acid signaling during germination among Arabidopsis protein phosphatase 2Cs. *Plant Physiol.* **140**: 115-126.
- Yu, S. W., Wang, H., Poitras, M. F., Coombs, C., Bowers, W. J., Federoff, H. J., Poirier, G. G., Dawson, T. M. und Dawson, V. L. 2002. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Sci.* **297**: 259-263.
- Zhang, M. C., Duan, L. S., Tian, X. L., He, Z. P., Li, J. M., Wang, B. M. und Li, Z. H. 2007. Uniconazole-induced tolerance of soybean to water deficit stress in relation to changes in photosynthesis, hormones and antioxidant system. *J. Plant Physiol.* **164**: 709-717.
- Zhou, G. C., Parikh, S. L., Tyler, P. C., Evans, G. B., Furneaux, R. H., Zubkova, O. V. , Benjes, P. A. und Schramm, V. L. 2004. Inhibitors of ADP-Ribosylating Bacterial Toxins

- Based on Oxacarbenium Ion Character at Their Transition States. *J. Am. Chem. Soc.* **126**: 5690-5698.
- Zhu, B. C., Su, J., Chan, M. C., Verma, D. P. S., Fan, Y. L. und Wu, R. 1998. Overexpression of a Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water- and salt-stress in transgenic rice. *Plant Sci.* **139**: 41-48.
- Zuccaro, A., Lahrmann, U., Guldener, U., Langen, G., Pfiffi, S., Biedenkopf, D., Wong, P., Samans, B., Grimm, C., Basiewicz, M., Murat, C., Martin, F. und Kogel, K. H. 2011. Endophytic life strategies decoded by genome and transcriptome analyses of the mutualistic root symbiont *Piriformospora indica*. *PLOS Pathog.* **7**: 1-25