

## Charakterisierung der *Arabidopsis thaliana* Glutathion S-Transferase Protein Familie

Aaron Maximilian Klepper

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Life Sciences der Technischen Universität München zur Erlangung eines  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Kay H. Schneitz

Prüfer\*innen der Dissertation:

1. Prof. Dr. Erwin Grill
2. apl. Prof. Dr. Philippe Schmitt-Kopplin

Die Dissertation wurde am 29.07.2022 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die TUM School of Life Sciences am 14.11.2022 angenommen.

# I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis.....	I
II.	Abbildungsverzeichnis.....	V
III.	Tabellenverzeichnis.....	X
IV.	Abkürzungsverzeichnis.....	XII
	Zusammenfassung.....	1
	Abstract.....	3
1	Einleitung.....	5
1.1	Triazin-Herbizide.....	6
1.2	Glutathion Transferasen.....	8
1.2.1	Klassifizierung.....	9
1.2.2	Struktur.....	10
1.2.3	Chromosomale Lokalisierung der GST-Gene.....	12
1.2.4	Expression und subzelluläre Lokalisation.....	13
1.2.5	Katalytische Funktionen.....	20
1.2.6	Nicht-katalytische Funktionen.....	22
1.3	Diphenylether-Herbizide.....	24
1.4	Natürliche Diphenylether.....	29
1.5	Genom Editierung mittels CRISPR/Cas.....	35
1.5.1	DNA-Reparaturmechanismen.....	35
1.5.2	Biotechnologische Endonukleasen.....	37
1.6	Zielsetzung.....	44
2	Material und Methoden.....	45
2.1	Geräte.....	45
2.2	Chemikalien und Lösungsmittel.....	46
2.3	Primer.....	46
2.4	Organismen und ihre Anzucht.....	46
2.4.1	<i>Escherichia coli</i> .....	46
2.4.2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	47
2.4.3	Bakterien-Medien.....	47
2.4.4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	48
2.4.5	<i>Arabidopsis thaliana</i> .....	50
2.5	Molekularbiologische Methoden.....	51
2.5.1	Nukleinsäure Isolierung.....	51
2.5.2	Polymerasekettenreaktion.....	53
2.5.3	Genotypisierung von Pflanzen.....	54

2.5.4	T7-Endonuklease I Assay .....	55
2.5.5	Klassische Klonierung .....	55
2.5.6	Golden-Gate basierte Klonierung .....	56
2.5.7	Transformation von Organismen .....	59
2.5.8	GST-Substratumsatz in <i>S. cerevisiae</i> .....	64
2.6	Physiologische Methoden .....	65
2.6.1	Oberflächensterilisation von Samen .....	65
2.6.2	Belastung von Keimlingen .....	65
2.6.3	Wurzelwachstumsassay .....	66
2.6.4	Bestimmung von Chlorophyll- und Carotinoid-Gehalt .....	66
2.6.5	<i>In planta</i> Bestimmung von Glutathion-Konjugaten .....	66
2.7	Analytische Methoden .....	67
2.7.1	Nicht-enzymatische GSH-Konjugation.....	67
2.7.2	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie .....	67
2.8	Software, Datenbanken und Internetressourcen.....	70
2.8.1	Datenbanken für DNA- und Protein-Sequenzen sowie Kristallstruktur .....	70
2.8.2	Datenbank für Genexpression.....	70
2.8.3	<i>Arabidopsis</i> T-DNA-Insertionslinien.....	70
2.8.4	Analyse von DNA- und Protein-Sequenzen sowie phylogenetische Analyse .....	70
2.8.5	Primer-Design .....	71
2.8.6	CIRSPR gRNA-Design.....	71
2.8.7	Simulierung, Visualisierung und Interaktion von Protein-3-D-Strukturen .....	71
2.8.8	Analyse von MS-Daten .....	71
2.8.9	Strukturformeln.....	71
2.8.10	Daten Analyse und Darstellung .....	72
3	Ergebnisse.....	73
3.1	Diphenylether-Herbizid-Wirkung auf <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	73
3.2	Einfluss der Diphenylether-Herbizid auf das Hefe-Wachstum .....	85
3.3	GS-Konjugation von Herbiziden durch AtGSTs in Hefe .....	92
3.3.1	Fluorodifen .....	93
3.3.2	Acifluorfen .....	97
3.3.3	Fomesafen .....	98
3.3.4	Oxyfluorfen.....	98
3.3.5	Bifenox.....	99
3.3.6	Nitrofen .....	100
3.3.7	Aclonifen.....	101

3.4	Herbizid-Belastung von <i>gstu28</i> T-DNA-Insertionslinie .....	103
3.5	Herbizid-Belastung GSTU28 Überexpressionslinien.....	107
3.6	GS-Konjugation von natürlichen Diphenylethern .....	111
3.6.1	Asterrinsäure .....	111
3.6.2	Asterrinsäuremethylester .....	113
3.6.3	Chloroasterrinsäure.....	114
3.6.4	Isochloroasterrinsäure .....	115
3.6.5	Pestheinsäure .....	115
3.6.6	Geodinhydrat.....	116
3.6.7	Isogeodinhydrat.....	117
3.6.8	Dichloroasterrinsäuremethylester .....	118
3.6.9	Cyperin.....	119
3.6.10	Violaceol I .....	121
3.6.11	Violaceol II .....	121
3.6.12	Wirkung der natürlichen Diphenylether auf <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	122
3.7	Natürliche Variation des GSTU5 Gens .....	124
3.8	CRISPR/Cas .....	134
3.8.1	pDGE-System .....	134
3.8.2	Multi-Kingdom Golden-Gate basiertes Cas9-System .....	136
3.9	Homologe Rekombination <i>in planta</i> .....	163
4	Diskussion.....	169
4.1	Detoxifizierende Rolle der GSTs .....	169
4.2	Endogene Substrate der GSTs .....	182
4.3	CRISPR/Cas .....	188
5	Literaturverzeichnis.....	i
6	Anhang.....	xxviii
6.1	Oligomere .....	xxviii
6.2	Mikroorganismen .....	xxxv
6.3	Pflanzenlinien .....	xliv
6.4	Diphenylether-Herbizid-Wirkung auf <i>Arabidopsis thaliana</i> Akzessionen .....	xlviii
6.5	<i>gstu28</i> CRISPR-Linie und T-DNA-Insertionslinie .....	I
6.6	GST-Gen-Cluster .....	liii
6.7	CRISPR/Cas-Analyse der GST-Gen-Cluster-Deletionen.....	liv
6.8	<i>gstu8</i> CIRPSR u1-u5 #1-9-3 und #1-9-4 .....	lvi
6.9	<i>gstu8</i> CRISPR u1-u7 .....	lviii
6.10	Massen der Metabolite in CRISPR/Cas-Linien.....	lx

6.11	nsSNPs der AtGSTs .....	C
6.12	Natürliche Diphenylether .....	cii
7	Danksagung .....	CXXXV
8	Lebenslauf .....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
8.1	Persönliche Daten .....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
8.2	Ausbildung und Studium .....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
8.3	Publikationen.....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>

## II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Anzahl zugelassener Herbizid-Formulierungen in Deutschland .....	5
Abbildung 1-2: Chemische Struktur der Triazin-Herbizide .....	7
Abbildung 1-3: Glutathion und Glutathion-Derivate.....	8
Abbildung 1-4: Phylogenetischer Baum der GST-Superfamilie in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	10
Abbildung 1-5: Thioredoxin-Domäne von zwei <i>Arabidopsis</i> Glutathion Transferasen .....	11
Abbildung 1-6: Schematische Darstellung der 5 Chromosomen und Position der <i>Arabidopsis</i> Glutathion Transferasen.....	12
Abbildung 1-7: Regulierung der GST-Expression durch exogen applizierte Phytohormone.....	15
Abbildung 1-8: Abiotische Faktoren und Regulation der GST-Expression .....	17
Abbildung 1-9: Regulation der GST-Expression durch biotische Faktoren.....	19
Abbildung 1-10: GST katalysierte Reaktion unter Verbrauch von Glutathion .....	21
Abbildung 1-11: GST Isomerase- und Reduktase-Funktion.....	22
Abbildung 1-12: Grundstruktur der Diphenylether-Herbizide .....	25
Abbildung 1-13: Liganden-Bindung in die Protoporphyrinogen IX Oxidase.....	26
Abbildung 1-14: Diphenylether-Herbizide .....	27
Abbildung 1-15: Detoxifizierung von Diphenylether-Herbiziden als Glutathion-Derivate .....	28
Abbildung 1-16: Strukturvergleich von Cyperin mit Triclosan .....	29
Abbildung 1-17: Violaceol I und II im Vergleich zu Diorcinol .....	30
Abbildung 1-18: Generelle Struktur natürlicher dicarboxylierter Diphenylether .....	31
Abbildung 1-19: Asterrinsäure und Derivate .....	32
Abbildung 1-20: Chloroasterrinsäure Isoformen .....	33
Abbildung 1-21: Aus <i>Pestalotiopsis</i> spp. Isolierte Diphenylether .....	34
Abbildung 1-22: Natürliche Funktion der mikrobiellen CRISPR-Systeme .....	39
Abbildung 1-23: Kristallstruktur der Cas9 aus <i>Streptococcus pyogenes</i> (4OO8) .....	41
Abbildung 1-24: Kristallstruktur der Cas9 aus <i>Staphylococcus aureus</i> (5AXW) .....	43
Abbildung 2-1: Verwendete GeneRuler für die Genotypisierung von Pflanzen.....	55
Abbildung 2-2: gRNA-Design .....	58
Abbildung 3-1: Wurzelwachstum von Col-0 Keimlingen nach Fluorodifen-Belastung .....	74
Abbildung 3-2: Pigmentkonzentrationen von Col-0 Keimlingen nach unterschiedlich langer Fluorodifen-Belastung.....	75
Abbildung 3-3: Pigmentkonzentration von <i>Arabidopsis thaliana</i> Keimlingen nach Fluorodifen-Belastung .....	77
Abbildung 3-4: Wurzelwachstum von Col-0 Keimlingen nach Belastung mit Acifluorfen und Nitrofen78	

Abbildung 3-5: Pigmentkonzentration von <i>Arabidopsis thaliana</i> Keimlingen nach Belastung mit Acifluorfen und Nitrofen .....	79
Abbildung 3-6: EC <sub>50</sub> Werte der Herbizide auf die Pigmentkonzentration .....	80
Abbildung 3-7: Frischgewicht der mit Fluorodifen belasteten Akzessionen.....	81
Abbildung 3-8: Pigmentkonzentration nach Fluorodifen-Belastung.....	82
Abbildung 3-9: Wirkung von CDNB und Fluorodifen auf das Hefe-Wachstum.....	86
Abbildung 3-10: Wirkung von Aclonifen und Nitrofen auf das Hefe-Wachstum .....	88
Abbildung 3-11: Wirkung von Acifluorfen, Oxyfluorfen und Bifenox auf das Hefe-Wachstum.....	91
Abbildung 3-12: CDNB-Konjugation durch heterolog exprimierte AtGSTs in Hefe.....	92
Abbildung 3-13: Analytik GST exprimierender Hefen nach Belastung mit Fluorodifen .....	94
Abbildung 3-14: Zeit-abhängige Konjugation von Fluorodifen durch die AtGSTU1.....	96
Abbildung 3-15: Fluorodifen-Konjugation durch heterolog exprimierte AtGSTs in Hefe .....	96
Abbildung 3-16: Acifluorfen-Konjugation durch heterolog exprimierte AtGSTs in Hefe .....	97
Abbildung 3-17: Fomesafen-Konjugation durch heterolog exprimierte AtGSTs in Hefe .....	98
Abbildung 3-18: Oxyfluorfen-Konjugation durch heterolog exprimierte AtGSTs in Hefe.....	99
Abbildung 3-19: Bifenox-Konjugation durch heterolog exprimierte AtGSTs in Hefe.....	100
Abbildung 3-20: Nitrofen-Konjugation durch heterolog exprimierte AtGSTs in Hefe .....	101
Abbildung 3-21: Aclonifen-Konjugation durch heterolog exprimierte AtGSTs in Hefe.....	101
Abbildung 3-22: Genotypisierung <i>gstu28</i> .....	104
Abbildung 3-23: Pigmentkonzentrationen nach Fluorodifen Belastung.....	105
Abbildung 3-24: In planta Konjugation von Fluorodifen .....	106
Abbildung 3-25: Konjugation von Fluorodifen in GSTU28 Überexpressionslinien.....	107
Abbildung 3-26: Pigmentkonzentration der AtGSTU28-Überexpressionslinien nach Fluorodifen-Belastung.....	110
Abbildung 3-27: Expressionsanalyse mittels qPCR.....	110
Abbildung 3-28: Chromatogramm vom GS-Konjugation von Asterrinsäure .....	112
Abbildung 3-29: Glutathion-Konjugat von Asterrinsäure durch AtGSTs.....	113
Abbildung 3-30: Glutathion-Konjugat von Asterrinsäuremethylester durch AtGSTs .....	113
Abbildung 3-31: GS-Konjugat von Chloroasterrinsäure durch AtGSTs.....	114
Abbildung 3-32: GS-Konjugat von Isochloroasterrinsäure durch AtGST .....	115
Abbildung 3-33: GS-Konjugat von Pestheinsäure durch AtGST .....	116
Abbildung 3-34: GS-Konjugat von Geodinhydrat durch AtGST .....	117
Abbildung 3-35: GS-Konjugat von Isogeodinhydrat durch AtGST .....	118
Abbildung 3-36: GS-Konjugat von Dichloroasterrinsäuremethylester.....	119
Abbildung 3-37: Chromatogramm Cyperin-GS-Konjugation.....	120

Abbildung 3-38: GS-Konjugat von Cyperin durch AtGST .....	121
Abbildung 3-39: GS-Konjugat von Violaceol I durch AtGST.....	121
Abbildung 3-40: GS-Konjugat von Violaceol II durch AtGST.....	122
Abbildung 3-41: Wirkung von Cyperin, Violaceol I und Violaceol II auf das Wurzelzuwachs von <i>A. thaliana</i> .....	123
Abbildung 3-42: Wirkung von Asterrinsäuremethylester und Pestheinsäure auf den Wurzelzuwachs von <i>A. thaliana</i> .....	124
Abbildung 3-43: Atrazin-Glutathion-Konjugation durch AtGSTU5 SNPS heterolog exprimiert in Hefe .....	127
Abbildung 3-44: Terbutylazin-Glutathion-Konjugation durch AtGSTU5 SNPs heterolog exprimiert in Hefe .....	128
Abbildung 3-45: Sequenzvergleich von AtGSTU5 nsSNPs und AIGSTU5.....	130
Abbildung 3-46: Atrazin- und Terbutylazin-Glutathion-Konjugation durch AIGSTU5 heterolog exprimiert in Hefe .....	130
Abbildung 3-47: CDNB-Glutathion-Konjugation durch die AtGSTU5 SNPs und AIGSTU5 heterolog exprimiert in Hefe .....	131
Abbildung 3-48: Triazin-Glutathion-Konjugation durch die AtGSTU5 SNPs und AIGSTU5 heterolog exprimiert in Hefe .....	133
Abbildung 3-49: AtGSTU1 bis AtGSTU7 Gen-Cluster.....	135
Abbildung 3-50: Allgemeiner, schematischer Aufbau der T-DNA des Cas9-Systems.....	137
Abbildung 3-51: Genotypisierung mittels PCR auf die Deletion des AtGSTU1-Genes .....	138
Abbildung 3-52: Transiente Expression von SaCas9 in Tabak .....	139
Abbildung 3-53: Deletion des AtGSTU10-Genes .....	141
Abbildung 3-54: Relative Deletionsrate des GSTU10-Genes mittels unterschiedlicher SaCas9-Varianten .....	142
Abbildung 3-55: Genotypisierung der segregierenden CRISPR GSTU10-Linien .....	143
Abbildung 3-56: Populationsanalyse der GST-Deletionen in T-DNA-Insertionslinien.....	145
Abbildung 3-57: Genotypisierung der gstu4#12 CRISPR u1-u5.....	146
Abbildung 3-58: Schematische Darstellung der Gencluster-Deletion der gstu4#12 CRISPR U1+U5 Linie .....	147
Abbildung 3-59: Genotypisierung gstu4#12 CRISPR U2+U5 .....	148
Abbildung 3-60: Schematische Struktur der Gencluster-Deletion der gstu4#12 CRISPR u2-u5 .....	149
Abbildung 3-61: GS-DNB-Konjugation des GSTU2/U5 Hybrid im Vergleich zu den Wildtyp-Genen ..	150
Abbildung 3-62: Genotypisierung der gstu8.2#2 CRISPR U1+U5 .....	150
Abbildung 3-63: Schema der Deletion der gstu8.2#2 CRISPR U1+U5 Linie.....	151



Abbildung 3-64: Genotypisierung der <i>gstu8.2#2</i> CRISPR U1+U7 .....	152
Abbildung 3-65: Keimungsrate der CRISPR-Deletionsmutanten.....	153
Abbildung 3-66: Expression von AtGSTUs in <i>Arabidopsis thaliana</i> Keimlingen .....	154
Abbildung 3-67: Pigmentkonzentration nach Fluorodifen Belastung.....	155
Abbildung 3-68: Volcano-Plot des Massen-Intensitätsunterschiedes der <i>gstu8</i> CRISPR u1-u5.....	158
Abbildung 3-69: Pigmentkonzentration nach Fluorodifen Belastung.....	160
Abbildung 3-70: Konjugation von Fluorodifen mit Glutathion in planta.....	161
Abbildung 3-71: Volcano-Plot des Massen-Intensitätsunterschiedes der <i>gstu8</i> CRISPR u1-u7 #1-6-2 .....	162
Abbildung 3-72: cis-homologe Rekombination des artifiziellen Flu-Genes .....	164
Abbildung 3-73: Schematischer Aufbau der zu generierenden HR-Populationslinien .....	165
Abbildung 3-74: Screening auf Homologe Rekombination des AtFLU-Genes.....	166
Abbildung 3-75: Struktureller Aufbau und Homologe Rekombination Ereignis des zweiten Reporter- Konstrukt .....	168
Abbildung 4-1: Relativer Umsatz der Triazin Herbizide durch die GSTU5 Varianten in Hefe .....	170
Abbildung 4-2: Dreidimensionale Struktur der AtGSTU5 .....	171
Abbildung 4-3: Simulierte Bindung von Atrazin an die H-Site von natürlichen GSTU5-Variationen...	172
Abbildung 4-4: Selektive Konjugation von Diphenylether-Herbizide durch <i>Arabidopsis</i> GSTs.....	174
Abbildung 4-5: Expression der AtGSTU28 im Vergleich zur AtGSTU1 und AtGSTU27 .....	176
Abbildung 4-6: Sequenzvergleich G-Site der AtGSTFs.....	178
Abbildung 4-7: Glutathion-Konjugation und physiologische Wirkung der natürlichen Diphenylether .....	179
Abbildung 4-8: Detektierte Massen der CRISPR-Linien.....	183
Abbildung 4-9: GSH- und Cys-Konjugat der Indolglucosinolat-Biosynthese .....	184
Abbildung 4-10: Strukturvergleich der AtGSTU2 mit der L2-Site der AtGSTF2 .....	185
Abbildung 4-11: Vergleich der Bindung von Quercetin in die L2-Site der AtGSTF2.....	186
Abbildung 4-12: Bindung von Flavonoiden in die postulierte L2-Site der AtGSTU2-Homodimer.....	187
Abbildung 4-13: Vergleichender Aufbau unterschiedlicher CRISPR/Cas-Systeme.....	191
Abbildung 6-1:Pigmentkonzentrationen nach Belastungen mit Fomesafen, Oxyfluorfen und Nitrofen .....	xlvi
Abbildung 6-2: Pigmentkonzentrationen nach Belastungen mit Acifluorfen, Bifenox und Aclonifen .	xlix
Abbildung 6-3:Pigmentkonzentrationen der CRISPR u28-Linien .....	l
Abbildung 6-4: Pigmentkonzentration nach Belastung mit Acifluorfen, Fomesafen oder Oxyfluorfen ..	li
Abbildung 6-5: Pigmentkonzentration nach Belastung mit Nitrofen oder Aclonifen .....	lii
Abbildung 6-6: AtGSTU19-AtGSTU23-Gen-Cluster.....	liii

Abbildung 6-7: T7-Endonuklease I Verdau der CRISPR/Cas-Pflanzen für das Target-Gen AtGSTU1.....	liv
Abbildung 6-8: Pigmentkonzentration nach Belastung mit Acifluorfen, Fomesafen oder Oxyfluorfen	lvi
Abbildung 6-9: Pigmentkonzentration nach Belastung mit Nitrofen oder Aclonifen .....	lvii
Abbildung 6-10: Pigmentkonzentration nach Belastung mit Acifluorfen, Fomesafen oder Oxyfluorfen .....	lviii
Abbildung 6-11: Pigmentkonzentration nach Belastung mit Nitrofen oder Aclonifen .....	lix
Abbildung 6-12: Vergleich der H-Site der AtGSTU5 Q82H- und V130E-Variante mit der Col-0 Variante c	
Abbildung 6-13: Vergleich der H-Site der AtGSTU5 R192K-Variante und AtGSTU6 mit der AtGSTU5 Col- 0-Variante.....	ci

### III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Zelluläre Lokalisation der GST-Klassen .....	20
Tabelle 2-1: Verwendete Geräte .....	45
Tabelle 2-2: Verwendete E. coli Stämme .....	47
Tabelle 2-3: Zusammensetzung unterschiedliche Bakterien Medien .....	47
Tabelle 2-4: Verwendete Antibiotika und deren Endkonzentration .....	48
Tabelle 2-5: SD-Medium für Hefe Kulturen.....	49
Tabelle 2-6: Schwefelfreie Makro- und Mikrosalze.....	50
Tabelle 2-7: Zusammensetzung von MS-Medium.....	51
Tabelle 2-8: DNA-Extraktionspuffer die Isolierung von gDNA aus Pflanzenmaterial.....	53
Tabelle 2-9: PCR-Ansätze.....	54
Tabelle 2-10: PCR-Programme .....	54
Tabelle 2-11: Cut/Ligation Ansatz für die unterschiedlichen Level bei der Golden-Gate basierten Klonierung .....	57
Tabelle 2-12: Zyklische Änderung der Reaktionsbedingungen für die Cut/Ligation .....	58
Tabelle 2-13: Medien für elektrokompetente Zellen.....	60
Tabelle 2-14: Zusammensetzung des Infiltrationsmedium.....	62
Tabelle 2-15: Transformationsansatz für die Hefe Transformation.....	63
Tabelle 3-1 Nicht-synonyme SNPs der AtGSTU5 .....	126
Tabelle 3-2: Level I Elemente des CRISPR/Cas9-Systems .....	136
Tabelle 3-3: Generierte CRISPR-Linien mit T-DNA-Insertionslinien als genetischer Hintergrund.....	144
Tabelle 3-4: Erste Pflanzengeneration mit Homologer Rekombination .....	166
Tabelle 6-1: In der Arbeit verwendete Primer für die Klonierung, Genotypisierung und Sequenzierung .....	xxviii
Tabelle 6-2: In der Arbeit verwendete gRNAs für die Klonierung von CRISPR/Cas9 Konstrukten....	xxxiii
Tabelle 6-3: E. coli-Stämme mit pflanzlichen GSTs die im Zuge der Arbeit erzeugt und verwendet wurden .....	xxxv
Tabelle 6-4: E. coli-Stämme mit Konstrukten für CRISPR/Cas die im Zug der Arbeit erzeugt und verwendet wurden .....	xxxvi
Tabelle 6-5: In der Arbeit verwendete GST-exprimierenden S. cerevisiae Hefen.....	xli
Tabelle 6-6: Verwendete Überexpressions- und Insertionslinien .....	xliv
Tabelle 6-7: CIRPSR/Cas-Linien.....	xliv
Tabelle 6-8: Sequenzvergleich der AtGSTs im AtGSTU1-AtGSTU7-Gen-Cluster .....	liii
Tabelle 6-9: Sequenzvergleich der AtGSTs im AtGSTU19-AtGSTU23-Gen-Cluster .....	liii
Tabelle 6-10: Analyse der Deletionen des GSTU1/U7-Clusters mittels PCR .....	liv

Tabelle 6-11: Genotypisierung der CRIPSR/Cas9 für Teilabschnitte des AtGSTU1-AtGSTU7-Gen-Clusters .....	lv
Tabelle 6-12: Auswahl möglicher Verbindungen für die abgereicherten Massen in der gstu8 CRISPR u1- u5 #1-9-3 Linie im Vergleich zum genetischen Background gstu8.....	lx
Tabelle 6-13: Auswahl möglicher Verbindungen für die angereicherten Massen in der gstu8 CRISPR u1- u5 #1-9-3 Linie im Vergleich zur Revertante gstu8 CRISPR u1-u5 #1-9-4 .....	xcvii
Tabelle 6-14: Auswahl möglicher Verbindungen für die abgereicherten Massen in der gstu8 CRISPR u1- u7 #1-6-2 Linie im Vergleich zum genetischen Background gstu8.....	xcviii
Tabelle 6-15: Natürliche Diphenylether, deren Ursprungsorganismus und Bioaktivität .....	cii

## IV. Abkürzungsverzeichnis

<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AtGST	<i>Arabidopsis thaliana</i> Glutathion Transferase
AtSPS	<i>Arabidopsis thaliana</i> Solanesyldiphosphatsynthase
BcGST	<i>Brassica campestris</i> Glutathion transferase
Cas	CRISPR-associated-Protein
cDNA	komplementäre DNA
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeat
DHAR	Dehydroascorbatreduktasen
ENR	Enoyl-ACP-Reduktase
eV	empty Vektor; Leervektor
FT-ICR	Fourier Transform Ionenzyklotronresonanz
GFP	green fluorescent protein
GSH	Glutathion
GST	Glutathion Transferase
HPLC	high performance liquid chromatography; Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HR	Homologe Rekombination
HRAC	Herbicide Resistance Action Committee
MAPEG	membrane associated protein in eicosanoid and glutathione metabolism
NBD-Cl	4-Chlor-7-Nitrobenzofuranzan
NHEJ	Non-homologouse end-joining
NLS	nuclear localization signal
PAM	protospacer adjacent motif
pDGE	Dicot Genome Editing
PPO	Protoporphyrinogen-Oxidase
SaCas9	<i>Staphylococcus aureus</i> Cas9
SD-Minimalmedium	synthetic defined Minimalmedium
sgRNA	single guide RNA
SpCas9	<i>Streptococcus pyogenes</i> Cas9
SPS	Solanesyldiphosphatsynthase, Solanesyldiphosphatsynthase
TCHQD	Tetrachlorohydroquinon-Dehalogenase

## Zusammenfassung

Pestizide sind ein wichtiger Bestandteil der modernen, industriellen Landwirtschaft, während für die ökologische Landwirtschaft der Einsatz von diesen stark reglementiert ist. Um den konkurrierenden Beiwuchs auf Feldern einzudämmen, werden Herbizide als Vorauf- oder Nachaufherbizide auf die Felder ausgebracht. Während die Voraufherbizide meist Breitbandherbizide sind, sind die Nachaufherbizide selektive Herbizide. Diese Selektivität ist hauptsächlich durch die unterschiedliche Detoxifizierung der Herbizide in dem Beiwuchs und den Nutzpflanzen gegeben. Nutzpflanzen metabolisieren meist Fremdstoffe mittels schneller Phase I Enzymen gefolgt von den langsameren Phase II Enzymen. Dem gegenüber erfolgt die Metabolisierung von Fremdstoffen in Beiwuchspflanzen ausschließlich über die langsameren Phase II Enzyme. Ein essentieller Phase II Detoxifizierungsmechanismus ist die Konjugation von Fremdstoffen an das Tripeptid Glutathion (GHS). Diese Reaktion wird durch die Glutathion-Transferasen (GSTs) katalysiert, die ubiquitär in allen eukaryotischen Organismen vorkommen. Die GST-Proteinfamilie in Pflanzen besteht aus mehreren Mitgliedern, die sich in unterschiedliche Klassen unterteilen lassen. In *Arabidopsis thaliana* wurden 55 GSTs identifiziert.

Ziel dieser Arbeit war die funktionelle Charakterisierung der GSTs. Hierfür wurden die AtGSTs homolog in Hefe exprimiert und deren Konjugationsaktivität gegenüber unterschiedlichen Substraten untersucht. Mit Hilfe eines CRISPR/Cas9-Systems wurden Einzel- und Multiple-Gen-Mutanten generiert, um die Substratspezifität der AtGSTs gegenüber Xenobiotika und endogenen Substraten zu analysieren. Hierfür wurde, dass CRISPR/Cas9-System etabliert und mit diesem ein System entwickelt, das die Homologe-Rekombination *in planta* ermöglichen sollte, um gezielte Gen-Modifikationen oder Promoter- Replacements vornehmen zu können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Substratspezifität der AtGSTs gegenüber der Klasse der Diphenylether-Herbizide untersucht. Hierfür wurden die AtGSTs heterolog in *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert und die einzelnen Hefe-Stämme mit den Diphenylether-Herbiziden belastet. Mittels analytischer HPLC wurde die Menge an gebildeten Konjugat bestimmt. Neben den Herbiziden wurden auch natürliche Diphenylether für die Analyse der Substratspezifität analysiert. Diese natürlichen Diphenylether werden von Pilzen synthetisiert, die Endophyten oder Phytopathogene sind. Es konnte gezeigt werden, dass die einzelnen Diphenylether-Herbizide durch unterschiedliche AtGSTs bevorzugt konjugiert werden. Das Diphenylether-Herbizid Fluorodifen wurde dominant durch die AtGSTU28 konjugiert, während Bifenox durch die AtGSTU27 und die atypische AtGSTF12 konjugiert wurde. Für Oxyfluorfen und Nitrofen zeigte die atypische AtGSTF12 die höchste Aktivität. Gegenüber Acifluorfen zeigte die AtGSTF9 die höchste Aktivität, während die beiden Diphenylether-Herbizide Fomesafen und Aclonifen nicht spezifisch konjugiert wurden. Für die natürlichen Diphenylether konnte

gezeigt werden, dass die *AtGSTU2* und *AtGSTU4* für alle Verbindungen, mit Ausnahme der Asterrinsäure, die höchste Aktivität der getesteten *AtGSTs* aufwiesen.

Die Substratspezifität von unterschiedlichen Proteinvarianten der *AtGSTU5* und der *Arabidopsis lyrata* *GSTU5* wurde mittel den Triazin-Herbiziden untersucht. Die einzelnen Varianten zeigten dabei unterschiedliche Konjugationsmengen an. Für vier der sechs getesteten Triazin-Herbizide zeigte die Aminosäureaustauschvariante A96T eine verringerte Menge an Konjugat. Die *AtGSTU5* konjugierte alle sechs getesteten Triazin-Herbizide in geringerer Menge als die *AtGSTU5* Variante aus Col-0.

Für die *in planta* Analyse der spezifischen GST-Konjugation ergibt sich stets das Problem der Redundanz der einzelnen GSTs. Im Zuge dieser Arbeit wurde daher ein CRISPR/Cas9-System entwickelt. Anschließend wurde mit dessen Hilfe unterschiedliche Multi-Gen-Deletionsmutanten generiert. Diese Mutanten wurden nicht nur hinsichtlich ihres Phänotyps gegenüber einiger Herbizide, sondern auch in Bezug auf endogene Metabolite hin untersucht. Es ist bekannt, dass GST in endogene Prozesse involviert sind. Dabei können sie bei Biosynthese Glutathion an ein Intermediat konjugieren und somit Schwefelgruppen einbringen. Zudem sind sie auch bei Transportprozessen involviert. Mittels Isotopenlabelling und massenspektroskopischer Analyse sollten Unterschiede schwefelhaltiger Metabolite gezeigt werden. Jedoch konnten nur Metabolit-Änderungen für nicht schwefelhaltige Verbindungen detektiert werden.

## Abstract

Pesticides are an important part of modern and industrial agriculture, while their use in organic farming is strongly regulated. To control growth of competing weeds in fields, herbicides are applied to fields as pre-emergence or post-emergence herbicides. While the pre-emergence herbicides are mostly non-selective herbicides, the post-emergence herbicides are selective herbicides. This selectivity is mainly due to the differential detoxification of the herbicides in the weed and the crop plants. Crops mostly metabolize xenobiotics using fast phase I enzymes followed by slower phase II enzymes. On the other hand, the metabolism of xenobiotics in weed plants occurs via the slower phase II enzymes. An essential phase II detoxification mechanism is the conjugation of xenobiotics to the tripeptide glutathione (GSH). This reaction is catalyzed by the glutathione transferases (GSTs), which are ubiquitous in all eukaryotic organisms. The GST protein family in plants consists of several members that can be divided into different classes. In *Arabidopsis thaliana* 55 GSTs have been identified.

The aim of this work was the functional characterization of the GSTs. For this purpose, the AtGSTs were in yeast homologously expressed and their conjugation activity towards different substrates was analyzed. Using a CRISPR/Cas9 system, single and multiple gene mutants were generated. Those were used to analyze the substrate specificity of AtGSTs towards xenobiotics and endogenous substrates. For this purpose, the CRISPR/Cas9 system was established and furthermore used to develop a system for homologous recombination *in planta* to generate targeted gene modifications or promoter replacements.

Aim of this work, the substrate specificity of AtGSTs against the class of diphenyl ether herbicides was investigated. For this purpose, the AtGSTs were expressed heterologously in *Saccharomyces cerevisiae* and the individual yeast strains were exposed to the different diphenyl ether herbicides. The amount of conjugate formed by the AtGST was determined by analytical HPLC. In addition to herbicides, the substrate specificity of AtGSTs against natural diphenyl ethers was also analyzed. These natural diphenyl ethers are synthesized by fungi that are endophytes or phytopathogens. It could be shown that the individual diphenyl ether herbicides are more or less preferentially conjugated by different AtGSTs. The diphenyl ether herbicide fluorodifen was dominantly conjugated by the AtGSTU28, while bifenoxy was conjugated by the AtGSTU27 and the atypical AtGSTF12. For oxyfluorfen and nitrofen, the atypical AtGSTF12 showed the highest activity. AtGSTF9 showed the highest activity against acifluorfen, while the two diphenyl ether herbicides fomesafen and aclonifen were not conjugated specifically. The natural diphenyl ethers were conjugated by the tested AtGSTs with their basal activity towards diphenyl ethers.

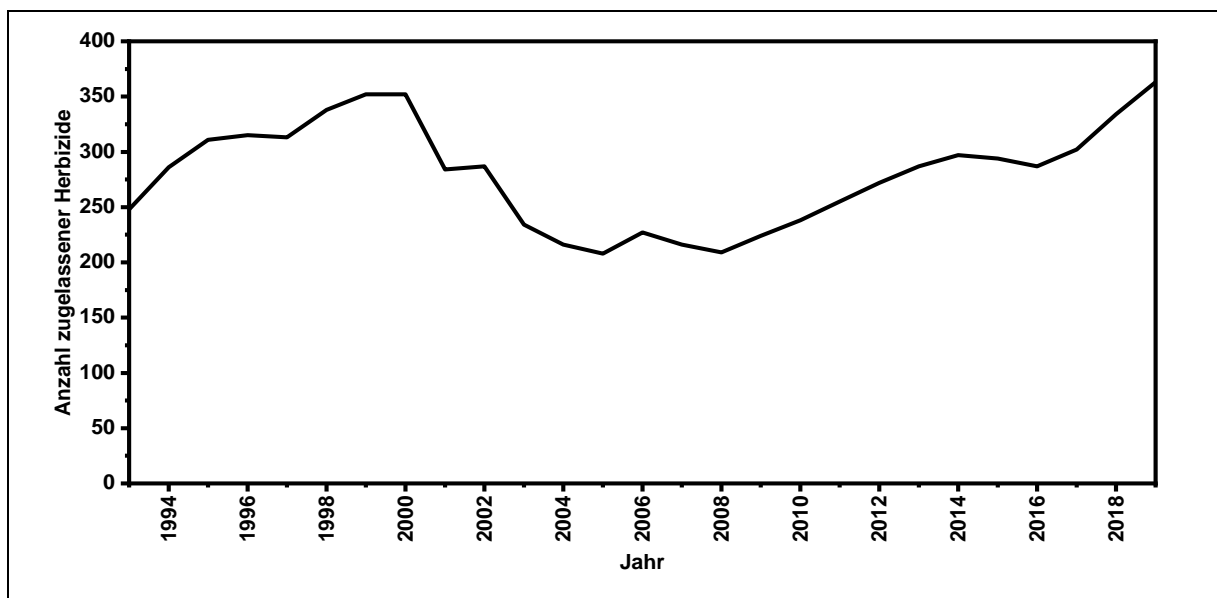


The substrate specificity of different protein variants of AtGSTU5 and the *Arabidopsis lyrata* GSTU5 variant was investigated using triazine herbicides. The individual variants showed different amounts of conjugation. For four of the six triazine herbicides tested, the amino acid substitution variant A96T showed a reduced amount of conjugate. The A/GSTU5 conjugated all six triazine herbicides tested at lower levels than the AtGSTU5 variant from Col-0.

The problem of redundancy of the individual GSTs always arises for the *in-planta* analysis of the specific GST conjugation. A CRISPR/Cas9 system was therefore developed in the course of this work. Subsequently, with its help, different multi-gene deletion mutants were generated. These mutants were not only examined with regard to their phenotype towards some herbicides, but also with regard to endogenous metabolites. It is known that GSTs are involved in endogenous processes. They can conjugate glutathione to an intermediate during biosynthesis and thus introduce sulfur groups. They are also involved in transport processes. Isotope labeling and mass spectroscopic analysis should be used to show differences in sulfur-containing metabolites. However, only changes for non-sulfur-containing compounds could be detected.

## 1 Einleitung

Für das Jahr 2050 wird eine Weltbevölkerung von fast 10 Milliarden Menschen erwartet, während gleichzeitig die nutzbare Ackerlandfläche abnimmt (Ray et al. 2013). Dies führt dazu, dass die Ernährung der Weltbevölkerung zunehmend schwerer wird. Es werden mehrere Ansätze verfolgt, um diese Probleme zu lösen. Einerseits wird versucht eine Ertragssteigerung durch die Züchtung oder biotechnologische Generierung von effizienteren Nutzpflanzen zu erreichen (1.5 Genom Editierung mittels CRISPR/Cas) andererseits müssen die Ertragsverluste durch Pathogene und durch Beiwuchs, welcher um Ressourcen konkurriert, reduziert werden. Um den Pathogenen und den konkurrierenden Beiwuchs zu reduzieren, werden auf landwirtschaftlichen Nutzflächen Pestizide eingesetzt. Die Pestizide werden abhängig von dem zu behandelten Schädling unterschieden. So werden Fungizide gegen phytopathogene Pilze eingesetzt. Insektizide werden zur Behandlung gegen Insekten eingesetzt, die als Herbivore den Pflanzenbestand vernichten könne. Um den Beiwuchs, der um Ressourcen konkurriert, zu bekämpfen, kommen Herbizide zum Einsatz. Im Optimalfall wirken Herbizide toxisch auf den Beiwuchs, jedoch nicht auf die Nutzpflanzen. In Deutschland kam es in den 1990er Jahren bis zur Jahrtausendwende zu einem Anstieg der zugelassenen Herbizide, der nach der Jahrtausendwende rückläufig war. Erst ab den 2010er bis dato kam es zu einem erneuten Anstieg der Zulassungen (Abbildung 1-1). (Berichte über Inlandsabsatz und Export von Pflanzenschutzmitteln 2021)



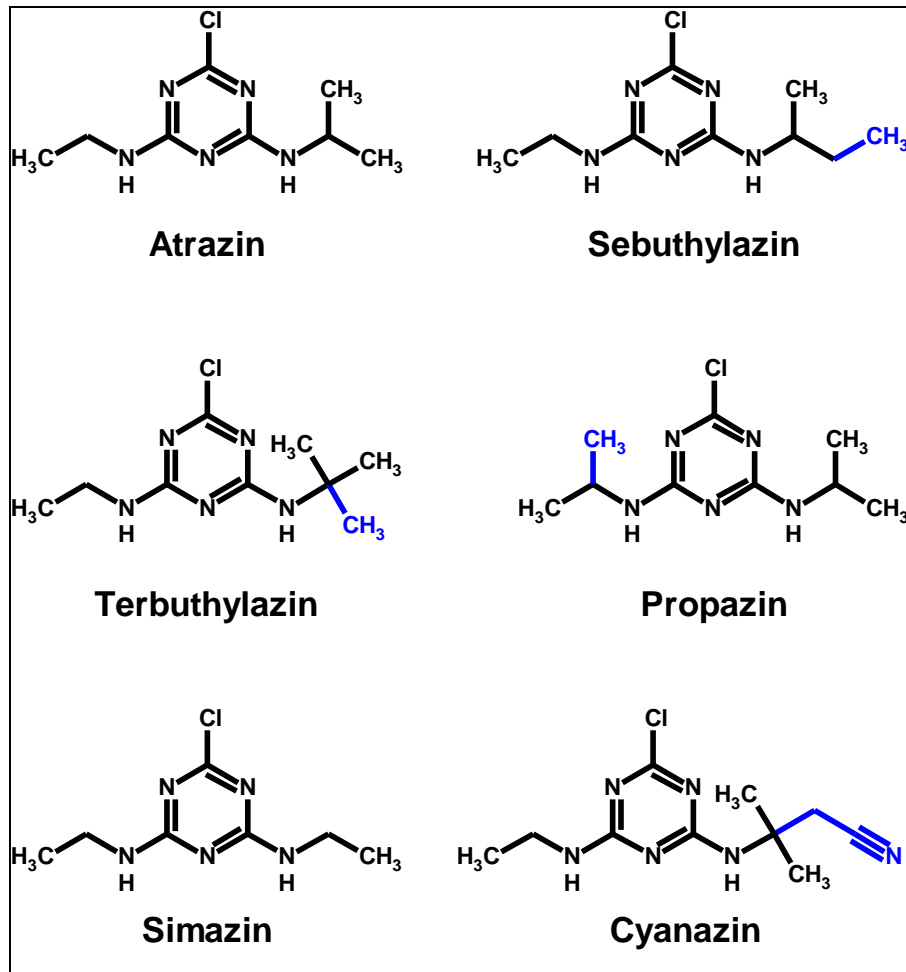
**Abbildung 1-1: Anzahl zugelassener Herbizid-Formulierungen in Deutschland**

Dargestellt ist im Zeitraum von 1993 bis 2018 die Anzahl der zugelassenen Formulierungen, die als Herbizide eingesetzt werden, in Deutschland. In den 1990er stieg die Anzahl der zugelassenen Herbizide an, während er in den 2000er Jahren die Zulassungen wieder abnahm. In den 2018er Jahren kam es zu einem erneuten Anstieg der Anzahl der zugelassenen Mittel mit Herbizid-Wirkung. (nach Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit)

Eine Anforderung an die Herbizide ist, dass diese selektiv auf den Beiwuchs wirken. Dazu können die Herbizide vor dem Ausbringen der Nutzpflanzen, als so genannte Vorlaufherbizide (Vats 2015), auf die Agrarfläche ausgebracht werden. Bei diesen handelt es sich meist um nicht-selektive Herbizide, die sowohl auf den Beiwuchs als auch auf die Agrarpflanze wirken (Vats 2015). Dem gegenüber stehen die selektiven Herbizide, die gezielt auf den Beiwuchs wirken (Usui 2001; Vats 2015). Hierfür weisen die entsprechenden Agrarpflanzen eine Resistenz gegenüber den selektiven Herbiziden auf (Rendina et al. 1990). Meist lässt sich die selektive Wirkung bzw. die Resistenz auf eine unterschiedliche Entgiftung des Herbizids durch den Beiwuchs im Vergleich zu Agrarpflanzen zurückführen (Owen 1991; Dixon et al. 2003). Bei den Agrarpflanzen erfolgt die Detoxifizierung zweiphasig, während die Entgiftung bei den meisten Unkräutern einphasig erfolgt (1.3 Diphenylether-Herbizide; Dixon et al. 2003). Dabei ist der letzte Schritt der zweiphasigen Entgiftung und der Schritt der einphasigen Entgiftung jeweils die Konjugation des Herbizids an hydrophile Substanzen. Eine dieser Konjugationsreaktionen ist die Bindung von Xenobiotika, wie beispielsweise Herbizide, an Glutathion durch die Glutathion Transferasen (Edwards 2000; Frova 2006; Mashiyama et al. 2014).

## 1.1 Triazin-Herbizide

Die *in planta* Konjugation von Glutathion an die Triazin-Herbizide ist eine der am besten beschriebenen Detoxifikationsreaktionen. Vor allem für Atrazin (2-Chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-1,3,5-triazin, Abbildung 1-2) ist die molekulare Wirkung auf Pflanzen und die *in planta* Entgiftung von Atrazin gut untersucht (Lamoureux et al. 1970; Shimabukuro et al. 1970). Atrazin stellt den Prototyp der Triazin-Herbizide da und ist eines der meist genutzten Herbizide weltweit (Hirschberg und McIntosh 1983; Goloubinoff et al. 1984). In der Europäischen Union ist der Einsatz von Atrazin seit 2004 verboten, da Rückstände im Erdreich und Grundwasser eine hohe Persistenz aufweisen (Jablonowski et al. 2011). Als Ersatz für Atrazin werden weitere Triazin-Herbizide, wie das Terbutylazin, Methyl-Atrazin, verwendet (Jablonowski et al. 2011).



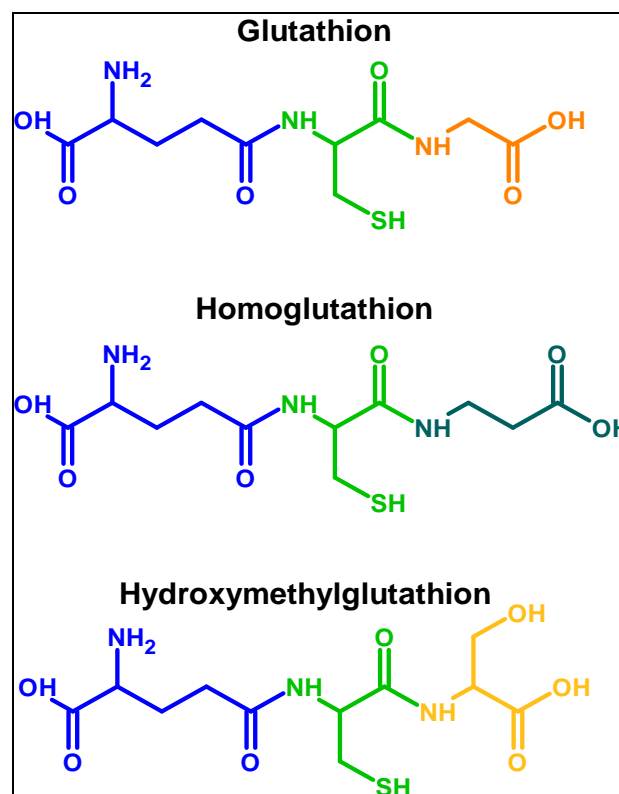
**Abbildung 1-2: Chemische Struktur der Triazin-Herbizide**

Dargestellt sind die Triazin-Herbizide Atrazin, Sebuthylazin, Terbutylazin, Propazin, Simazin und Cyanazin. Die Substituenten im Vergleich zu Atrazin sind in Blau hervorgehoben dargestellt. Simazin unterscheidet sich strukturell von Atrazin in der Substitution der Methyl-Gruppe durch ein Wasserstoff-Atom.

Die Triazin-Herbizide werden als Vorläufer-Herbizide eingesetzt und inhibieren den Elektronen-Transport des Photosystem II. Die Inhibierung erfolgt durch die Bindung der Triazin-Herbizide an das D1-Protein, das nativ Plastochinon bindet (Mitsutake et al. 1986). Atrazin und die anderen Triazin-Herbizide werden *in planta* durch Glutathion Transferasen mit Glutathion konjugiert (Lamoureux et al. 1970; Shimabukuro et al. 1970; Cherifi et al. 2001).

## 1.2 Glutathion Transferasen

Glutathion Transferasen sind ubiquitär vorkommende Enzyme, die zum ersten Mal von Booth und Kollegen in Rattenlebern nachgewiesen wurden (Booth et al. 1961; Mashiyama et al. 2014). Sie katalysieren den nukleophilen Angriff von Glutathion (GSH) an elektrophile Substrate (Frova 2006; Mashiyama et al. 2014). GSH ist ein Tripeptid, bestehend aus den drei Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin und besitzt eine isopeptidischen Bindung zwischen der Glutaminsäure und dem Cystein. In Abbildung 1-3 ist die chemische Struktur des GSH-Moleküls, sowie von zwei natürlich vorkommenden Derivaten dargestellt.



**Abbildung 1-3: Glutathion und Glutathion-Derivate**

Das Glutathion Molekül besteht aus einer Glutaminsäure (blau) an die über die  $\gamma$ -Carboxygruppe in einer Isopeptidbindung Cystein (grün) gebunden ist. Über eine Peptidbindung ist an dieses Cystein ein Glycin (orange) gebunden. Im Unterschied zu Glutathion ist bei Homoglutathion das Glycin durch ein  $\beta$ -Alanin (dunkelgrün) und bei dem Hydroxymethylglutathion durch ein Serin ersetzt (gelb).

In Pflanzen konnten Glutathion-Konzentrationen zwischen 1 bis 10 mM bestimmt werden (Edwards 2000; Lallement et al. 2014). Dabei liegt das Glutathion-Molekül hauptsächlich in seiner reduzierten und damit aktiven Form vor. Neben Glutathion kommen in einigen Pflanzen auch Glutathion-Derivate vor. In Hülsenfrüchten wurde das Homoglutathion und in einigen Gräsern das Hydroxymethylglutathion nachgewiesen (Edwards 2000; Abbildung 1-3). Sie unterscheiden sich von Glutathion durch die Substitution des Glycins durch die Aminosäuren  $\beta$ -Alanin bei Homoglutathion oder durch Serin bei Hydroxymethylglutathion (Abbildung 1-3).

Sowohl in Pflanzen als auch in anderen Organismen ist die zentrale Rolle der GSTs die Entgiftung von Fremdstoffen und giftiger Intermediate, die während der Biosynthese entstehen können (Frova 2006). Auch sind einige GSTs selbst in biosynthetischen Prozessen involviert (Mashiyama et al. 2014; Czerniawski und Bednarek 2018). Bei diesen Prozessen wird meist der Schwefel des GSHs in ein Molekül eingebaut (Bednarek et al. 2009; Czerniawski und Bednarek 2018; Piślewska-Bednarek et al. 2018). Daneben besitzen die GSTs auch noch weitere katalytische und nicht katalytische Funktionen (1.2.5

Katalytische Funktion und 1.2.6 Nicht-katalytische Funktion), wie beispielsweise die Bindung von Flavonoiden und deren Transport in die Vakuole (Ahmad et al. 2017b; Dixon und Edwards 2018).

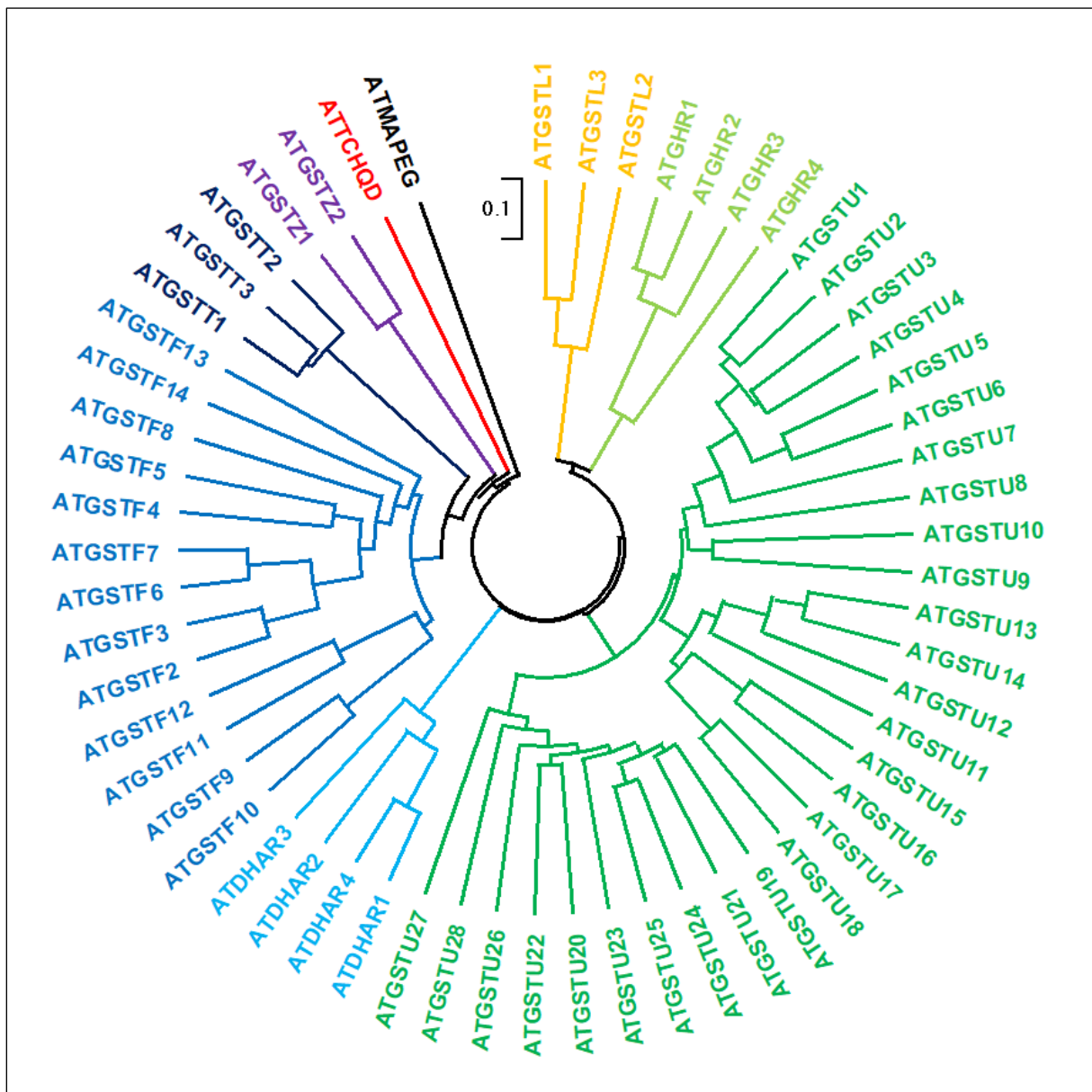
### 1.2.1 Klassifizierung

In *Arabidopsis thaliana* sind 55 GST-kodierende Gene bekannt (Dixon und Edwards 2018). Von diesen kodiert ein Gen für ein Membran-gebundenes GST-Protein, während die restlichen Gene lösliche GST-Proteine sind. Die 55 GSTs werden in acht Klassen gruppiert, abhängig von ihrer N-terminalen Sequenz. Diese sind die Klassen Zeta (GSTZ), Theta (GSTT), Lambda (GSTL), Tau (GSTU) und Phi (GSTF), sowie die Dehydroascorbatreduktasen (DHAR), Tetrachlorohydroquinon-Dehalogenase (TCHQD) und die MAPEG (Krajewski et al. 2013; Ahmad et al. 2017b; Dixon und Edwards 2018). MAPEG steht für *membrane associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism*. Sie sind evolutionär unabhängig von den anderen sieben GST-Klassen entstanden. Die phylogenetische Beziehung der *A. thaliana* GSTs ist in Abbildung 1-4 dargestellt.

Die sieben GST-Klassen in *A. thaliana* lassen sich in pflanzenspezifische und nicht-pflanzenspezifische GSTs unterteilen (Wagner et al. 2002; Dixon et al. 2011; Krajewski et al. 2013). Zu den pflanzenspezifischen GSTs zählen die Klassen Theta, Lambda, Tau, Phi und die DHAR. Mit 28 bzw. 13 Vertretern sind die Tau und Phi die größten Klassen in *Arabidopsis thaliana*, während für die Theta und Lambda Klasse jeweils drei Gene für die GSTs kodieren (Krajewski et al. 2013). Für die DHAR Klassen sind vier Gene bekannt. Des Weiteren gibt es für die Zeta Klasse zwei Isoformen. Sowohl die TCHQD als auch die MAPEG Klasse sind jeweils nur durch ein Gen in *Arabidopsis thaliana* vertreten (Wagner et al. 2002). Die Klassifizierung der GSTs erfolgt anhand der Sequenzhomologie der einzelnen Proteine. Um einer Klasse zugeordnet zu werden, muss das Protein eine Homologie von mindestens 40 % der gesamten Aminosäuresequenz gegenüber den restlichen Vertretern der Klasse aufweisen (Frova 2006; Lallement et al. 2014).

Neben den sieben GST-Klassen weisen weitere Protein-Klassen Charakteristika auf, die diese als GSTs klassifizieren würden. In *Arabidopsis thaliana* konnten vier Gene identifiziert werden, die für Glutathionylhydrochinon-Reduktasen (GHR) kodieren (Lallement et al. 2014). Die GHRs sind aus

Bakterien und Pilzen bekannt und weisen eine Deglutathionylierungsfunktion auf (Lallement et al. 2014). Sie zeigen strukturelle Ähnlichkeiten zu den GSTs der Lambda- und DHAR-Klasse (Lallement et al. 2015). Glutathionyliertes Quercetin konnte unter anderem als mögliche endogene Substrate der GHRs aus *Populus trichocarpa* identifiziert werden (Lallement et al. 2015). In der phylogenetischen Abstammung zeigt sich, dass die einzelnen Klassen inklusive der GHR-Klasse mit einander verwandt sind (Abbildung 1-4).



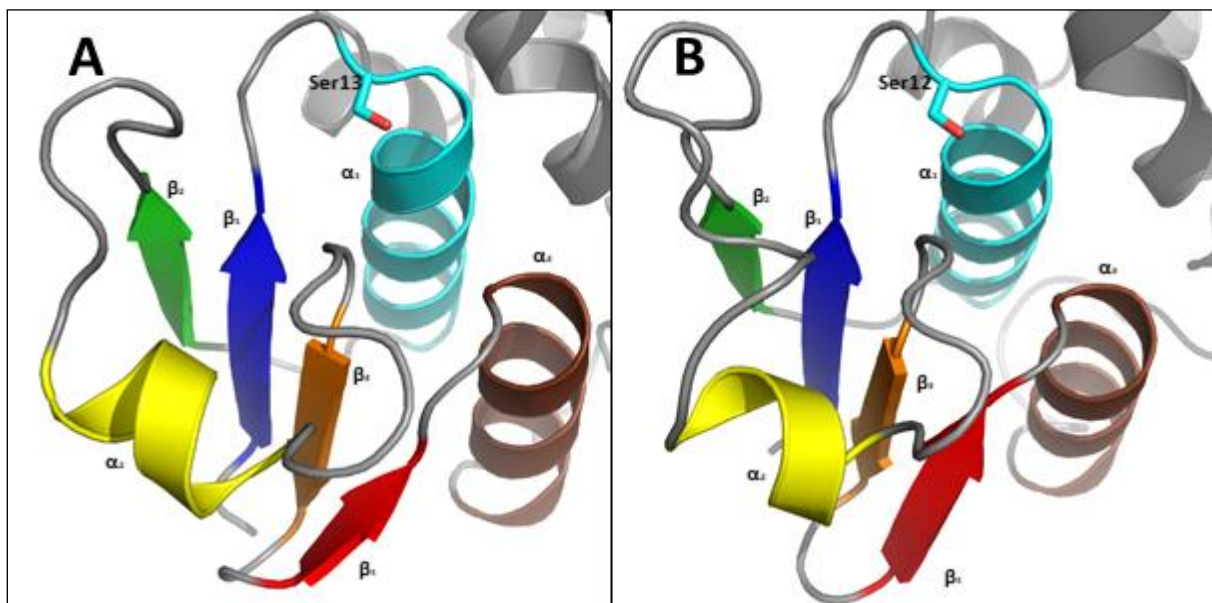
**Abbildung 1-4: Phylogenetischer Baum der GST-Superfamilie in Arabidopsis thaliana**

Dargestellt sind die Glutathion Transferasen aus Arabidopsis thaliana und deren phylogenetische Abstammung, unterteilt in die Klassen *Lambda*, *GHR*, *Tau*, *DHAR*, *Phi*, *Theta*, *Zeta*, *TCHQD* und *MAPEG*.

### 1.2.2 Struktur

Die Struktur der GSTs ist, trotz großer Unterschiede in der Primärstruktur, auf Ebene der Tertiärstruktur hoch konserviert. Diese Konservierung der Raumstruktur trifft auf alle eukaryotischen

GSTs zu (Lallement et al. 2014). Alle GSTs haben die Gemeinsamkeit, dass sie über eine Thioredoxin-Domäne verfügen. Diese wird durch eine Abfolge von konservierten Sekundärstrukturen gebildet, bei denen es sich im Detail um eine  $\beta_1\alpha_1\beta_2\alpha_2\beta_3\beta_4\alpha_3$ -Struktur handelt (Abbildung 1-5; Atkinson und Babbitt 2009). Diese bildet in der Tertiärstruktur die sogenannte G-Site aus. Die G-Site ist die Bindestelle für das reduzierte GSH-Molekül. Abhängig davon, ob sich am Carboxy-Ende des  $\beta_1$ -Faltblattes ein Tyrosin (Tyr, Y) oder vor der  $\alpha_1$ -Helix ein Serin (Ser, S) oder Cystein (Cys, C) befindet, können die GSTs in zwei unterschiedliche Typen, den Y-GSTs oder S/C-GSTs, unterteilt werden (Atkinson und Babbitt 2009). Diese Aminosäuren sind für die Bindung des GSH-Moleküls in der G-Site entscheidend, da sie das GSH-Molekül stabilisieren. Tyrosin und Serin bilden mit dem Cystein des GSH Wasserstoffbrückenbindungen aus, wodurch das nukleophile Thiolat stabilisiert und der  $pK_a$ -Wert erniedrigt wird (Atkinson und Babbitt 2009). Auf diese Weise katalysieren die GSTs die Konjugation von GSH mit den entsprechenden Substraten. Bei GSTs, die ein Cystein in der G-Site tragen, bildet sich mit dem GSH eine Disulfid-Bindung aus (Atkinson und Babbitt 2009). Somit kommt es erst zu einer Bindung von GSH an das Protein und anschließend zu einem Transfer auf das Substrat.



**Abbildung 1-5: Thioredoxin-Domäne von zwei Arabidopsis Glutathion Transferasen**

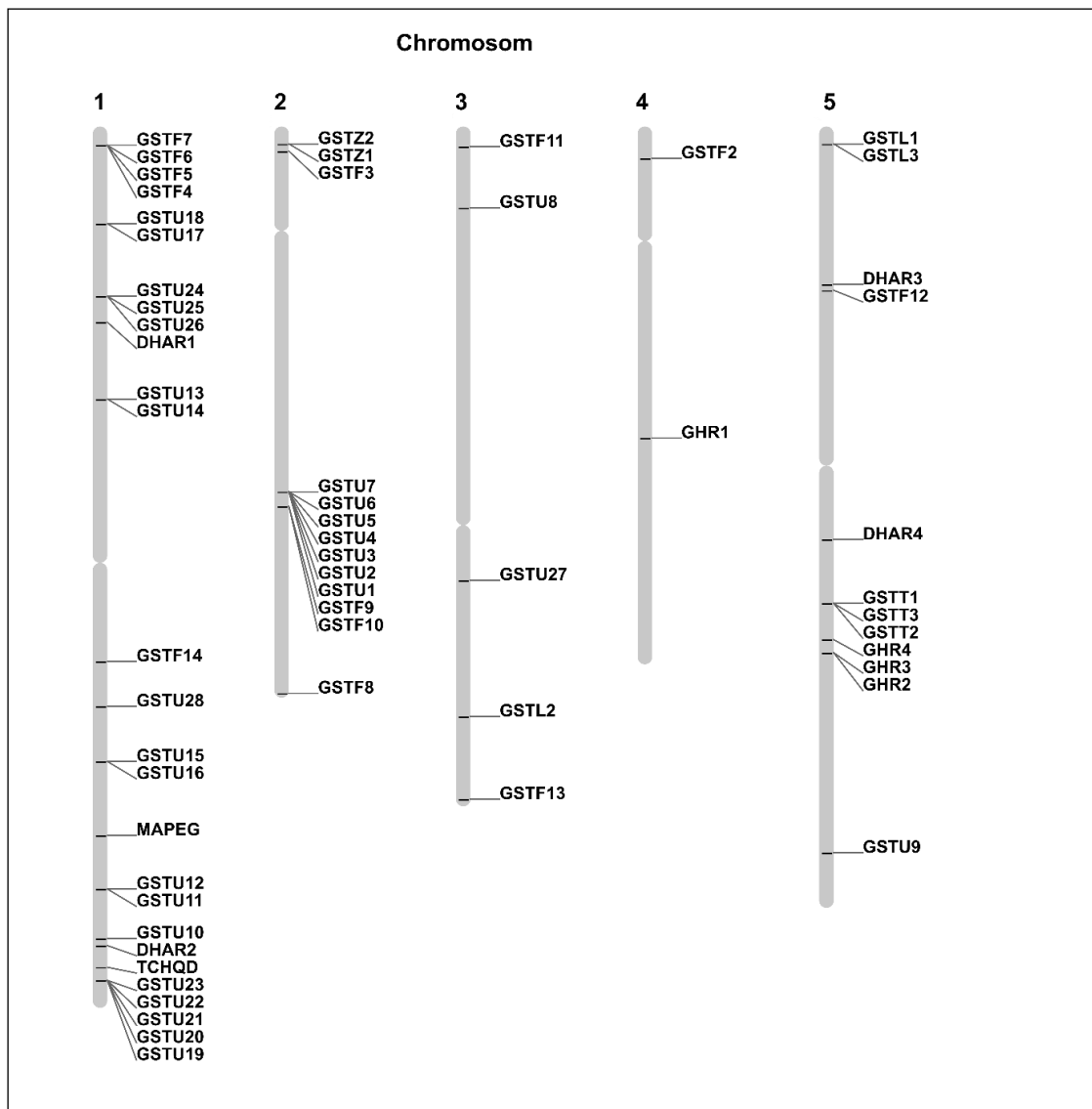
Dargestellt ist die Thioredoxin-Domäne von **A)** AtGSTU25 (5G5A (Ahmad et al. 2017a)) und **B)** AtGSTF2 (5A5K (Ahmad et al. 2016)) mit der  $\beta_1\alpha_1\beta_2\alpha_2\beta_3\beta_4\alpha_3$ -Struktur. Hervorgehoben sind in Blau das  $\beta_1$ -Faltblatt, in Cyan die  $\alpha_1$ -Helix, in Grün das  $\beta_2$ -Faltblatt, in Gelb die  $\alpha_2$ -Helix, in Orange das  $\beta_3$ -Faltblatt, in Rot das  $\beta_4$ -Faltblatt und in Braun die  $\alpha_3$ -Helix der G-Site. Zudem ist das katalytische Serin, Ser12 der AtGSTU25 und Ser13 der AtGSTF2, zu Beginn der  $\alpha_1$ -Helix zu sehen.

Bei Tieren finden sich sowohl die S/C-GSTs als auch die Y-GSTs, während pflanzliche GSTs ausschließlich dem S/C-Typ entsprechen. Die Y-GSTs sind daher spezifisch für Tiere. Sie sind evolutionär jünger als die GSTs des S/C-Typs. Unter den pflanzlichen GSTs tragen die GSTs der Lambda- und der DHAR-Klasse in der G-Site alle ein Cystein. Die anderen pflanzenspezifischen GST-Klassen besitzen, mit wenigen Ausnahmen, ein Serin in der G-Site (Atkinson und Babbitt 2009).



### 1.2.3 Chromosomale Lokalisierung der GST-Gene

Die GSTs und im Speziellen die GST-Isoformen einer Klasse sind durch Gen-Duplikationen entstanden (Dixon et al. 2002). Hinzu kommt, dass diese Duplikationen in vielen Fällen zu größeren genomischen Clustern der GSTs geführt haben. In Abbildung 1-6 sind die GST-Genlokalisierungen im *A. thaliana* Genom dargestellt. Die GSTs eines Clusters weisen auf Grund ihrer Entstehung aus Gen-Duplikationen eine hohe Homologie auf. Von den 55 GST, exklusive der GHR-Klasse, liegen 36 GSTs in Gen-Clustern vor. Des Weiteren sind zwei der vier GHRs ebenfalls chromosomal geclustert. Somit sind ungefähr 65 % der GSTs und GHRs in chromosomalen Clustern organisiert. Das größte Cluster, mit sieben GSTs, bilden die GSTU1 bis GSTU7, gefolgt mit fünf GSTs, die U19 bis U23 (Abbildung 1-6).



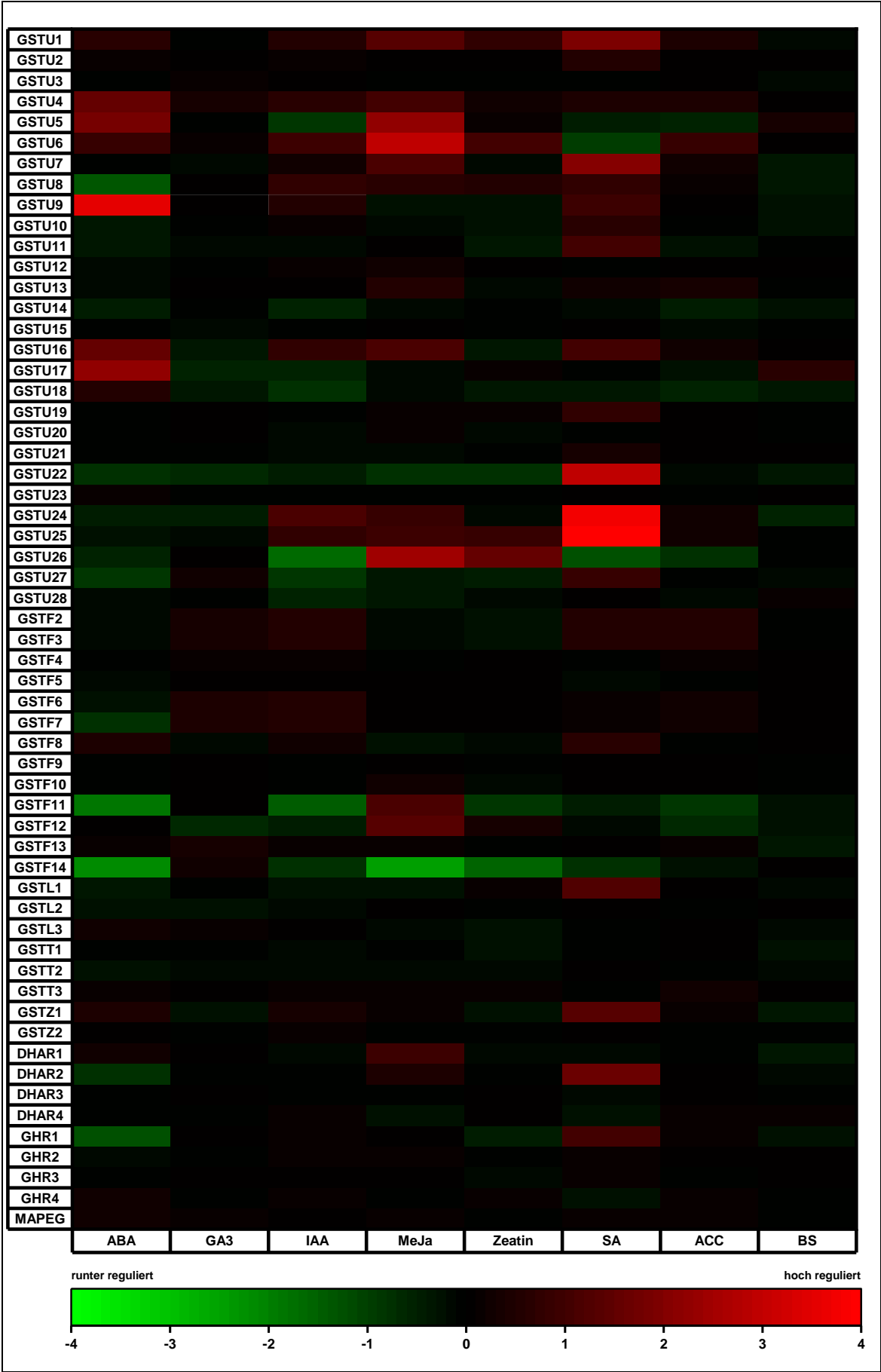
**Abbildung 1-6: Schematische Darstellung der 5 Chromosomen und Position der Arabidopsis Glutathion Transferasen**

Die AtGSTs sind über alle fünf Arabidopsis Chromosomen (1 bis 5) verteilt vorzufinden. Teilweise liegen die AtGSTs in chromosomalen Clustern vor.

Die Funktionsaufklärung der GSTs ist auf Grund der hohen Homologie erschwert, da häufig überlappende Aktivitäten und redundante Funktionalität vorliegen (Dixon et al. 2009; Dixon et al. 2010; Krajewski et al. 2013). Dies zeigt sich bei Einzel-Knock-Out-Mutanten, die selten Phänotypen aufweisen (Dixon et al. 2009; Dixon et al. 2010; Krajewski et al. 2013). Hinzukommt, dass Mehrfach-Mutanten von geclusterten GSTs nicht durch Kreuzung von Einzel-Mutanten generiert werden können.

#### 1.2.4 Expression und subzelluläre Lokalisation

Die Expression und die Aktivität der GSTs wird durch mehrere Faktoren beeinflusst. Gut beschrieben sind exogene Faktoren, die die Expression der einzelnen GSTs kontrollieren, wohingegen nur wenige endogene Faktoren bekannt sind (Gallé et al. 2018). Exogene, biotische und abiotische Stressfaktoren führen zur Akkumulation der GSTs (Wagner et al. 2002; Dixon et al. 2011; Mashiyama et al. 2014). In *A. thaliana* werden die unterschiedlichen GSTs durch die exogene Applikation der Phytohormone Salizylsäure, Ethylen, Cytokinine, Auxin, Abscisinsäure, Methyljasmonat und Brassinosteroide reguliert (Chen et al. 2012; Sharma et al. 2014). Die Induktion der GSTs durch exogene Phytohormone ist in Abbildung 1-7 zusammengefasst. Jedoch ist die Datenlage zu den Promotoranalysen von GST-Genen limitiert (Nianiou-Obeidat et al. 2017). Somit sind auch die unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren, die die Transkription der GSTs kontrollieren, nur unvollständig bekannt. Durch post-translationale Modifikation wie beispielsweise Phosphorylierung oder S-Glutathionylierung, kann die Aktivität der GSTs weiter kontrolliert werden (Gallé et al. 2018). Für die *AtGSTU19*, *AtGSTF7* und *AtGSTZ1* sowie für alle GSTLs und DHARs konnte gezeigt werden, dass diese post-translational glutathionyliert werden können (Dixon und Edwards 2010a; Gallé et al. 2018).



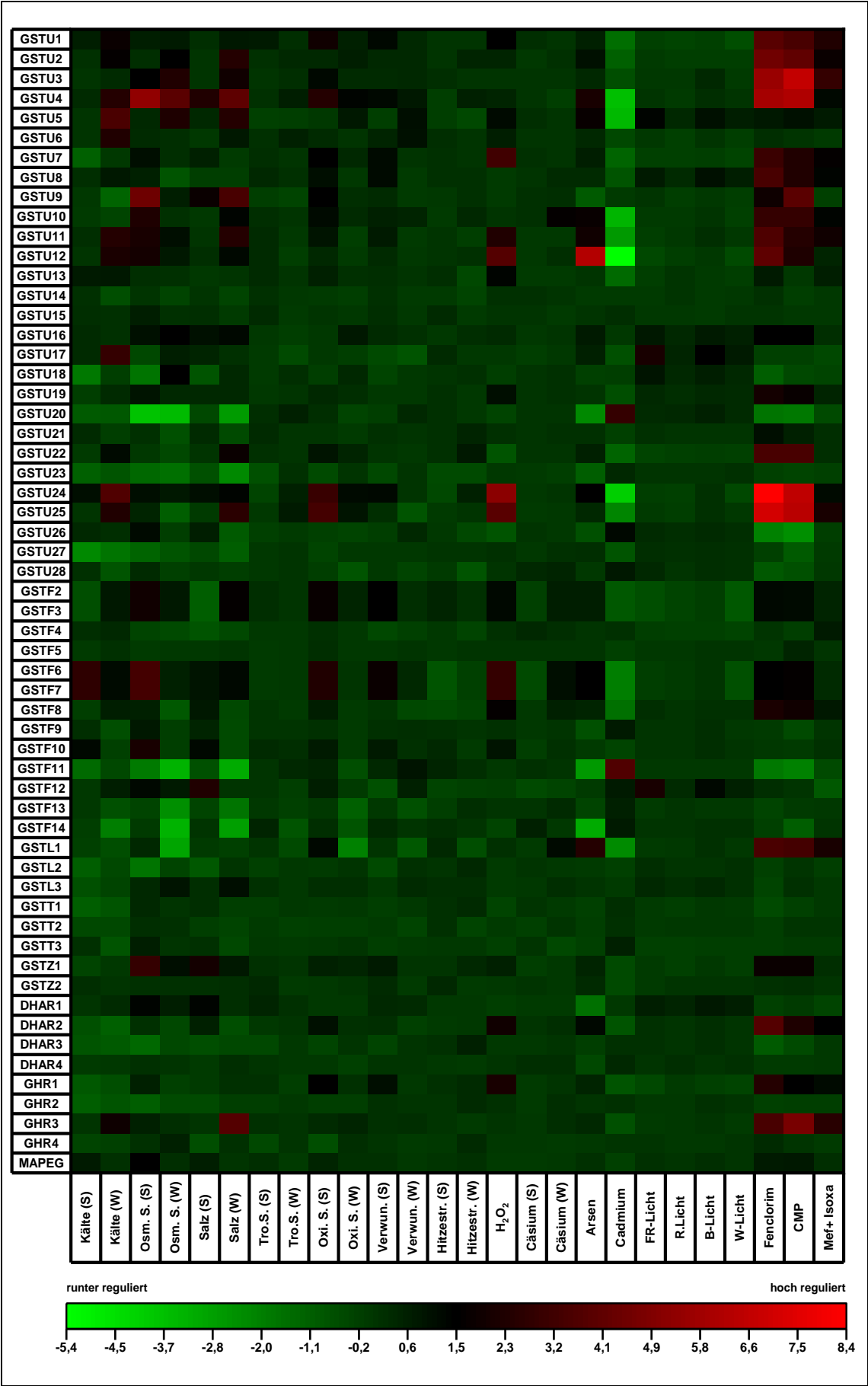
**Abbildung 1-7: Regulierung der GST-Expression durch exogen applizierte Phytohormone**

Die Expression der AtGST-Gene wird teilweise durch Phytohormone reguliert. Dargestellt ist die Regulation der AtGSTs durch unterschiedliche Phytohormone die exogen appliziert wurden, aus der Datenbank GENEVESTIGATOR®. Die Bestimmung der Expressionsregulation durch die Phytohormone erfolgte 3 h nach Applikation. Getestet wurden die Phytohormone Abscisinsäure (ABA, 10  $\mu$ M), Gibberelinsäure (GA3, 1  $\mu$ M), das Auxin Indol-3-essigsäure (IAA, 1  $\mu$ M), Methyljasmonat (MeJA, 10  $\mu$ M), Zeatin (1  $\mu$ M), Salizylsäure (SA, 10  $\mu$ M), Aminocyclopropan-carbonsäure (ACC, 10  $\mu$ M) und Brassinolid (BS, 10  $\mu$ M) im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (Genevestigator ID AT-00110). Die Regulation ist in  $\log_2$  dargestellt.

---

Neben der exogenen Gabe von Hormonen führen weitere abiotische Faktoren zur Expression der GSTs. So zeigten Nianiou-Obeidat und Kollegen, dass die Expression des AtGSTF7 Gene durch die Applikation von Schwermetallen induziert wird. Sowohl Hitze- als auch Kälte-Stress führen wiederum zur Repression des AtGSTF7-Genes (Nianiou-Obeidat et al. 2017).

Auch unterschiedliche Lichtverhältnisse können die Expression der GSTs beeinflussen (Gallé et al. 2018). Dabei ist die Expression nicht nur abhängig von der Intensität des Lichts, sondern auch von der Qualität. Beispielsweise induziert UV-B Licht die Expression einiger GSTUs. Im Gegensatz dazu wird die Expression der Gene, die für das GSTF3-, GSTF6- und GSTF11-Protein kodieren, durch Dunkelrot und hellrotes Licht sowie Weißlicht und UV-B Bestrahlung reprimiert (Gallé et al. 2018). In Abbildung 1-8 ist die Regulation der einzelnen GSTs durch solche abiotischen Faktoren dargestellt.

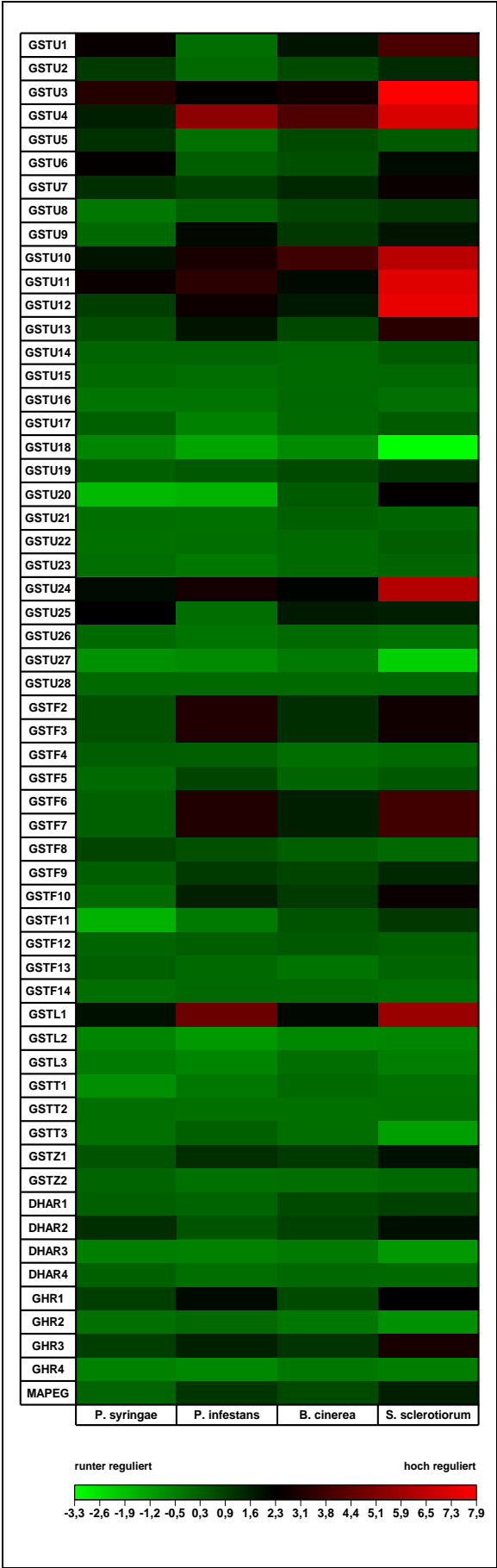


**Abbildung 1-8: Abiotische Faktoren und Regulation der GST-Expression**

Unterschiedliche abiotische Faktoren können die Genexpression der AtGSTs beeinflussen. Die dargestellten Daten wurden aus der GENEVESTIGATOR®-Datenbank entnommen. Gezeigt wird die Regulation der einzelnen GSTs im Vergleich zur Kontrolle durch unterschiedliche abiotische Stressfaktoren in Abhängigkeit vom Gewebe (S: Spross und W: Wurzel; Genevestigator ID AT-00120). Zudem wird die Expressionsregulation durch unterschiedliche abiotische Substanzen gezeigt. Dabei erfolgte die Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit einer Konzentration von 20 mM für 1 h (Genevestigator ID AT-00185), mit Arsen mit einer Konzentration von 100 µM für 1.5 und 3 h (Genevestigator ID AT-00538), mit Fenclorim oder CMP bei einer Konzentration von 100 µM für 4 h (Genevestigator ID AT-00459) und mit Mefenpyr und Isoxadifen für 6 h (Genevestigator ID AT-00581). Die Behandlung mit unterschiedlichem Licht erfolgte für 4 h mit einer Intensität von 10 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (Genevestigator ID AT-00109). Die Regulation der Genexpression ist in log<sub>2</sub> dargestellt.

Exogen applizierte Salicylsäure und Jasmonate, beides Phytohormone, die in der Pathogenantwort aber auch bei der Genexpression unter abiotischen Stress eine Rolle spielen, können einige GST-Gene regulieren. Infektionen mit Pathogenen führen zu ähnlichen Regulationen der GST-Expression. Die Infektion von *A. thaliana* mit dem Pilz *B. cinerea* führt zu einer Akkumulation der AtGSTF2, F3, F6 und F7 (Mulema 2011; Gullner et al. 2018). Weitere Studien legen nahe, dass auch die Infektion mit anderen Phytopathogenen zu einer GST-Expression führt. So wird die Gen-Expression der AtGSTU1, U3, U4, U10, U11 und U12 sowie F3, F4, F7 und L1 in *A. thaliana* nach einer Infektion mit *Alternaria brassicicola* induziert (Vos et al. 2005). Ferner konnte gezeigt werden, dass bakterielle Infektionen ebenfalls die GST-Expression moduliert. Die AtGSTU3, U10 und U11 sowie die GSTL1 werden gleichfalls nach einer Infektion mit *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in *A. thaliana* induziert (Vos et al. 2005).

Die Expression der GSTs wird aber nicht nur durch Pathogene verändert. Kao und Kollegen konnten in *Brassica campestris* zeigen, dass der wurzelkolonisierende Pilz *Piriformospora indica* die Expression eines BcGSTU-Genes induziert. Phylogenetisch ist diese BcGSTU mit der AtGSTU24 und AtGSTU25 strukturell verwandt. Die Überexpression der BcGST in *A. thaliana* führt zu einer erhöhten Resistenz gegenüber *Alternaria brassicae* (Kao et al. 2016). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Inokulation von *A. thaliana* mit *P. indica* zu einer erhöhten Expression der AtGSTU19 und AtGSTU20 führt (Peskant-Berghofer et al. 2004). In Abbildung 1-9 ist die unterschiedliche Regulation der AtGSTs durch die Infektion mit unterschiedlichen Phytopathogenen dargestellt.



**Abbildung 1-9: Regulation der GST-Expression durch biotische Faktoren**

Durch den Befall mit Pathogenen werden einzelne die AtGSTs reguliert. Die Daten wurden der Datenbank GENEVESTIGATOR® entnommen. Dargestellt ist die  $\log_2$ -Regulation der AtGSTs durch die Infektion unterschiedlicher Pathogene wie *Sclerotinia sclerotiorum* für 2 d (Genevestigator ID AT-00681), *Botrytis cinerea* für 18 h (Genevestigator ID AT-00147), *Phytophthora infestans* für 6 h (Genevestigator ID AT-00108) bzw. *Pseudomonas syringae* (tomato DC avrRpm1) für 6 h (Genevestigator ID AT-00106). Dargestellt ist wie in Abbildung 1-8 die Regulation der Genexpression in  $\log_2$  dargestellt.

---

Neben der unterschiedlichen Expression der GSTs durch unterschiedliche biotische und abiotische Faktoren, gibt es auch eine Spezies-abhängige Expression der verschiedenen GSTs. Beispielsweise werden die GSTFs in Mais stark exprimiert, während in Sojabohnen die GSTUs dominieren (Dixon et al. 2003). Diese führt wahrscheinlich zu unterschiedlichen Resistenzen gegenüber natürlichen und anthropogenen Substanzen, weshalb für unterschiedliche Nutzpflanzen verschiedene Herbizide verwendet werden (Dixon et al. 2003).

Von den 55 AtGSTs sind 54 als lösliche beziehungsweise cytosolische Proteine beschrieben. Neben der MAPEG ist auch die TCHQD in *A. thaliana* mit der Membran assoziiert, während die bakterielle TCHQD als lösliches Protein vorliegt (Dixon et al. 2009). Es wurden sieben GSTs identifiziert, die in den Chloroplasten exprimiert sind. Bei diesen handelte es sich um die AtGSTF2, F8, F9 F10, U19, L2 und die DHAR3 (Zybailov et al. 2008; Dixon et al. 2009). Für die AtGSTF8 konnten zwei Isoformen identifiziert werden. Eine dieser Isoformen trägt ein Lokalisierungssignal für den Import in den Chloroplasten. Jedoch konnte experimentell kein Nachweis für die Expression dieser Form *in vivo* gefunden werden (Dixon et al. 2009). Des Weiteren lokalisieren die AtGSTF5 und AtGSTF6 in den Mitochondrien (Heazlewood et al. 2004) und die AtGSTF2, F6, F7, F9 und F10 sowie die MAPEG lokalisieren in den Vakuolen (Carter 2004). Tabelle 1-1 gibt einen Klassen-spezifischen Überblick über die zelluläre Lokalisation der Proteine.



**Tabelle 1-1: Zelluläre Lokalisation der GST-Klassen**

Aufgeführt sind die in Arabidopsis vorkommenden GST-Klassen, die Anzahl der Gene die für die einzelnen Gen-Klassen kodieren und die subzelluläre Lokalisation der GST-Proteine (Dixon et al. 2010; Lallement et al. 2015).

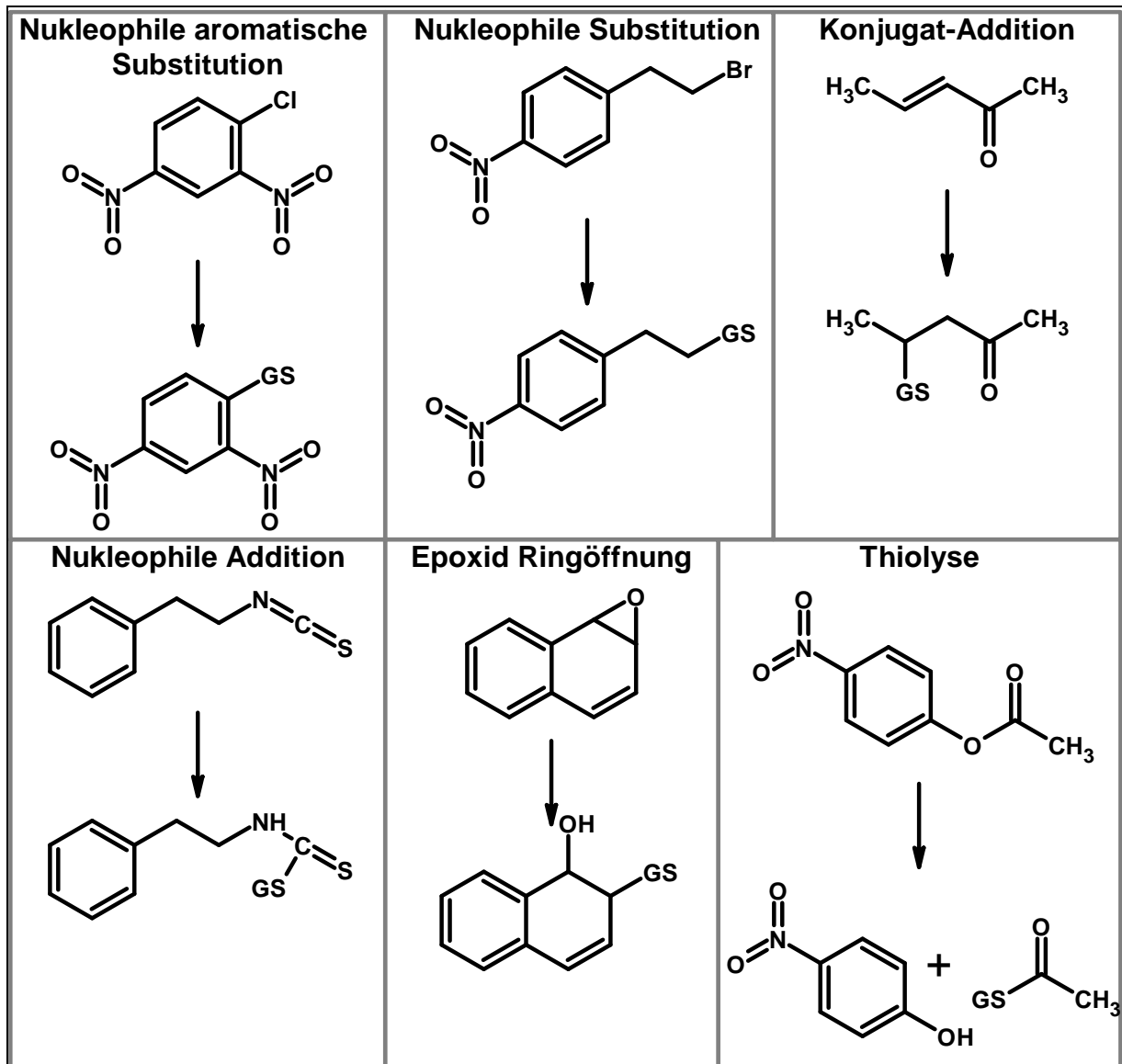
GST-Klasse	Anzahl an Genen	Zelluläre Lokalisation
GSTF	13	Cytosol und evtl. Chloroplast
GSTU	28	Cytosol und evtl. Nukleus
GSTT	3	Peroxisome und evtl. Nukleus
GSTZ	2	Cytosol
GSTL	3	Cytosol, Chloroplast und evtl. Peroxisom
GHR	4	Plastiden
DHAR	4	Cytosol, Chloroplast und evtl. Peroxisome
TCHQD	1	Plasmamembran
MAPEG	1	Membran assoziiert, Vakuole

### 1.2.5 Katalytische Funktionen

GSTs katalysieren unterschiedliche GSH-abhängige Reaktionen. Sie können als Transferasen, Peroxidasen, Reduktasen oder auch Isomerasen agieren (Edwards 2000; Wagner et al. 2002; Krajewski et al. 2013). Dabei verbrauchen Transferasen das Tripeptid Glutathion (Abbildung 1-10), während Isomerasen keinen Netto-Verbrauch desselben aufweisen. (Ausführung der Abbildung)

GSTs mit Reduktase- und Peroxidase-Funktion oxidieren Glutathion. Das oxidierte Glutathion wird durch die Glutathion-Reduktasen NADPH-abhängig recycelt (Akihiro Kubo et al. 1993; Kataya und Reumann 2010; Marty et al. 2019). Die am besten beschriebene Funktion *in planta* ist die Glutathion-Transferase-Aktivität gegenüber Xenobiotika. Die Detoxifizierung elektrophiler Herbizide ist dabei die am genauesten untersuchte Transferase-Aktivität (Edwards 2000; Wagner et al. 2002; Krajewski et al. 2013). Eine entscheidende Rolle nehmen dabei die pflanzenspezifischen GSTs der Tau-Klasse ein, da diese maßgeblich an der Detoxifizierung von Xenobiotika beteiligt sind (Krajewski et al. 2013). Diese Detoxifizierungsprozesse können *in planta* zur Ausbildung von Herbizid-Toleranzen führen (Wagner et al. 2002). Die durch Konjugation entstehenden S-glutathionylierten Metaboliten werden in der Regel anschließend mittels ABC-Transporter in die Vakuole transportiert, wo diese weiter abgebaut und gelagert werden (Marrs 1996; Edwards 2000; Krajewski et al. 2013). Des Weiteren sind auch Transporte von GSH-Metabolite in den Apoplasten beschrieben (Marrs 1996). Neben Herbiziden werden ebenfalls Phytotoxine von konkurrierenden Pflanzen oder invasiven, mikrobiellen Pathogenen mittels GSTs detoxifiziert (Edwards 2000). Aber nicht nur Xenobiotika werden mittels GSTs mit Glutathion konjugiert. GSTs sind auch bei der Biosynthese schwefelhaltiger Sekundärmetabolite

involviert. Dabei können GSTs entweder direkt Biosyntheseschritte katalysieren oder phytotoxische Intermediate, die akkumulieren können, detoxifizieren (Marrs 1996; Piślewska-Bednarek et al. 2018). Diese Prozesse sind jedoch für die pflanzenspezifische Tau- und Phi-Klasse bisher unvollständig untersucht (Wagner et al. 2002; Dixon et al. 2011; Piślewska-Bednarek et al. 2018).

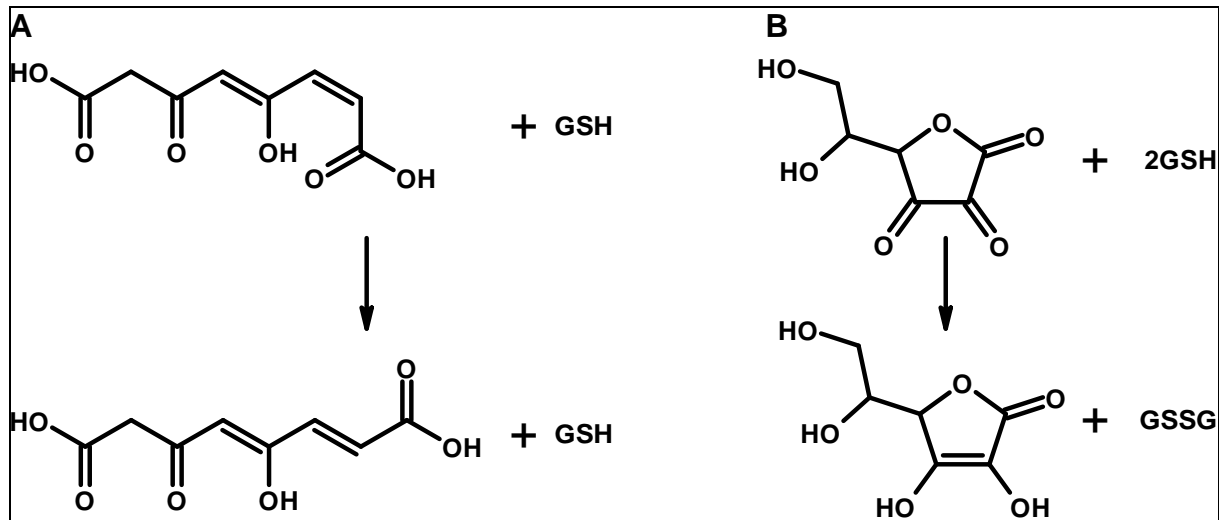


**Abbildung 1-10: GST katalysierte Reaktion unter Verbrauch von Glutathion**

GSTs katalysieren unterschiedliche Konjugationsreaktionen. Dabei wird Glutathion an das Substrat konjugiert (GS). Gezeigt sind die unterschiedlichen beschriebenen Konjugationsreaktionen (Mashiyama et al. 2014).

Dem gegenüber ist die endogene Funktion der Zeta-Klasse *in planta* bekannt. Die GSTZs fungieren als Isomerasen. Die GSTZ1 katalysiert Glutathion-abhängig die Isomerisation von Maleylacetoacetat zu Fumarylacetoacetat (Abbildung 1-11 A; Wagner et al. 2002). Dies ist einer der Schlüsselschritte des Tyrosin-Katabolismus (Wagner et al. 2002; Dixon et al. 2009). Auch die endogene Funktion der DHAR-Klasse ist gut beschrieben. Diese Klasse katalysiert die Reduktion von Ascorbinsäure unter Oxydation von Glutathion (Abbildung 1-11 B; Dixon et al. 2009). Zudem besitzen die Proteine der DHAR-Klasse

sowie die der Lambda-Klasse ein Cystein im katalytischen Zentrum, im Gegensatz zu dem sonst vorkommenden Serin oder Tyrosin. Diese Cystein-haltigen GSTs konjugieren keine Substrate mit Glutathion, jedoch konnte gezeigt werden, dass sie eine Deglutathionylierung katalysieren können (Lallement et al. 2014).



**Abbildung 1-11: GST Isomerase- und Reduktase-Funktion**

**A)** Die Isomerisation von Maleylacetoacetat wird durch GSTs ohne Verbrauch von Glutathion katalysiert (Dixon und Edwards 2009; Mashiyama et al. 2014).

**B)** Bei der Reduktion von Dehydroascorbat zu Ascorbat wird Glutathion zum Disulfid oxidiert (Mashiyama et al. 2014).

### 1.2.6 Nicht-katalytische Funktionen

Neben der biosynthetischen Konjugation von endogenen Substraten konnte gezeigt werden, dass GSTs kleine endogene, heterocyclische Liganden binden und transportieren oder auch Signalwege beeinflussen können (Dixon et al. 2011; Ahmad et al. 2017b). Bindungsstudien belegten für AtGSTF2 eine Interaktion mit Indol-Hormonen, Phytoalexinen und Flavonoiden (Dixon et al. 2011). Es wird angenommen, dass GSTs als Carrier-Protein für die Flavonoide dienen und im Speziellen Anthocyane in die Vakuole transportieren. Beispielsweise bindet die AtGSTF2 die Flavonoide Quercetin, Quercetrin und Kaempferol (Dixon et al. 2011). Auch die AtGSTF12 ist an der Akkumulation von Anthocyanen beteiligt. Sie bindet die Anthocyane Cyanidin und Cyanidin-3-O-Glykosid ohne diese mit Glutathion zu konjugieren (Dixon und Edwards 2018).

Die Bindung der Liganden ist unabhängig von der katalytischen Funktion der GSTs, da die Liganden weder an der H-Site noch der G-Site binden (Ahmad et al. 2017b). Stattdessen erfolgt die Bindung an zwei sogenannten L-Sites. Es konnte gezeigt werden, dass das AtGSTF2-Homodimer zwei L1-Site und eine L2-Site besitzt (Ahmad et al. 2017b). Des Weiteren bindet nicht jeder Ligand an beide L-Sites. Beispielsweise bindet Camalexin an die beiden L1-Sites der AtGSTF2. Quercetrin bindet sowohl an die

beiden L1-Sites als auch die L2-Site der AtGSTF2, während Quercetin nur an die L2-Site bindet (Ahmad et al. 2017b).

Neben diesen Transportmechanismen können GSTs durch ihre Bindekapazität reaktive Substanzen abfangen und diese stabilisieren. So konnte gezeigt werden, dass die ZmGSTU1 und ZmGSTU2 Porphyrinogen, das aus dem Chloroplasten in das Zytosol ausströmt, binden kann (Nianiou-Obeidat et al. 2017; Dixon und Edwards 2018). Diese Bindung geht eventuell einher mit einer Konjugation. Porphyrinogen tritt unter Stressbedingungen, der Seneszenz oder durch Herbizide induziert aus den Chloroplasten in das Zytosol aus. Dort generiert Porphyrinogen unter Lichteinfluss verschiedene reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Die Diphenylether-Herbizide sind Herbizide, die zu einem Ausstrom von Porphyrinogen aus den Chloroplasten ins Zytosol führen und auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

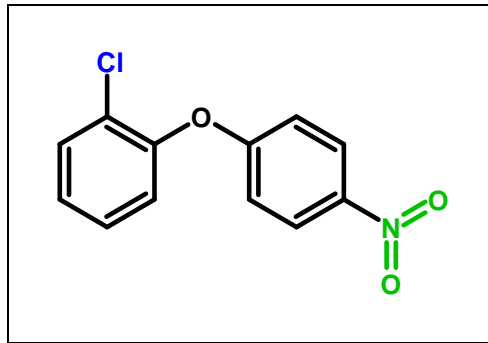
### 1.3 Diphenylether-Herbizide

In der Agrarwirtschaft werden seit den 70er Jahren zur Ertragssteigerung immer mehr Pflanzenschutzmittel verwendet. Zu diesen zählen Herbizide, Fungizide und Insektizide (Seite 5). Herbizide können als Totalherbizide oder als selektive Herbizide eingesetzt werden. Mit Totalherbizide wird vor dem Ausbringen des Saatgutes der konkurrierende Beiwuchs auf Agrarflächen vernichtet. Selektive Herbizide können dagegen nur bestimmten Beiwuchs vernichten, während die entsprechende Agrarpflanze eine Resistenz gegenüber diesem aufweist (Rendina et al. 1990).

Die Resistenz gegenüber selektiven Herbiziden von Agrarpflanzen lässt sich darauf zurückführen, dass diese Pflanzen in den meisten Fällen sogenannte schnelle Metabolisierer der Herbizide sind. Die meisten Nutzpflanzen metabolisieren Herbizide zweiphasig (Dixon et al. 2003). Mittels Phase I Entgiftungsenzymen werden die Herbizide durch oxidative oder hydrolytische Reaktionen aktiviert. Anschließend erfolgt die Konjugation des Produktes an Zucker- oder Peptid-Moleküle, wie beispielsweise Glutathion, an der aktivierten Stelle mittels Phase II Enzymen. Die Aktivierung der Xenobiotika durch die Phase I Enzyme führt zu einer schnelleren Konjugation als dies der Fall ohne Aktivierung ist. Viele Beiwuchspflanzen sind im Gegensatz zu den Nutzpflanzen langsame Metabolisierer und konjugieren Herbizide direkt und ausschließlich mittels Phase II Enzymen ohne eine vorherige Aktivierung durch Phase I Enzyme (Dixon et al. 2003).

Mit der Aufklärung der Wirkprinzipien der unterschiedlichen Herbizide sowie deren Detoxifizierung und der daraus resultierenden Resistenz einiger Spezies kann der effektive Einsatz der Herbizide erhöht werden. Es gibt unterschiedliche Klassen von Herbiziden, die einerseits auf Grundlage ihrer chemischen Struktur, andererseits auf der Basis ihrer Wirkung eingeordnet werden (Duke und Dayan 2011). Häufig besteht eine Struktur-Wirkungsbeziehung, sodass Herbizide einer Strukturklasse die gleiche Wirkung auf Pflanzen haben (Dayan et al. 2000; Duke und Dayan 2011).

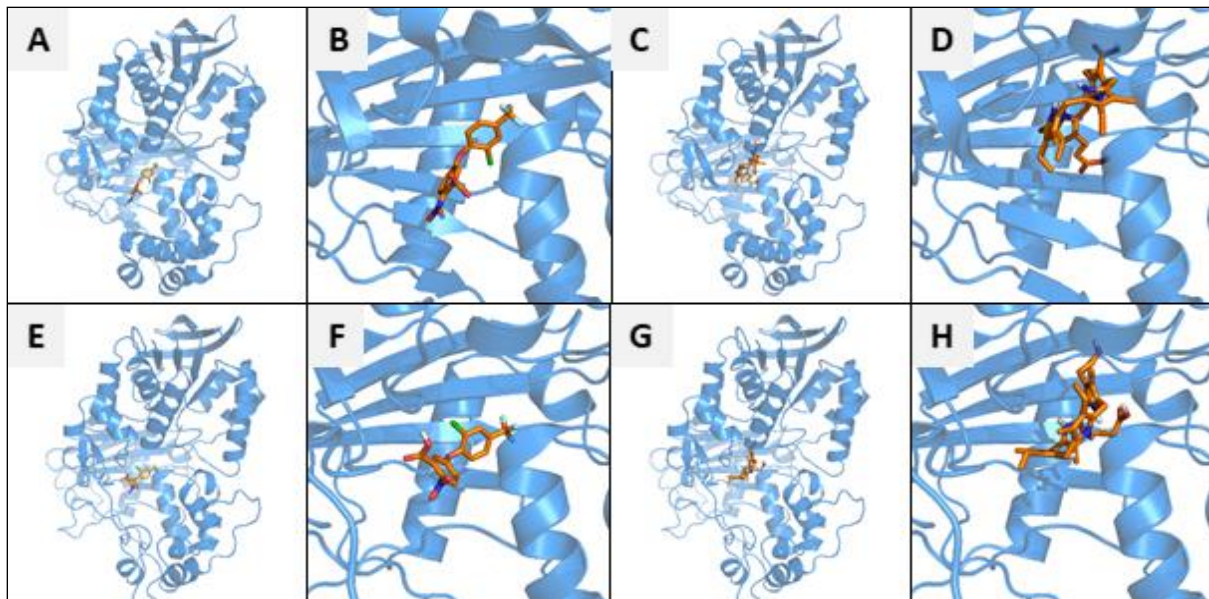
Diphenylether-Herbizide bestehen, wie der Name sagt, in ihrer Grundstruktur aus zwei Phenylringen die über eine Etherbrücke mit einander verbunden sind. Desweiteren ist in den meisten Fällen der erste Ring an Position 2 mit einer Chloro- oder Nitrogruppe substituiert (Roberts et al. 2007; Dixon et al. 2003). Am zweiten Ring tragen alle Diphenylether-Herbizide eine 4-Nitrogruppe (Abbildung 1-12; Roberts et al. 2007; Dixon et al. 2003).



**Abbildung 1-12: Grundstruktur der Diphenylether-Herbizide**

Die beiden veretherten Phenylringe bilden die primäre Grundstruktur. Am ersten Ring ist eine Chloro- oder Nitrogruppe, hier repräsentativ als Chlorogruppe dargestellt (blau), gebunden. Der zweite Ring trägt eine Nitrogruppe (grün) an Position C4.

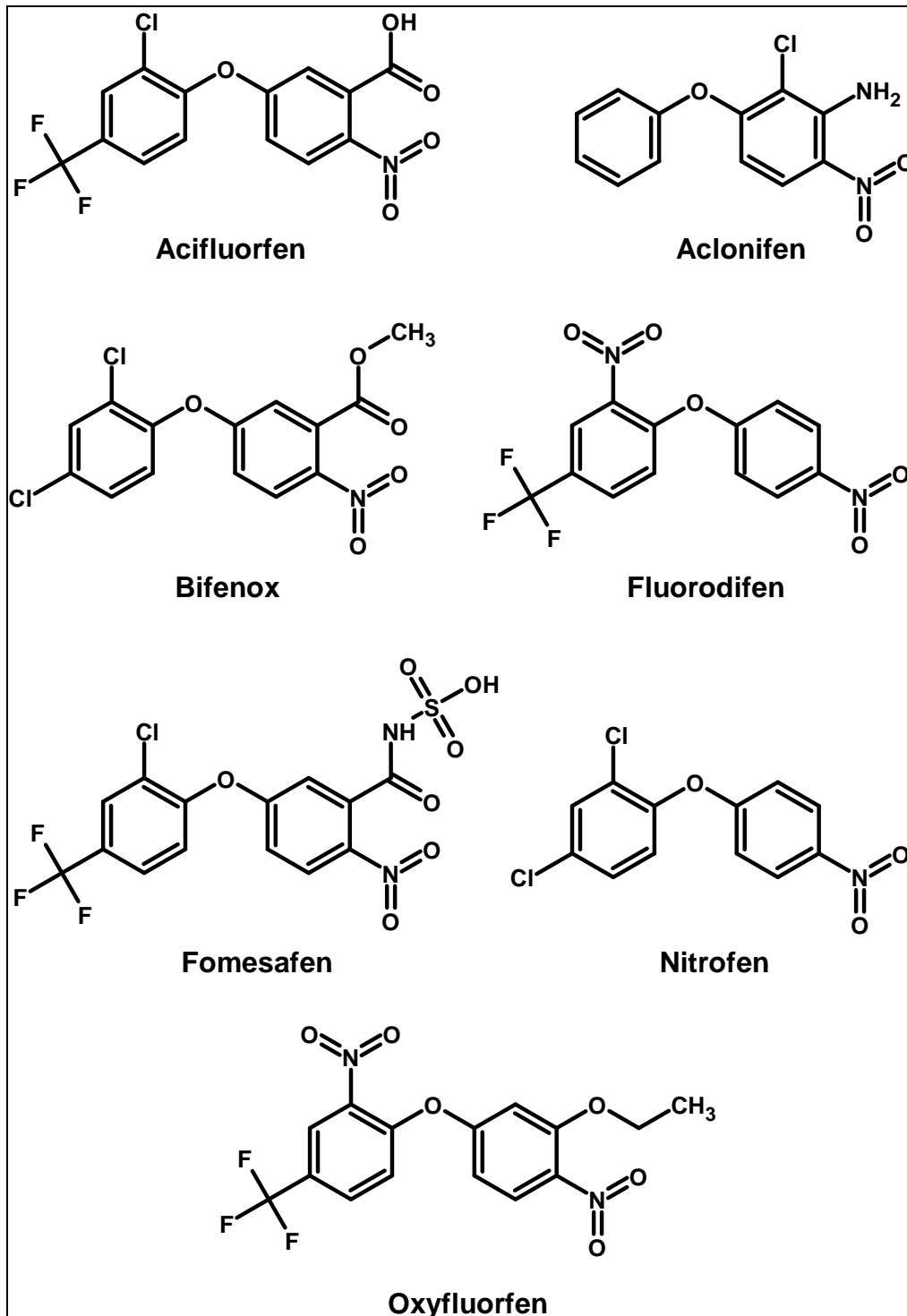
Die Diphenylether-Herbizide, mit Ausnahme von Aclonifen, wirken als Inhibitoren der Protoporphyrinogen-Oxidase (PPO) und werden durch das *Herbicide Resistance Action Committee* (HRAC) als Gruppe E Herbizide klassifiziert (Roberts et al. 2007; Kahlau et al. 2020). Neben den Diphenylether-Herbiziden gibt es weitere Substanzklassen, die als Gruppe E Herbizide klassifiziert sind. Allen gemein ist, dass sie aus zwei heterozyklischen oder zyklischen Ringsystemen bestehen. Diese beiden Ringe binden in die promiskuitive Bindetasche der PPO (Abbildung 1-13 **A, B, E** und **F**; Matringe et al. 1989b; Sherman et al. 1991; Armbruster et al. 1993). Nativ bindet in diese zwei Ringe des Protoporphyrinogen IX (Abbildung 1-13 **C, D, G** und **H**; Dayan et al. 1997; Duke und Dayan 2011; Mashiyama et al. 2014). Durch die kompetitive Bindung der Herbizide wird somit verhindert, dass Protoporphyrinogen IX zu Protoporphyrin IX werden kann. Es kommt zu einer Akkumulation des Substrates der PPO, Protoporphyrinogen IX (Jacobs et al. 1991; Lee et al. 1993). Dieses strömt aus dem Chloroplasten in das Zytosol aus. Hier oxidiert Protoporphyrinogen IX spontan zu Protoporphyrin IX. Eventuell sind hierbei auch nicht weiter bekannte Peroxidasen beteiligt (Liu et al. 2022). Durch die Absorption von Licht wird Protoporphyrin IX in einen Triplett-Zustand versetzt und interagiert mit Sauerstoff. Durch diese Interaktion wird der Sauerstoff aus dem Grundzustand in den Singulett-Sauerstoff-Zustand überführt. Sowohl das Triplett-Protoporphin IX als auch der Singulett-Sauerstoff nehmen Wasserstoff von ungesättigten Lipiden auf. Dies führt zur Bildung von Lipid-Radikalen, die wiederum in einer Kettenreaktion Lipid-Peroxide bilden. Schlussendlich werden die Lipide und Protein der Plasmamembran oxidiert, was zur Schädigung von Membranen führt. Durch die Schädigung der Thylakoidmembran kommt es zum Ausstrom von Chlorophyll und Carotinoiden aus den Chloroplasten in das Zytosol. Wird die Zellmembran zerstört, führt dies zu Zell-Nekrosen und somit zur Schädigung des Gewebes (Roberts et al. 2007; Mashiyama et al. 2014).



**Abbildung 1-13: Liganden-Bindung in die Protoporphyrinogen IX Oxidase**

Das Herbizid Acifluorfen bindet sowohl in die Protoporphyrinogen IX Oxidase aus *Myxococcus xanthus* (A und B; 2IVD) als auch in die Protoporphyrinogen IX Oxidase aus *Arabidopsis thaliana* (E und F; Mit Phyre2 simulierte Proteinstruktur (Kelley et al. 2015) und mit AutoDock Vina (Trott und Olson 2010)). Dabei handelt es sich in beiden Fällen um die native Bindetasche für Protoporphyrinogen (C und D: MxPPO, 2IVE, mit AutoDock simulierter Bindung von Protoporphyrinogen IX; G und H: Mit Phyre2 simulierter AtPPO1, At4g01690, die Bindung von Protoporphyrinogen IX ist mit AutoDock Vina simuliert). Während in A, C, E und G das gesamte Protein mit den gebundenen Liganden gezeigt wird, zeigen B, D, F und H eine Vergrößerung der korrespondierenden Bindetasche.

Der molekulare Wirkmechanismus von Aclonifen unterscheidet sich von dem der anderen Diphenylether-Herbizide. Dieser Wirkmechanismus war jedoch lange Zeit unklar. Neuere Studien zeigen, dass das molekulare Target von Aclonifen die Solanesyldiphosphatsynthase (SPS) ist (Kahlau et al. 2020). In *A. thaliana* gibt es drei Isoformen der SPS. Die AtSPS1 und die AtSPS2 konnten beide als Target-Proteine von Aclonifen identifiziert werden, während Aclonifen keine Wirkung auf die AtSPS3 *in vitro* zeigte (Kahlau et al. 2020). Beide Enzyme, AtSPS1 und AtSPS2, sind Teil des Biosyntheseweges von Plastochinon-9.



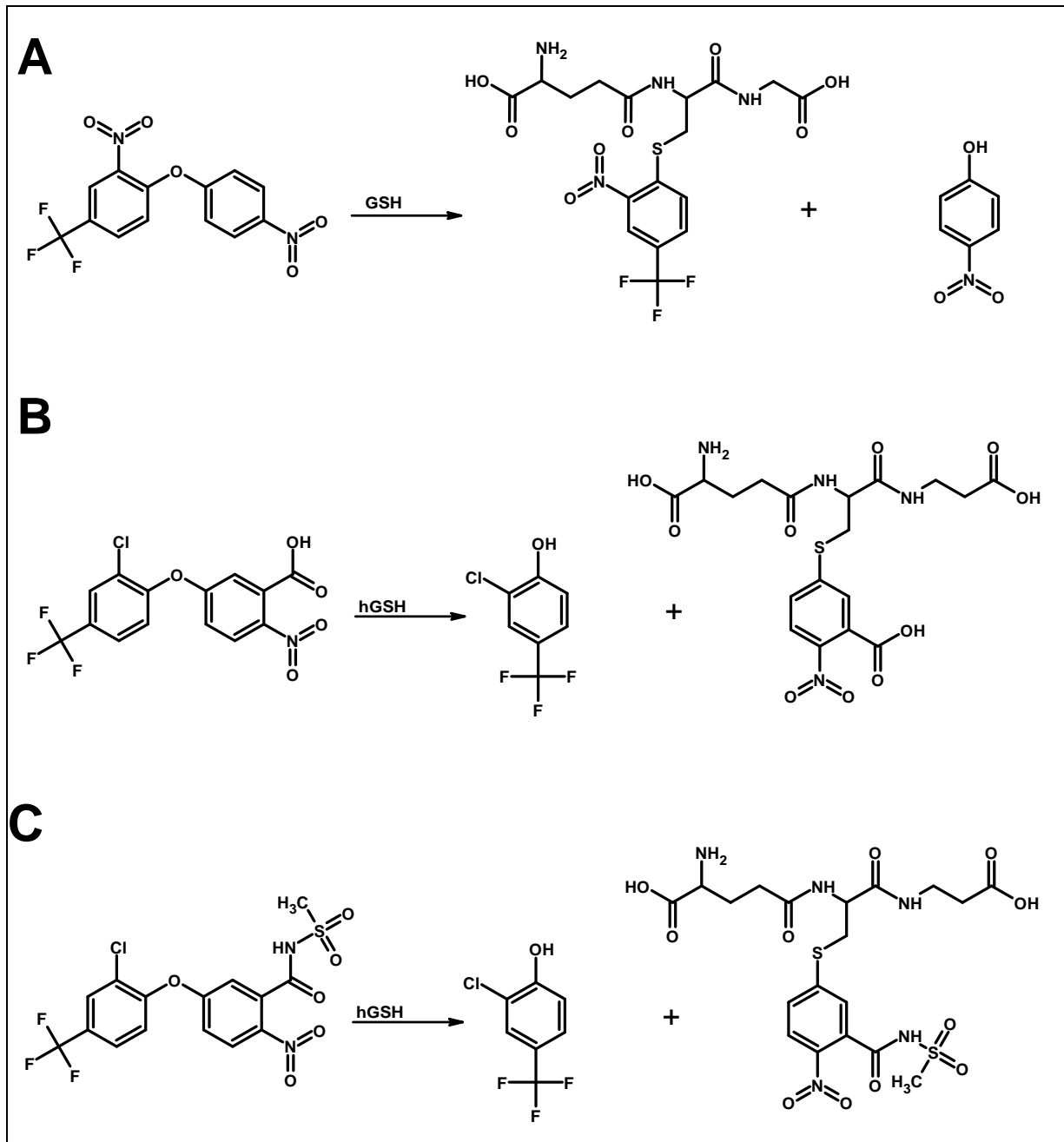
**Abbildung 1-14: Diphenylether-Herbizide**

Dargestellt sind die sieben Diphenylether **A) Acifluorfen**, **B) Aclonifen**, **C) Bifenox**, **D) Fluorodifen**, **E) Fomesafen**, **F) Nitrofen** und **G) Oxyfluorfen**. Allen gemein ist die Grundstruktur bestehend aus den Diphenylethern mit einer Nitrogruppe.

Die Diphenylether-Herbizide werden *in planta* durch die Spaltung der Etherbindung durch Glutathion oder Homoglutathion detoxifiziert (Skipsey et al. 1997; Andrews et al. 1997). Somit handelt es sich um eine thiolytische Glutathion-Konjugation. Dabei entsteht, je nach Pflanzen-Spezies, ein Phenyl-Glutathion- oder Phenyl-Homoglutathion-Konjugat sowie ein Phenyl-Derivat (Abbildung 1-15). Die



thiolytische Konjugation konnte in Sojabohnen für Acifluorfen gezeigt werden (Andrews et al. 1997). Das Phenyl-Derivat kann mit Zucker oder Zucker-Derivaten mittels weiterer Phase II Enzymen konjugiert werden.



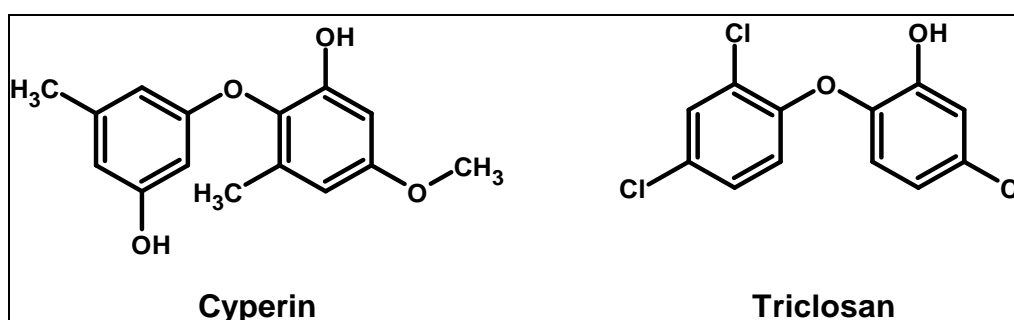
**Abbildung 1-15: Detoxifizierung von Diphenylether-Herbiziden als Glutathion-Derivate**

Diphenylether werden in planta durch Konjugation mit Glutathion-Derivaten entgiftet unter Bildung eines Phenyl-Glutathion-Derivates und eines Phenyl-Derivates. **A)** In vitro wird Fluorodifen mit Glutathion durch Tau-GSTs konjugiert und es entsteht Nitrophenol und das Phenyl-Glutathion-Konjugat (Dixon et al. 2003). **B)** In Sojabohne wird Acifluorfen mit Homoglutathion konjugiert und bildet sich das 2-Chloro-4-(Trifluoromethyl)phenol und das entsprechende Phenyl-Homoglutathion-Konjugat (Andrews et al. 1997; Dixon et al. 2003) **C)** Wie für Acifluorfen konnte auch für Fomesafen auch in Sojabohnen gezeigt werden, dass Fomesafen mit Homoglutathion konjugiert wird. Es bildet sich ebenfalls 2-Chloro-4-(Trifluoromethyl)phenol und das entsprechende Phenyl-Homoglutathion-Konjugat (Andrews et al. 1997; Dixon et al. 2003).

## 1.4 Natürliche Diphenylether

Anthropogene Herbizide dürfen in der ökologischen Landwirtschaft nicht angewendet werden. Hinzu kommt, dass Pflanzen vermehrt Resistenzen gegenüber kommerziellen Herbiziden entwickeln (Dayan und Duke 2014). Deshalb werden neue Wirkmechanismen für Herbizide benötigt (Dayan und Duke 2014). Natürliche Herbizide aus Pilzen oder allelopathischen Pflanzen könnten neue Wege zeigen. Es konnte gezeigt werden, dass natürliche Phytotoxine deutlich mehr molekulare Wirkmechanismen aufweisen, als dies für die bekannten Herbizide zutrifft (Dayan und Duke 2014). Einige natürliche Toxine sind zudem für autotrophe Organismen wie Cyanobakterien und Pflanzen hoch spezifisch, wie beispielsweise die 7-Deoxy-Sedoheptulose (Brilisauer et al. 2019).

Das natürliche Diphenylether-Derivat Cyperin wurde aus den drei Pilzspezies *Preussia fleischhakkii*, *Ascochyta cypericola* und *Phoma sorghina* isoliert (Venkatasubbaiah et al. 1992; Dayan et al. 2008). Bei den beiden letztgenannten Pilzspezies handelt es sich um Phytopathogene, die eine Blattfäule verursachen. Cyperin zeigt eine Dosis-abhängige Inhibierung des Wurzelwachstums von *A. thaliana* Keimlingen (Dayan et al. 2008). Dieser Effekt ist, anders als bei PPO-Inhibitoren, nicht Licht-abhängig. Die phytotoxische Wirkung ist auf die Inhibierung der Enoyl-ACP-Reduktase (ENR) zurückzuführen (Dayan et al. 2008). Diese molekulare Wirkung ist von dem antimikrobiellen Diphenylether Triclosan bekannt. Beide Diphenylether, Cyperin und Triclosan, besitzen an einem der beiden Ringe eine *o*-Hydroxy-Gruppe (Abbildung 1-16), die mit einem Tyrosin der katalytischen Bindetasche der ENR eine Wasserstoffbrücke ausbildet. Zudem bildet der Nikotinamind-Ring des Co-Substrat NAD<sup>+</sup> der ENR eine  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung mit einem der beiden Phenylringe aus. Dies stabilisiert die Bindung der Diphenylether in der katalytischen Tasche des Enzyms und führt zur kompetitiven Inhibierung der Enzymaktivität (Dayan et al. 2008).



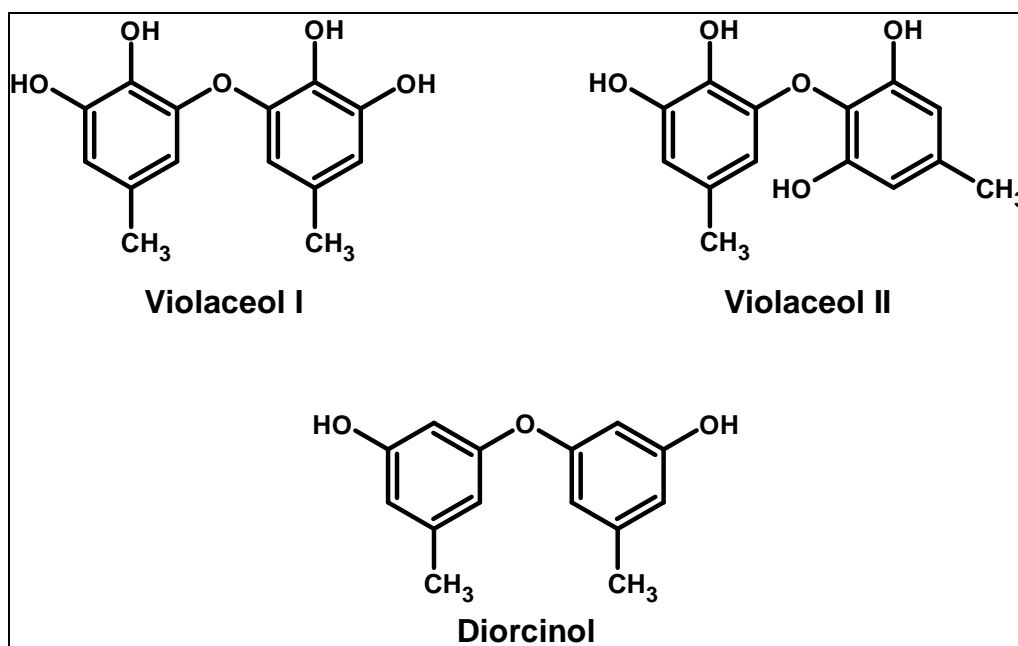
**Abbildung 1-16: Strukturvergleich von Cyperin mit Triclosan**

Der aus Pilzen stammende, phytotoxische Diphenylether Cyperin, links, ist im Vergleich mit dem antimikrobiellen Diphenylether Triclosan, rechts, dargestellt (Dayan et al. 2000).

Die ENR ist an der Biosynthese von Fettsäuren beteiligt, die für den Aufbau der Membranen essentiell sind. Durch die Inhibierung der ENR durch Triclosan kommt es zu einer Destabilisierung der Membranintegrität (Dayan et al. 2008), was zur Nekrose der Zellen führt und zum Ausstrom von

Protoporphyrinogen IX aus den Chloroplasten. Dies hat sekundär einen ähnlichen Licht-abhängigen Effekt wie die Diphenylether-Herbizide. Die physiologische Wirkung von Cyperin auf Pflanzen ähnelt der Blattfäule, die die entsprechenden Phytopathogene hervorrufen. Zwischen der Bildung von Cyperin und der Pathogenität der Phytopathogene besteht ein Zusammenhang (Dayan et al. 2008).

Aus anderen Pilz-Arten wurden weitere Diphenylether isoliert. In einigen Fällen leben diese Pilze mit Pflanzen oder auch mit Flechten assoziiert. Strukturell sind Violaceol I und Violaceol II dem Cyperin ähnlich (Abbildung 1-17). Beide wurden, neben weiteren Diphenylethern, aus *Aspergillus versicolor* (Li et al. 2015), *Aspergillus sydowii* (Liu et al. 2013), *Penicillium versicolor* (Yang et al. 2010) und dem Endophyten *Trichoderma polyalthiae* (Nuankeaw et al. 2020) isoliert. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Violaceol I als auch Violaceol II, extrahiert aus *T. polyalthiae*, antimikrobielle Wirkung haben (Nuankeaw et al. 2020) und beide Substanzen zu einer Elongation von Fibroblasten führen (Asami et al. 2012). Auf molekularer Ebene binden Violaceol I und II an G-Aktin und inhibieren dessen Polymerisation. Die beiden *ortho*-positionierten Hydroxygruppen scheinen für diese Aktivität wichtig zu sein. Neben den Violaceolen wurden auch Diorcinol aus *Trichoderma polyalthiae* isoliert. Diorcinol trägt im Vergleich zu Violaceol I an den beiden *ortho*-Positionen der Phenolringe keine Hydroxygruppe (Abbildung 1-17). Es zeigt keine Wirkung auf Fibroblasten (Asami et al. 2012).

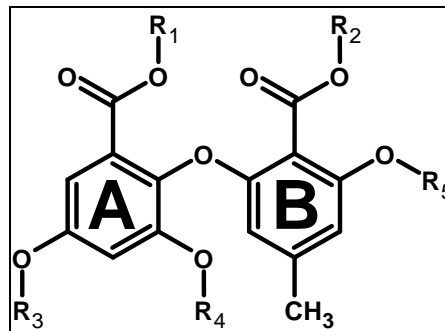


**Abbildung 1-17: Violaceol I und II im Vergleich zu Diorcinol**

Dargestellt ist die chemische Struktur der beiden Isomere Violaceol I, links, und Violaceol II, rechts. Beide Verbindungen unterscheiden sich in der Position der Substituenten in einem der beiden Phenylringe (Li et al. 2015).

In Pilzen lassen sich neben den oben genannten Diphenylethern, die sich durch Hydroxy- und Methyl-Substituenten der Phenylringe auszeichnen, eine große Anzahl an Diphenylethern mit *ortho*-Carboxy-Substituenten an beiden Ringen finden. Zudem tragen einige dieser Diphenylether an einem der

Phenylringe ein bis zwei Chlor-Substituenten, also reaktive Gruppen, weshalb solche natürlichen Verbindungen in den Fokus der Pharmakologie und Entwicklung von Pestiziden rücken (Dayan und Duke 2014).

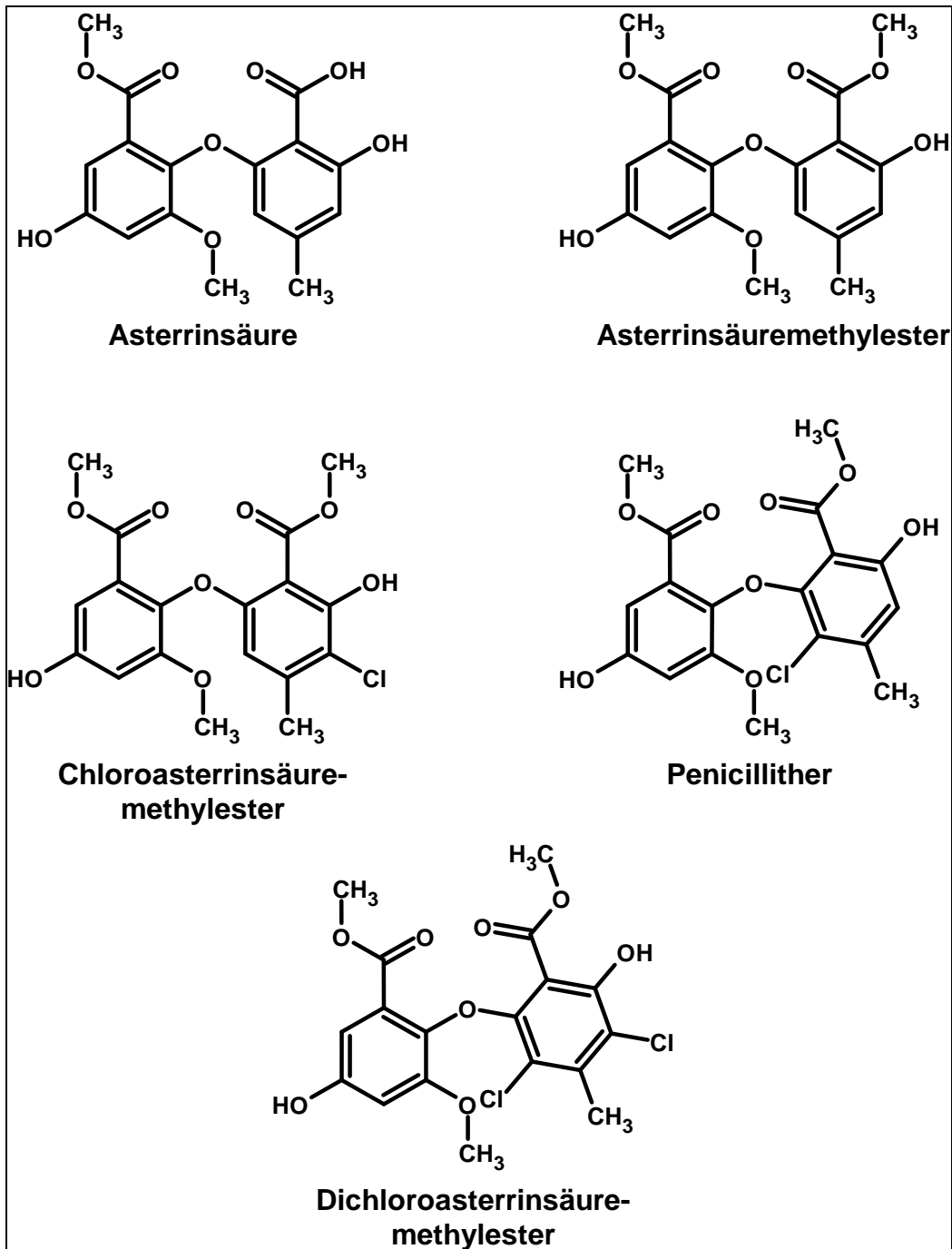


**Abbildung 1-18: Generelle Struktur natürlicher dicarboxylierter Diphenylether**

Chemische Grundstruktur mit dicarboxylierten Diphenylringen mit den beiden Phenylringen A und B. Beide Ringe tragen an der 2- bzw. 2'-Position Carboxy-Gruppen, die methyliert oder nicht-methyliert sein können ( $R_1=H$  oder Me und  $R_2=H$  oder Me). Der A-Ring trägt an 4- und 6-Position Hydroxy- oder Methoxy-Gruppen ( $R_3=H$  oder Me und  $R_4=H$  oder Me). Am B-Ring ist die 3'-Position mit einer Hydroxy- oder Methoxy-Gruppe substituiert ( $R_5=H$  oder Me) und die 5'-Position ist methyliert. An den weiteren Positionen können unterschiedliche Substituenten gebunden sein (Adeboya et al. 1996; Klaikey et al. 2012; Rukachaisirikul et al. 2014).

Einer der ersten aus Pilzen isolierten Diphenylether war die Asterrinsäure (Ohashi et al. 1992). Dieser Diphenylether wurde aus einer nicht weiter bestimmten *Aspergillus* Spezies isoliert (Ohashi et al. 1992). Asterrinsäure inhibiert spezifisch die Bindung des humanen Peptidhormon Endothelin 1 an seinen  $ET_A$ -Rezeptor. Auch konnte aus einer Laub-assoziierten *Aspergillus* Spezies Asterrinsäure und Asterrinsäure-Derivate isoliert werden (Abbildung 1-19; Hargreaves et al. 2002). Bei den Derivaten handelt es sich um den Asterrinsäuremethylester, den beiden monochlorierten Diphenylethern Chloroasterrinsäuremethylester und Penicillither sowie den Dichloroasterrinsäuremethylester, der zwei Chlor-Substituenten trägt.

Einige der aus Pilzen isolierten Diphenylether können die Keimung von Kresse-Samen inhibieren (Hargreaves et al. 2002). Chloroasterrinsäuremethylester inhibiert vollständig die Keimung bei einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  und Dichloroasterrinsäuremethylester bei einer Konzentration von 28  $\mu\text{M}$ . Asterrinsäure war erst ab einer Konzentration von 290  $\mu\text{M}$  aktiv (Hargreaves et al. 2002). Diese natürlichen Diphenylether konnten auch aus weiteren Pilzen innerhalb und außerhalb der *Aspergillus*-Gattung isoliert werden.



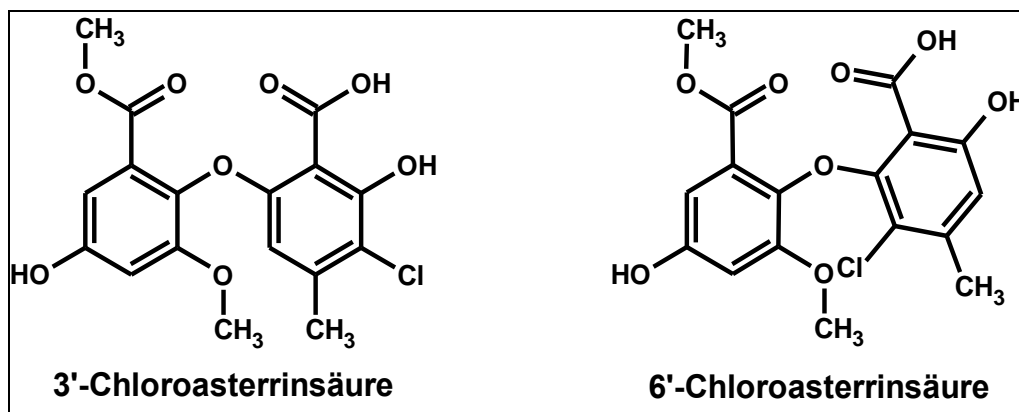
**Abbildung 1-19: Asterrinsäure und Derivate**

Chemische Struktur natürlich vorkommende Diphenylether, die hauptsächlich aus einer *Aspergillus* Spezies von Hargreaves und Kollegen isoliert wurden (Hargreaves et al. 2002). Alle Verbindungen leiten sich von der Asterrinsäure ab.

Asterrinsäure, Asterrinsäuremethylester und Dichloroasterrinsäuremethylester sind ebenfalls aus einem *Penicillium*-Pilz isoliert worden (Rukachaisirikul et al. 2014). Aus dem gleichen Pilz wurde zudem der Penicillither aufgereinigt. Des Weiteren konnten Penicillither und Dichloroasterrinsäuremethylester sowie die 6'-Chloroasterrinsäure in einem Extrakt aus *Aspergillus versicolor* identifiziert werden (Zhang et al. 2019a). Penicillither und Dichloroasterrinsäuremethylester wurden auch aus *Aspergillus capensis* isoliert (Qin et al. 2019). *A. capensis* ist als Endophyt mit *Brassica*

*napus* assoziiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass beide Diphenylether eine fungizide Wirkung auf die Phytopathogene *Botrytis cinerea*, *Monilinia fructuicola*, *Scelerotinia sclerotiorum* und *Sclerotinia trifoliorum* haben (Qin et al. 2019).

Das aus *Aspergillus versicolor* isolierte 6'-Chloroasterrinsäure ist das demethylierte Derivat des Penicillithers und wird im Folgenden Isochloroasterrinsäure genannt. Das demethylierte Derivat des Chloroasterrinsäuremethylesters, die 3'-Chloroasterrinsäure, wird im Folgenden als Chloroasterrinsäure bezeichnet. Sie wurde aus *Aspergillus flavipes* isoliert (Wang et al. 2016). Die beiden Chloroasterrinsäure Isoformen unterscheiden sich in der Position des Chloratoms am B-Ring (Abbildung 1-20). Die aus *A. flavipes* isolierten Diphenylether Asterrinsäure, Dichloroasterrinsäuremethylester und Neogedinhydrat haben eine starke inhibierende Wirkung auf rekombinante humane  $\alpha$ -Glucosidase (Wang et al. 2016).



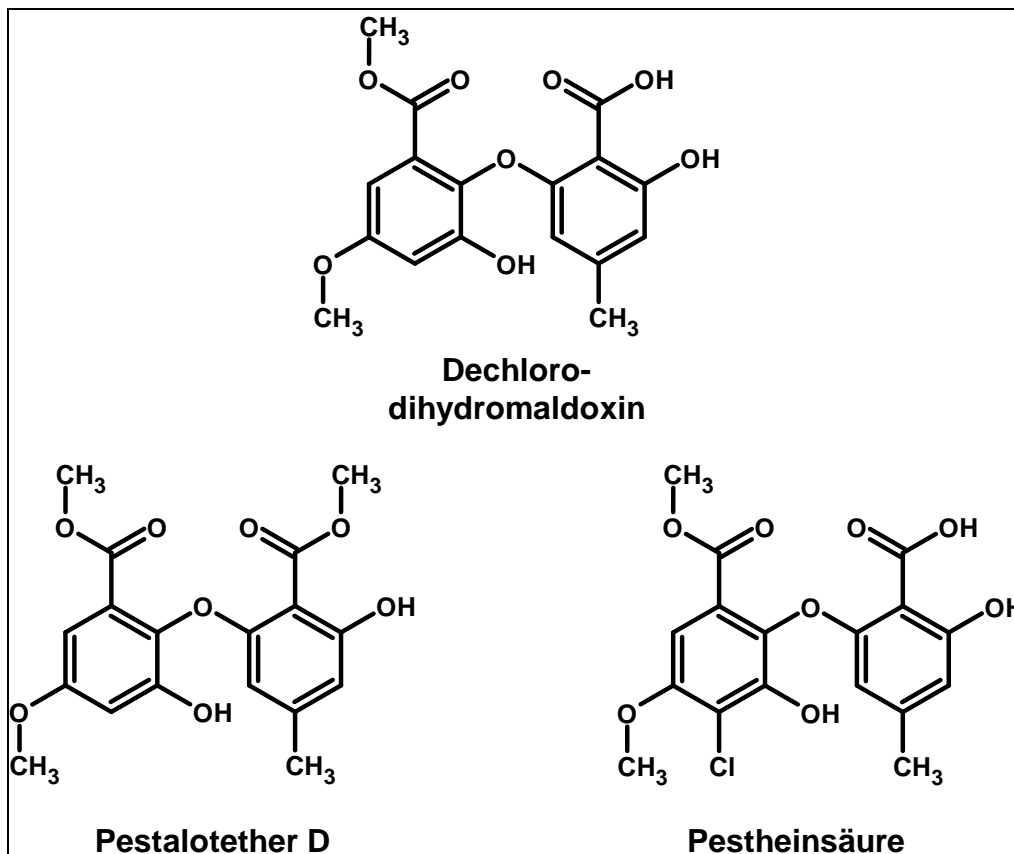
**Abbildung 1-20: Chloroasterrinsäure Isoformen**

Die chemische Struktur der beiden monochlorierten Asterrinsäure-Derivate. Die 3'-Chloroasterrinsäure ist die demethylierte Form des aus einer *Aspergillus* Spezies isolierten Chloroasterrinsäuremethylester und die 6'-Chloroasterrinsäure ist die demethylierte Form des Penicillithers (Hargreaves et al. 2002). Die 6'-Chloroasterrinsäure wird auch als Isochloroasterrinsäure im Weiteren bezeichnet, während entsprechend die 3'-Chloroasterrinsäure als Chloroasterrinsäure bezeichnet wird.

Neben den Derivaten von Asterrinsäure wurden weitere strukturell-ähnliche Diphenylether aus Pilzen isoliert. Bei diesen strukturellen Derivaten handelt es sich um Barceloneinsäure A und B sowie der Methylester Barceloneinsäure, Barceloneinsäuremethylester. Alle drei Verbindungen wurden unter anderem aus dem Phytopathogen *Penicillium albocoremium* isoliert und zeigten teilweise physiologische Effekte (6 Anhang, Tabelle 6-15).

Wie Asterrinsäure zeigen die beiden Diphenylether Dechlorodihydromaldoxin und Pestheinsäure eine Inhibierung der ET-1-Bindung an den ET<sub>A</sub>-Rezeptor. Beide Diphenylether wurden aus einer *Pestalotiopsis* sp. erstmals 1995 isoliert (Ogawa et al. 1995). Bei Dechlorodihydromaldoxin handelt es sich um ein Isomer der Asterrinsäure und Pestheinsäure ist ein Isomer der beiden Chloroasterrinsäuren (Abbildung 1-21). Aus *Pestalotiopsis theae*, ein Phytopathogen, der zur Graufäule von Teeblättern führt,

wurde die Verbindung Pestheinsäure isoliert (Shimada et al. 2001) und gezeigt, dass diese zu einem gesteigertem Wurzelwachstum von Salat- und Reiskeimlingen führt. Das Wurzelwachstum von Reiskeimlingen wurde bei einer Konzentration von 10 mg/l um 134 % und das von Salatkeimlingen bei einer Konzentration von 100 mg/l um 161 % gesteigert (Shimada et al. 2001). Neben dem Phytopathogen synthetisiert auch der Endophyt *Pestalotiopsis fici*, der mit der Teepflanze *Camellia sinensis* assoziiert ist, die Pestheinsäure (Xu et al. 2014).



**Abbildung 1-21: Aus *Pestalotiopsis* spp. Isolierte Diphenylether**

Die strukturell verwandten Strukturen Dechlorodihydromaldoxin, Pestalotether D und Pestheinsäure wurden aus unterschiedlichen *Pestalotiopsis* spp. isoliert (Ogawa et al. 1995; Shimada et al. 2001; Klaikey et al. 2012). Pestalotether D ist die methylierte Form von Dechlorodihydromaldoxin und die Pestheinsäure die chlorierte Form.

Zusammen mit Pestheinsäure und Dechlorodihydromaldoxin wurde auch Pestalotether D (Abbildung 1-21) neben weiteren Pestalotethern aus einem Endophyten aus der Ordnung der *Pestalotiopsis* isoliert (Klaikey et al. 2012). Dieser Endophyt ist assoziiert mit Mangroven. Eine physiologische Wirkung von Pestalotether D auf Pflanzen wurde bisher nicht untersucht.

## 1.5 Genom Editierung mittels CRISPR/Cas

Um den Ertragsverlust, verursacht durch Phytopathogene und Beiwuchs, entgegenzuwirken, treten neben dem Einsatz von Pestiziden neue Methoden in den Vordergrund. Es werden neue, alternativen Bewirtschaftungsformen, beispielsweise in vertikalen Farmen ohne Ackerboden, Pflanzen mit erhöhten Erträgen bei gleichzeitigem verringertem Wasser und Nährstoffverbrauch oder auch Pflanzen, die Resistenzen gegenüber Pathogenen aufweisen, verwendet (Bortesi und Fischer 2015; Malzahn et al. 2017; Shi et al. 2017; Shu et al. 2020). Zur Steigerung der Ausbeute von Nutzpflanzen stehen biotechnologische Methoden im Vordergrund. Dabei spielt vor allem die Genome-Editierung eine große Rolle (Bortesi und Fischer 2015; Malzahn et al. 2017; Malzahn et al. 2019).

Aber nicht nur für die Generierung von optimierten Nutzpflanzen, sondern auch für die reverse Genetik sowie die biologische Grundlagenforschung stellen Genom-Editierungssystem ein wichtiges Werkzeug dar. Für die Genom-Editierung werden biotechnologisch programmierbare Endonukleasen als Gen in den zu modifizierenden Organismus, wie beispielsweise Pflanzen, eingebracht. Diese Endonukleasen, Proteine die innerhalb des DNA-Doppelstrang schneiden, sind durch ihre biotechnologische Modifizierung in der Lage an spezifischen Stellen die genomische DNA aufzuschneiden. Zu diesen Endonukleasen gehören die Zink-Finger-Nukleasen (ZFN) und die *transcription activator-like effector nukleasen* (TALEN), die beide als Nuklease die FokI-Nuklease-Domäne nutzen, sowie *clustered regularly interspaced short palindromic repeat* (CRISPR-) Systeme mit den CRISPR assoziierten (Cas-) Proteinen (Malzahn et al. 2017; Huang und Puchta 2019; Malzahn et al. 2019). Im Anschluss werden die Enden der gesplante DNA durch DNA-Reparatursysteme wieder zusammengefügt. Es werden hauptsächlich zwei DNA-Reparatursysteme unterschieden. Einerseits die homologe Rekombination und das fehleranfällige *non-homologouse end-joining*. Durch letzteres kann beim Verbinden der beiden aufgeschnittenen DNA-Enden Fehler entstehen, die zu unterschiedlichen Mutationen führen, wie beispielsweise einen Aminosäure-Austausch, ein vorzeitiges Stopcodon, Insertion oder Deletion von Aminosäuren oder ein Frame-Shift der Sequenz.

### 1.5.1 DNA-Reparaturmechanismen

DNA kann durch mehrere Faktoren, wie zum Beispiel Strahlung, mutagene Substanzen (Lans et al. 2012) oder Nukleasen, wie Cas-Protein, beschädigt werden. Um dem entgegenzuwirken, besitzen Zellen mehrere DNA-Reparaturmechanismen. Abhängig von der Art der Schädigung der DNA wird diese durch unterschiedliche Mechanismen repariert. DNA-Doppelstrangbrüche werden hauptsächlich entweder durch das *non-homologouse end joining* (NHEJ) oder durch Homologe Rekombination (HR) behoben (Krogh und Symington 2004; Daley et al. 2005; San Filippo et al. 2008; Lieber 2010).



Beide Prozesse sind ausführlich, sowohl für Hefen als auch für Tiere und Menschen, untersucht. Des Weiteren sind beide Mechanismen in allen Eukaryoten hoch konserviert (Daley et al. 2005; San Filippo et al. 2008; Lieber 2010). Dabei gibt es geringe Unterschiede in den Proteinen des NHEJ der Vertebraten gegenüber denen der restlichen Eukaryoten, weshalb der Prozess *in planta* und in Hefe gleich funktioniert (Lieber 2010). Nachdem ein Doppelstrangbruch entstanden ist, binden an die beiden Enden der DNA KU70-Proteine. Bei dem KU70-Protein handelt es sich um ein sogenanntes  $\beta$ -Fassringprotein (Daley et al. 2005). KU70 bildet darüber hinaus mit KU80 ein Heterodimer (Lans et al. 2012). Dieser Komplex aus DNA:KU70/KU80 bildet den initialen Schritt für das NHEJ und kontrolliert die Aktivität weiterer Reparaturfaktoren (Lans et al. 2012). Es kommt zur Rekrutierung von DNA-abhängigen Proteinkinasen, diese phosphorylieren und aktivieren weitere Proteine. So kommt es zur Aktivierung des MRX- bzw. MRN-Komplexes, bestehend aus MRE11, RAD50 und XRS in Hefe bzw. NBN in Vertebraten (Daley et al. 2005; Lans et al. 2012). Anschließend werden die Enden durch einen Ligasekomplex bestehend aus XRCC4, NHEJ1 und LIG4 miteinander ligiert (Lans et al. 2012). Neben diesen Kernelementen sind weitere Proteine involviert, darunter auch Endonukleasen. Sowohl die Endonukleasen als auch die Ligasen sind für die Fehleranfälligkeit des NHEJ-Reparaturmechanismus verantwortlich. Bevor nicht beide Enden religiert wurden, können durch die Endonukleasen Basenpaare deletiert und durch die Ligasen inseriert werden. Diese Generierung von InDel-Mutationen werden bei der Generierung von Punktmutationen mittels CRISPR/Cas9 genutzt (Wang et al. 2015; Bortesi und Fischer 2015; Paul und Qi 2016).

Im Gegensatz zum NHEJ ist die Homologe Rekombination weniger fehleranfällig (Krogh und Symington 2004; San Filippo et al. 2008). Die HR benötigt die Interaktion von zwei DNA-Sequenzen. Dabei wird der Doppelstrangbruch mit Hilfe der zweiten Sequenz, die zudem perfekt oder nahezu perfekt homolog ist, repariert. Zudem triggert der Prozess der Homologen Rekombination das Crossover während der Meiose (Krogh und Symington 2004; San Filippo et al. 2008; Huang und Puchta 2019). Dieser Austausch von Informationen zwischen dem maternalen und dem paternalen Allelen führt zur genetischen Vielfalt einer Spezies (San Filippo et al. 2008). Wie die Proteine, die im NHEJ involviert sind, sind auch die HR-Proteine über alle Eukaryoten hoch konserviert. In Eukaryoten existieren zwei Rekombinasen, einerseits die DMC1, andererseits die RAD51. DMC1 wird nur während der Meiose exprimiert und ist somit nicht als Reparaturmechanismus bei der HR beteiligt. RAD51 ist sowohl während der Meiose als auch der Mitose exprimiert und dient der DNA-Reparatur während der mitotischen Phase (San Filippo et al. 2008). RAD51 initiiert die Homologe Rekombination indem es als homologes Oligomer an die doppelsträngige DNA (dsDNA) bindet. Anschließend bindet RAD51 unterstützt durch RAD52 eine einzelsträngige DNA-Sequenz (ssDNA) die als Vorlage für die Reparatur mittels homologer Rekombination dient (Krogh und Symington 2004; San Filippo et al. 2008).

In höheren Pflanzen dominiert das NHEJ gegenüber der HR (Huang und Puchta 2019; Lin et al. 2020). Dies erschwert es *in planta* Knock-Ins zu generieren. Bei einem Knock-In wird ein Gen oder eine Sequenz in das Genom gezielt integriert. Wird ein Gen integriert, kommt es nicht zu einer Störung eines anderen Genes. Bei der Integration von kürzeren Sequenzen können diese die endogene Sequenz ersetzen. So können spezifische Punktmutationen in das Genom eingebracht werden.

Mehrere unterschiedliche Ansätze wurden bereits durchgeführt, um die HR-Rate *in planta* zu erhöhen. So zeigen Knock-Out-Mutanten der Gene KU70 oder LIG4 in *Arabidopsis thaliana* eine bis zu 19-fach höhere Rate (Qi et al. 2013; Endo et al. 2016). Auch die Überexpression von AtRAD54 in *Arabidopsis thaliana* erhöhte die HR-Rate um das zehnfache (Shaked et al. 2005; Endo et al. 2006). Jedoch zeigen sowohl die Knock-Outs als auch die Überexpressionslinien genomische Instabilitäten. Diese können zu Chromosomenbrüchen und chromosomalen Translocationen führen. Anschließend müssen sowohl die Mutationen als auch die T-DNA durch rückkreuzen mit Wildtyp-Pflanzen eliminiert werden (Huang und Puchta 2019).

### 1.5.2 Biotechnologische Endonukleasen

Wie oben beschrieben werden biotechnologisch modifizierte Endonukleasen verwendet um die genomische DNA aufzuschneiden, sodass durch das NHEJ genomische Veränderungen herbeigeführt werden. Dabei verwenden die beiden Genom-Editierungssysteme ZF-Nukleasen und TALE-Nukleasen als Nuklease die FokI. Diese ist eine Endonuklease aus dem Bakterium *Flavobacterium okeanokoites*. Diese Systeme bieten gegenüber anderen Methoden wie EMS-Mutagenese oder  $\gamma$ -Strahlung induzierten Mutationen den Vorteil, dass diese zielgerichteten Mutationen generieren können. Während RNAi oder microRNA nur teilweise unvollständige Knock-Downs erzeugen (Filichkin et al. 2007), können mit Genom-Editierungssystemen Gen-Knock-Outs generiert werden. Dazu werden Frameshifts und vorzeitige Stop-Codons oder auch ganze Gene bzw. Gen-Cluster deletiert. Zudem kann nach der Mutagenese des Zielgenes die T-DNA, mit der die Nukleasen eingebracht wurde, durch beispielsweise Kreuzung eliminiert werden (Malzahn et al. 2017).

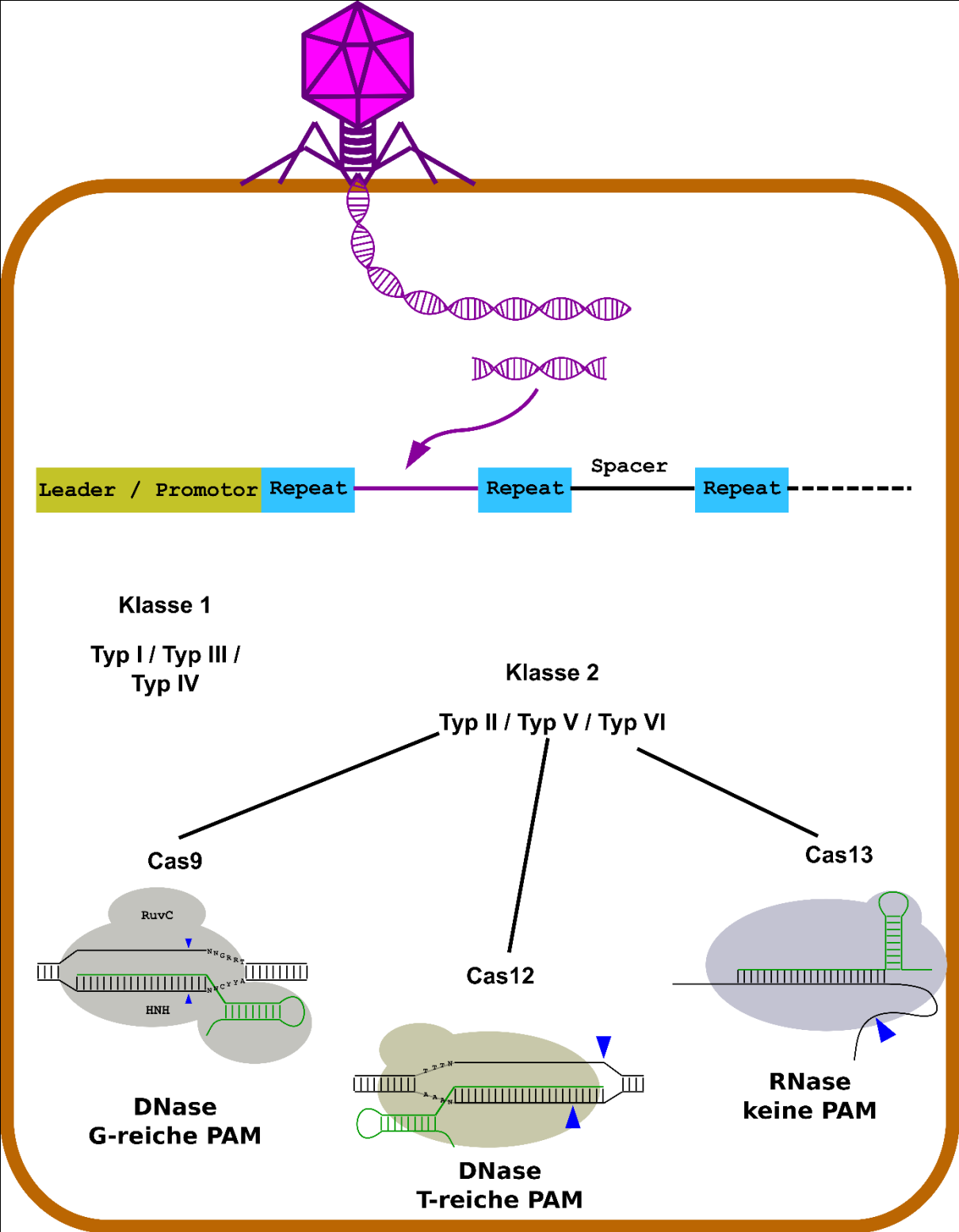
Die Zink-Finger-Nukleasen sind Fusionsproteine bestehend aus Zink-Finger-Proteinen und der Nuklease FokI. ZF-Nukleasen waren die ersten Sequenz-spezifischen Nukleasen die zur Genom-Editierung verwendet wurden (Voytas 2013). Die Bindung der ZF-Nukleasen an die DNA erfolgt mittels eines Arrays, bestehend aus drei bis vier ZF-Domänen (Voytas 2013; Malzahn et al. 2017). Jede dieser Domänen erkennt drei spezifische Nukleotide. Somit kann ein ZFN-Monomer eine neun bis zwölf Nukleotid-lange Sequenz erkennen (Voytas 2013). Die FokI-Nuklease-Domäne ist als Dimer aktiv, weshalb auch die ZF-Nukleasen als Dimer aktiv sind. Somit kann eine 18 bis 24 Nukleotid-lange Zielsequenz erkannt werden (Malzahn et al. 2017). Für jedes Zielgen muss jedoch das Zink-Finger-Array

neu kloniert werden, was die Generierung von ZF-Nukleasen sowohl Zeit als auch Kosten intensiv macht.

Wie die ZF-Nukleasen sind auch die TALE-Nukleasen Fusionsproteine, bestehend aus der FokI-Nuklease und sogenannten Repeats der TAL Effektor-Domäne. Diese Repeats binden spezifisch an die Ziel-DNA (Voytas 2013; Gurushidze et al. 2014). Der TAL-Effektor stammt ursprünglich von einem bakteriellen Phytophagen der Gattung *Xanthomonas* und dient dem Pathogen dazu spezifische Gene des Wirtes zu exprimieren (Malzahn et al. 2017; Voytas 2013). Jeder TALE-Repeat besitzt zwei Aminosäuren die als RVD (*repeat variable diresidues*) bezeichnet werden. Diese RVD erkennen spezifisch je eine Base. Die TALE-Nukleasen bestehen aus 13 bis 28 TALE-Repeats und können, da diese wie die ZF-Nukleasen als Dimer aktiv sind, eine Zielsequenz von 26 bis 56 Nukleotiden erkennen (Voytas 2013).

Wegen ihrer repetitiven Sequenz der Repeats ist die Synthese mittels PCR erschwert (Voytas 2013; Malzahn et al. 2017). Neue Klonierungsmethoden wie beispielsweise die Golden-Gate-Klonierung vereinfacht jedoch die Klonierung von TALE-Nukleasen. Zudem sind die TALE-Nukleasen weniger toxisch für den Zielorganismus als die ZF-Nukleasen.

Das CRISPR-System bildet zusammen mit den Cas-Proteinen einen Teil des mikrobiellen Immunsystems (Abbildung 1-22; Gasiunas et al. 2012; Jinek et al. 2012). Dabei werden kurze Fragmente der Fremd-DNA als sogenannte Spacer im CRISPR-Array zwischen zwei Repeats aufgenommen. Diese Repeats sind eine konservierte Struktur. Das CRISPR-Repeat-Spacer-Array wird in ein langes Primär-Transkript transkribiert und anschließend durch RNasen oder Cas-Nukleasen in kürzere CRISPR RNAs (crRNAs) prozessiert (Gasiunas et al. 2012). Die crRNA bildet mit anderen Cas-Nukleasen funktionelle Komplexe. Da die crRNA komplementär zu der fremden Target-DNA oder Target-RNA ist, können die Cas-crRNA-Komplexe die Target-DNA erkennen und schneiden. Zusätzlich zu der Ausbildung des Cas-crRNA-Komplexes identifizieren einige Cas-Nukleasen, vor allem solche mit DNase-Funktion, sogenannte *protospacer adjacent motif* (PAM). Dabei handelt es sich um eine Nukleotid-Sequenz die sich am 3'- oder 5'-Ende der Target-Sequenz anschließt. Die Position, Länge und Sequenzabfolge der PAM unterscheidet sich je nach Cas-Nuklease. Daher lassen sich unterschiedliche Cas-Proteine in mehrere Typen unterteilen.



**Abbildung 1-22: Natürliche Funktion der mikrobiellen CRISPR-Systeme**

In mikrobiellen Organismen fungiert das CRISPR-System als Teil des Immunsystems. Es werden zwei Klassen von Cas-Proteinen unterschieden. Die Klasse 1 Cas-Proteine sind als Multiproteinkomplexe aktiv. Dem gegenüber stehen die Klasse 2 Cas-Proteine die als Monoproteine aktiv sind und in der Biotechnologie Anwendung finden. Es werden drei Typen der Klasse 2 Cas-Proteine unterschieden. Zu den Typ II Cas-Proteinen gehört die Cas9, die DNA mit einer G-reichen PAM schneidet. Die Typ V Cas-Protein, darunter die Cas12, schneiden ebenfalls DNA jedoch mit einer T-reichen PAM. Im Kontrast zu den Typ II und Typ V Cas-Proteinen stehen die Typ VI Cas-Proteine wie die Cas13. Diese schneiden RNA anstelle von DNA.

Typ I und Typ III Cas-Proteine bilden mit der crRNA ein Multi-Cas-Protein Komplex. Im Gegensatz dazu bildet die Cas-Proteine des Typ II, darunter der prototypische Vertreter Cas9, nur Einzelproteinkomplexe mit der crRNA und einer zweiten RNA, der sogenannten *trans-activating crRNA* (tracrRNA). Dabei besitzt die tracrRNA komplementäre Sequenzen zu der Repeat-Sequenz der crRNA (Jinek et al. 2012). Wie die Typ II Proteine sind auch die Typ VI Proteine als Einzelproteinkomplexe aktiv. Diese schneiden im Gegensatz zu den Typ II nicht DNA, sondern RNA (Wolter und Puchta 2018; Schindele et al. 2018).

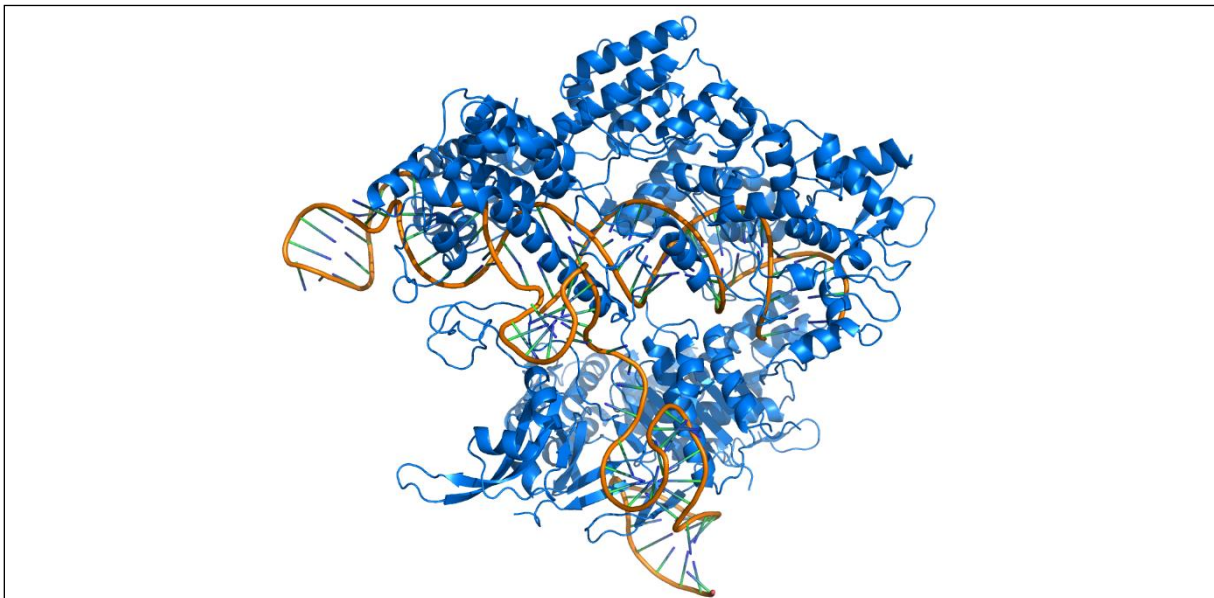
Im Vergleich zu ZF- und TALE-Nukleasen besitzen die CRISPR/Cas-Systeme, vor allem die der Klasse 2, entscheidende Vorteile. Die Erkennung der Zielsequenz durch die CRISPR/Cas-Systeme erfolgt durch die crRNAs und nicht wie bei den ZF- oder TALE-Nukleasen durch das Protein selbst. Somit muss nicht für jedes Zielgen die Cas-Gensequenz mittels PCR oder anderen Klonierungsmethoden modifiziert werden. Zusätzlich bietet die Erkennung der Zielsequenz mittels mehrerer crRNAs die Möglichkeit mehrere Ziel-Gene in einem Individuum zu modifizieren. Da die crRNAs nur 20 bp groß sind, werden für die Deletion im Vergleich zu ZF- und TALE-Nukleasen kleinere Plasmide benötigt. Die Klassen 2 CRISPR/Cas-Systeme haben zusätzlich den Vorteil, dass sie als Monomer aktiv sind. Für die CRISPR/Cas-Systeme, die als DNasen aktiv sind, ist es weiterhin möglich zur Einzelstrang-Spaltung auch sogenannte Nickasen zu generieren. Zudem sind die CRISPR/Cas-Systeme nicht methylierungssensitiv. Jedoch weisen die CRISPR/Cas-Systeme einen Off-Target-Effekt auf, der dazu führt, dass neben dem Ziel-Gen auch weitere, meist homologe Gene gespalten und mutiert werden (Schiml et al. 2014; Fauser et al. 2014; Kleinstiver et al. 2015a; Kleinstiver et al. 2015b).

Da jede Cas-Nuklease mit DNase-Funktion eine PAM-Sequenz benötigt, entsteht so eine Reglementierung der Target-Stellen durch das Vorhandensein oder viel mehr durch das nicht-Vorhandensein dieser Sequenz. Je nach Komplexität der spezifischen PAM-Sequenz kann es vorkommen, dass es für einige Gene nur wenige oder auch keine Target-Stellen gibt. Durch die Identifizierung von CRISPR/Cas-Orthologa aus unterschiedlichen Bakterienarten stehen mehrere PAM-Sequenzen zur Verfügung, da jedes Cas-Orthologa je nach Bakterienart unterschiedliche, spezifische PAM-Sequenzen aufweist. Beispiel hierfür sind die Cas9-Nukleasen aus *Streptococcus pyogenes* und *Staphylococcus aureus* (1.5.2.1 *Streptococcus pyogenes* Cas9 und 1.5.2.2 *Staphylococcus aureus* Cas9). Die Cas9-Proteine haben sich, da sie als Monomere aktiv sind, als Genom-Editierungssystem etabliert.

Die Cas9-Proteine besitzen hoch konserviert zwei Domänen. Die RuvC-like Domäne ähnelt in ihrer Faltung der Faltung von RNase H Proteinen, während die HNH-like Domäne sich ähnlich faltet wie Homing-Endonukleasen. Beide Domänen sind bei der Restriktion der DNA beteiligt (Jinek et al. 2012). Die HNH schneidet den crRNA-komplementären DNA-Strang, während die RuvC-like Domäne den nicht-komplementären DNA-Strang schneidet (Jinek et al. 2012).

### 1.5.2.1 Streptococcus pyogenes Cas9

Es wurde für die *S. pyogenes* Cas9 gezeigt, dass mit einer einzelnen chimären RNA, durch Fusion der crRNA mit der tracrRNA, die Cas9 entsprechende Target-Sequenzen erkennen und schneiden kann (Jinek et al. 2012). So wird aus dem ursprünglichem Cas9-System ein biotechnologisches Werkzeug, das mit nur einer RNA, der sogenannten *single guide RNA* (sgRNA), die Zielsequenz erkennen kann (Jinek et al. 2012). Der Doppelstrangbruch durch die Cas9 erfolgt in der Erkennungssequenz drei Basenpaare upstream der PAM (Fauser et al. 2014). Bei dieser Erkennungssequenz handelt es sich um ein NGG-Motif (N: irgendein Nukleotid, G: Guanin). Die PAM wird durch zwei Arginine der Cas9 (R<sup>1333</sup> und R<sup>1335</sup>) erkannt (Belhaj et al. 2015). Der Doppelstrangbruch wird zwar durch endogene Reparaturmechanismen behoben, jedoch sind gerade das *non-homologous end-joining* (NHEJ) fehleranfällig, sodass es zu Insertionen oder auch Deletionen von Basenpaaren kommen kann (1.5.1 DNA-Reparaturmechanismen; Schiml et al. 2014; Wang et al. 2015).



**Abbildung 1-23: Kristallstruktur der Cas9 aus Streptococcus pyogenes (4008)**

Dargestellt ist die Kristallstruktur der Cas9 aus *Streptococcus pyogenes* im Komplex mit einer sgRNA und der Target-DNA (4008 (Nishimasu et al. 2014)). In Blau ist die SpCas9-Nuklease dargestellt. Die sgRNA befindet sich im Protein gebunden während die Target-DNA vom unteren Bildrand kommend dargestellt ist. Die sgRNA und die Target-DNA bilden im links dargestellten Bereich des Proteins eine RNA-DNA-Hybrid-Struktur.

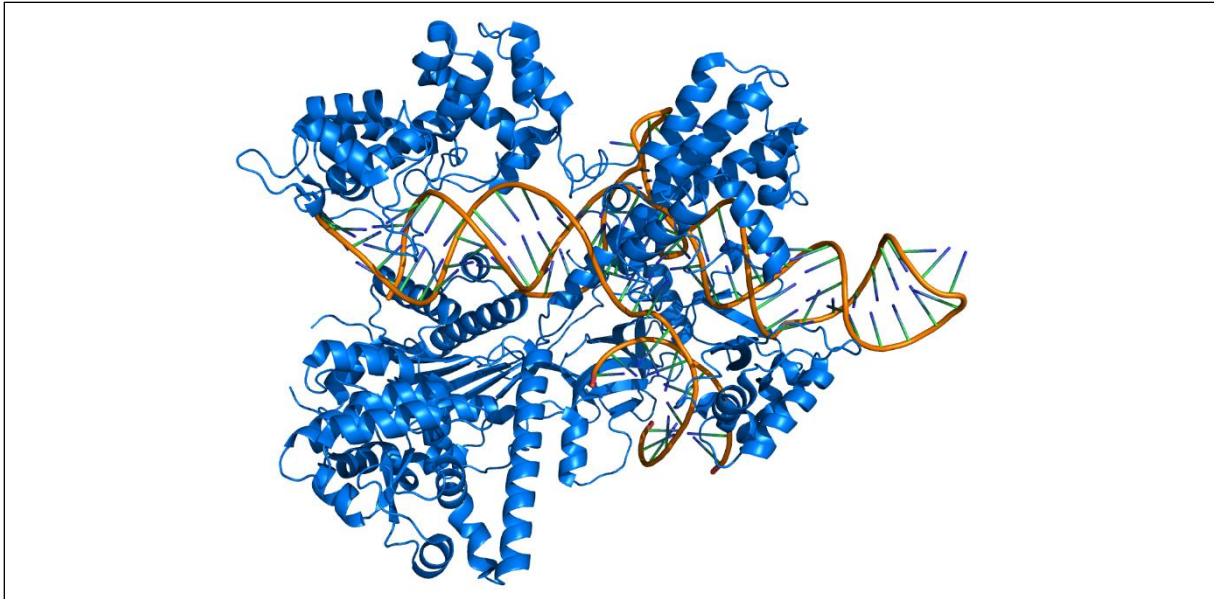
Auch mit anderen gentechnisch veränderten Nukleasen, wie ZF- und TALE-Nukleasen, lassen sich gezielte Doppelstrangbrüche *in vivo* generieren (Fauser et al. 2014). Jedoch weist das CRISPR/Cas9-System einige Vorzüge gegenüber diesen Systemen auf. Während die DNA-binde Domäne für ZF- und TALE-Nukleasen für jedes Target aufwendig konzipiert und kloniert werden muss, benötigt das CRISPR/Cas9-System nur eine neue 20 Nukleotiden lange crRNA, die mit der tracrRNA fusioniert wird (Belhaj et al. 2015; Fauser et al. 2014). Gegenüber EMS Mutagenese und  $\gamma$ -Bestrahlung haben jedoch alle Nukleasen den Vorteil, dass sie mehr oder weniger zielgerichtete Mutationen

generieren können (Belhaj et al. 2015). Zudem eignet sich das CRISPR/Cas9-System aufgrund der hohen Effizienz speziell Möglichkeiten für die Generierung von Multigenmutanten. Bei diesen handelt es sich um Mutationen oder Deletionen von mehreren Genen, die sich auf geclustert auf einem Chromosom befinden. Während Multigenmutanten durch Kreuzung von einzelnen T-DNA-Insertionslinien nur mit hohem Aufwand zu erzeugen sind, können durch paralleles oder sequenzielles Mutieren mittels CRISPR/Cas9 diese effizienter generiert werden (Wang et al. 2015). Im Gegensatz zu ZF- und TALE-Nukleasen werden deutlich kleinere Plasmide benötigt, da für jedes Target-Gen eine sgRNA benötigt wird.

Die *SpCas9* wurde als erste Cas9 für die gentechnische Manipulation von Tierzellkulturen und von Pflanzen verwendet (Paul und Qi 2016). In *A. thaliana* und in Reis konnten so vererbare Mutationen generiert werden (Schiml et al. 2014). Jedoch ist die Vererbbarkeit der Mutation stark von dem Promotor der *SpCas9* abhängig. Wird beispielsweise die *SpCas9* durch den 35S-Promotor, vom Blumenkohlmosaikvirus (*Cauliflower Mosaic Virus*, CaMV) stammend, exprimiert, lässt sich eine hohe Mutationsrate detektieren, jedoch werden diese Mutationen nur mit einer geringen Rate weitervererbt (Wang et al. 2015; Paul und Qi 2016). Hinzu kommt, dass bei diesen Systemen Mosaikmutationen auftreten, das heißt, dass mehrere unterschiedliche Mutationen in unterschiedlichen Geweben oder auch einzelnen Zellen generiert werden können (Wang et al. 2015). Durch die Verwendung des pflanzlichen eizellspezifischen Promotors pEC1.2 (Sprunck et al. 2012), auch DD45-Promotor genannt, wird die *SpCas9* oder Cas9-Orthologa ausschließlich in der nicht befruchteten Eizelle exprimiert (Wang et al. 2015). Mit diesem System kann die Mutation nach erfolgreicher Transformation bereits in der Eizelle der Pflanze generiert werden (Wang et al. 2015). Diese Mutationen können nach der Befruchtung und der resultierenden Pflanze sowohl heterozygot als auch homozygot oder biallelisch vorliegen, da nach der Befruchtung das Cas9-Protein eine gewisse Zeit noch vorliegen kann (Wang et al. 2015). Biallelische Mutationen sind zwei unterschiedliche Mutationen auf dem maternalen und paternalen Allel, im Kontrast zur homozygoten Mutation bei der sowohl das maternale als auch das paternale Allel die gleiche Mutation aufweisen.

#### 1.5.2.2 *Staphylococcus aureus Cas9*

Cas9-Orthologa aus unterschiedlichen Bakterienstämmen können sich nicht nur in ihrer Größe, sondern auch in der Struktur ihrer tracrRNA und der PAM-Sequenz unterscheiden (Steinert et al. 2015; Paul und Qi 2016). So ist die *Staphylococcus aureus* Cas9 mit 1.053 Aminosäuren kleiner als die *SpCas9* mit ihren 1.368 Aminosäuren (Nishimasu et al. 2015b).



**Abbildung 1-24: Kristallstruktur der Cas9 aus *Staphylococcus aureus* (5AXW)**

Zu sehen ist die Kristallstruktur der Cas9 aus *Staphylococcus aureus* im Komplex mit einer sgRNA und einer Target-DNA (5AXW (Nishimasu et al. 2015a)). Das SaCas9-Protein ist in blau dargestellt mit der sgRNA im Protein gebunden. Die Target-DNA, von unterhalb des Proteins kommend, bildet im links dargestellten Bereich der SaCas9 eine Hybrid-Struktur mit der sgRNA aus.

Zudem erkennt die SaCas9 eine andere PAM. Dabei handelt es sich um ein NNGRRT-Motiv, wobei R sowohl für Adenin als auch Guanin steht (Nishimasu et al. 2015b; Steinert et al. 2015). Diese längere Erkennungssequenz erhöht zudem die Spezifität der SaCas9 im Vergleich zur SpCas9 bzw. kann die Anzahl an Off-Targets verringern. Diese erhöhte Spezifität hat jedoch zum Nachteil, dass nicht für jedes Target-Gen entsprechende Sequenzen gefunden werden (Steinert et al. 2015).

Da jedes Cas9-Ortholog seine eigene spezifische tracrRNA und PAM-Sequenz besitzt, die beide nicht von einem anderen Cas9-Ortholog erkannt werden kann, können auch mehrere Cas9-Orthologa gleichzeitig exprimiert werden (Steinert et al. 2015). Die Verwendung von mehreren Cas9-Orthologa ermöglicht es, dass mehrere Funktionen in der gleichen Zelle bzw. Pflanze erfüllt werden können. Beispielsweise wurden Systeme etabliert, die der Regulation der Transkription, der mikroskopischen *in situ* Analyse und weiteren Methoden dienen. Beispielsweise kann mit solchen Systemen gleichzeitig ein Doppelstrangbruch generiert werden, während die Transkription bestimmter Gene hoch- bzw. runterreguliert wird. (Steinert et al. 2015)



## 1.6 Zielsetzung

Die Entgiftungsfunktion von GSTs wird schon seit langer Zeit untersucht und auch gut verstanden. Viele der Ergebnisse basieren auf Untersuchungen von tierischen GSTs, die im Nachhinein auch für pflanzliche GSTs verifiziert werden konnten. Nichtsdestotrotz sind einige Fragen in Bezug auf die pflanzlichen GSTs offen. Zum einen ist die GST-Genfamilie in Pflanzen im Vergleich zu Tieren sehr groß. Wieso Pflanzen eine solche Vielzahl an Isoformen entwickelt haben, ist bisher nicht geklärt. Hinzu kommt, dass es immer noch fraglich ist, ob die einzelnen Isoformen eine überlappende Substratspezifität haben. Vor allem die GSTs die in Gen-Clustern vorliegen, weisen eine hohe Homologie auf. Gerade für diese GSTs wird eine überlappende Substratspezifität sowohl für exogene als auch endogene Substrate erwartet. Für anthropogene exogene Substrate, wie beispielsweise Herbizide, ist die Substratspezifität bereits untersucht, jedoch stellt sich auch hier die Frage, wie es evolutionär zu einer Substratspezifität kam. Mögliche Kandidaten für die Aufklärung dieser evolutionären Triebkräfte könnten Phytotoxine aus Mikroorganismen darstellen. Auch endogene Substrate können eine mögliche evolutionäre Triebkraft darstellen. Hierbei stehen toxische Intermediate im Fokus die durch die GSTs umgesetzt werden. Außerdem ist für einige Fälle bekannt, dass GSTs in Biosynthesewegen involviert sind. Jedoch sind die einzelnen GSTs, die bei solchen Prozessen agieren, auf Grund der möglichen funktionellen Redundanz von homologen GSTs bisher nur in geringen Maßen eruiert.

Im Rahmen dieser Arbeit soll eine Substratspezifität der einzelnen GSTs gegenüber der Diphenylether-Herbizid-Klasse und strukturähnlicher, natürlicher Verbindungen untersucht werden. Neben den Diphenylether-Herbiziden wurde auch die Substratspezifität gegenüber den Triazin-Herbiziden von SNP-Varianten der *AtGSTU5* und der Variante aus *Arabidopsis lyrata* untersucht.

Für *in planta* Analysen der GST-Aktivität musste im Zuge dieser Arbeit ein CRISPR/Cas9-System entwickelt werden. Mit dessen Hilfe sollten anschließend Multiple-Gen Deletionsmutanten generiert werden. Diese Mutanten sollten genutzt werden, sowohl die Konjugation von Xenobiotika als auch endogene Prozesse zu untersuchen.

Weiterhin wurde das CRISPR/Cas9-System genutzt um die Homologe-Rekombination *in planta* aufzuklären und anschließend Linien zu generieren, die eine höhere Rekombinationsrate aufwiesen. Mit einer solchen Linie sollten dann SNPs von GSTs oder der Austausch eines GST-Promotors gegen einen konstitutiven Promotor erfolgen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte

**Tabelle 2-1: Verwendete Geräte**

<b>Geräte</b>	<b>Modell</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Gelelektrophorese-Netzteil</b>	EPS 200	Biometra
	EPS 301	
<b>HPLC</b>	P680 HPLC-Pumpe	Dionex
	ASI-100 Automated Sample Injector	
	UVD170U Detector	
<b>Inkubator</b>	WTB Brutschrank	Binder
	Thermoshake	Gerhardt
	Innova 43R	Eppendorf
<b>Mikroplattenleser</b>	Synergy 2	Biotek
<b>NanoDrop-Photometer</b>	NanoPhotometer 7122 V1.4	Implen
<b>Mikroskope</b>	HBO 50 Axioskop	Zeiss
	FluoView™3000 (FV3000)	Olympus
<b>PCR-Cycler</b>	T-Gradient	Biometra
<b>Photometer</b>	Ultrospec 2000 UV/Visible Spectrometer	Pharmacia Biotech
<b>pH-Meter</b>	pH 526	WTW
<b>Sterilbank</b>	Laminar Flow Workstation	Microflow
<b>Schwingmühle</b>	Tissue LyserII	Qiagen
<b>Thermomixer</b>	Thermomixer 5436	Eppendorf
<b>Vortexer</b>	MS1	IKA
<b>Waage</b>	BP3100S	Sartorius
	A200S	
<b>Zentrifugen</b>	Avanti J-25	Beckmann Coulter
	Centrifuge Typ 5242	Eppendorf
	Centrifuge Typ 5242R	
	ROTINA 420R	Hettich

## 2.2 Chemikalien und Lösungsmittel

Laborchemikalien, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden, soweit nicht anders angegeben, in höchstmöglicher Reinheit von den Firmen Sigma-Aldrich GmbH (München), Carl Roth GmbH (Karlsruhe) oder AppliChem GmbH (Darmstadt) bezogen. Die verwendeten Pestizide wurden von Sigma-Aldrich GmbH (München) in analytischer Standardqualität PESTANAL® und die natürlichen Diphenylether wurden von der Firmer Analyticon Discovery GmbH (Potsdam) erworben. Sowohl die Pestizide und die natürlichen Diphenylether wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst.

## 2.3 Primer

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden bei Eurofins MWG Synthesis (Ebersberg) in *salt free*-Qualität bestellt. Die Stock-Lösungen wurden auf 100 µM in bidestilliertem Wasser eingestellt. Eine Liste der in dieser Arbeit verwendeten Primer und deren Sequenz sind im Anhang unter Tabelle 6-1 (6 Anhang). Für die Klonierung von sgRNAs für CRISPR/Cas-Konstrukte wurden Oligomere ebenfalls bei Eurofins MWG Synthesis (Ebersberg) in *salt free*-Qualität bestellt. Die Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Oligomere sind in Tabelle 6-2 aufgeführt (6 Anhang).

## 2.4 Organismen und ihre Anzucht

### 2.4.1 *Escherichia coli*

In Abhängigkeit der Verwendung und im speziellen von dem verwendeten Vektorsystem wurden unterschiedliche *E. coli* Stämme verwendet. Diese weisen unterschiedliche Resistenzen auf. Zur Klonierung und Amplifizierung von Plasmiden wurden *E. coli* verwendet. Bei der klassischen Klonierung wurden die Stämme XL1 blue und DH5α verwendet. Für die Amplifizierung und die Klonierung von Golden-Gate-Konstrukte mit *ccdB*-Kassette wurde der Stamm DB3.1 verwendet, da dieser über eine *ccdB*-Resistenz verfügt. Der Stamm TOP10 wurde für alle anderen Golden-Gate-Klonierungen verwendet. In Tabelle 2-2 sind die verwendeten *E. coli* Stämme, sowie deren Genotyp, Auto-Antibiotikaresistenz und deren Verwendung aufgeführt. Die Kultivierung erfolgte in LB- bzw. in dYT-Medium, falls hohe DNA-Mengen benötigt wurden, mit entsprechenden Antibiotika zur Selektion.

Tabelle 2-2: Verwendete *E. coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Resistenz	Anwendung
XL1-blue	endA1 gyrA96(nal <sup>R</sup> ) thi-1 recA1 rel1 lac glnV44 hsdR17(r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) F'[:Tn10 proAB <sup>+</sup> lacI <sup>q</sup> Δ(lacZ) M15]	Tetracyclin	Klassische Klonierung Blue/White-Screening
DH5α	endA1glnV44 thi-1 revA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 hsdR17(r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) λ <sup>-</sup>	Keine	Klassische Klonierung
TOP10	mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rps(Str <sup>R</sup> ) endA1 λ <sup>-</sup>	Streptomycin	Golden-Gate Klonierung, ccdB-negativ Selektion
DB3.1	gyrA462 endA1 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20 hlnV44 ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20 xyl5 leuB6 mtl	Streptomycin ccdB insensitiv	Amplifizierung von Vektorbackbones für Golden-Gate Klonierung

#### 2.4.2 *Agrobacterium tumefaciens*

Für die Transformation von *Arabidopsis thaliana* wurde *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 mit pMP90 bzw. GV3101 mit pMP90 und pSOUP verwendet (Holsters et al. 1980; Koncz und Schell 1986; Vain et al. 2003). Auf dYT-Platten mit entsprechender Selektion wurden die Bakterien bei 28 °C für zwei Tage inkubiert. Flüssig Kulturen wurden in dYT-Medium mit entsprechender Selektion bei 28 °C und 200 rpm angezogen.

#### 2.4.3 Bakterien-Medien

Abhängig von der Verwendung der einzelnen Bakterien wurden unterschiedliche Medien verwendet. Für *A. tumefaciens* wurde das dYT-Medium verwendet. Bei *E. coli* wurde für hohe DNA-Ausbeuten ebenfalls dYT-Medium eingesetzt. In anderen Fällen wurde LB-Medium verwendet. In Tabelle 2-3 ist die Zusammensetzung des LB- und des dYT-Mediums aufgeführt.

Tabelle 2-3: Zusammensetzung unterschiedliche Bakterien Medien

	LB-Medium [g/l]	dYT-Medium [g/l]
Pepton/Trypton	10	16
Hefeextrakt	5	10
NaCl	10	5
pH	7,0	7,0

Für Festmedium wurden zusätzlich 15 g Agar hinzugefügt. Nach dem Autoklavieren wurden für die Anwendung die Medien mit entsprechenden Antibiotika für die Selektion auf Plasmide oder *E. coli* Stämme versetzt. Hierfür wurden Stock-Lösungen mit einer 1.000-fachen Konzentration hergestellt. In Tabelle 2-4 ist die Endkonzentration im Medium der einzelnen Antibiotika aufgeführt.

**Tabelle 2-4: Verwendete Antibiotika und deren Endkonzentration**

<b>Antibiotika</b>	<b>Endkonzentration [<math>\mu\text{g/ml}</math>]</b>
Ampicillin	100
Kanamycin	25
Spectinomycin	200
Gentamicin	25
Rifampicin	50

#### 2.4.4 *Saccharomyces cerevisiae*

*S. cerevisiae* wurde zur heterologen Expression der AtGSTs verwendet. Hierfür wurde eine *knock-out* (KO-) Mutante verwendet, die auf dem BY4742 [MAT $\alpha$  his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 lys2 $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ 0] Stamm basiert (Krajewski et al. 2013; Kowalski 2016). In der KO-Mutante wurden die Gene der endogenen GSTs Tef4p, Gto1p, Gto2p und Gto3 (Koonin et al. 1994; Jeppesen et al. 2003; Garcerá et al. 2006) sowie die am Katabolismus von GSH-Konjugaten beteiligten Proteine Cis2p, Cpc und Cpy (Wünschmann et al. 2010).

Die Anzucht von *S. cerevisiae* erfolgte mit *synthetic defined* (SD-) Minimalmedium. Das SD-Minimalmedium besteht aus Makro- und Mikrosalzen. In Tabelle 2-5 ist die Zusammensetzung des SD-Mediums sowie der Stock-Lösungen der Makrosalze und Mikrosalze aufgeführt.

**Tabelle 2-5: SD-Medium für Hefe Kulturen**

<b>SD-Medium [l<sup>-1</sup>]</b>			
Makrosalze		1x	
Mikrosalze		1x	
Auf 850 ml mit MQ-Wasser auffüllen			
<b>10x Makrosalze [g/l]</b>		<b>1000x Mikrosalze [mg/l]</b>	
Kaliumdihydrogenphosphat	10	Biotin	2
Magnesiumsulfat Heptahydrat	10,24	Pantothensäure Calciumslaz	400
Natriumchlorid50	1	Folsäure	20
Calciumchlorid Anhydrat	1	Myo-Inositol	2000
Ammoniumsulfat	50	Nicotinsäure	400
		p-Aminobenzolsäure	200
		Pyridoxinhydrichlorid	400
		Riboflavin	200
		Thiamin HCl	400
		Borsäure	500
		Kufersulfat	40
		Kaliumiodid	100
		Eisen-II-chlorid	200
		Mangansulfat	400
		Natriummolybdän	200
		Zinksulfat	400

Für die Markierung von Metaboliten mit Schwefel-Isotopen in Hefe wurde ein schwefelfreies Medium hergestellt. Die Zusammensetzung der schwefelfreien Makrosalze und Mikrosalze sind in Tabelle 2-6 aufgeführt.

Tabelle 2-6: Schwefelfreie Makro- und Mikrosalze

10x schwefelfrei Makrosalze [g/l]		1000x schwefelfreie Mikrosalze [mg/l]	
Kaliumdihydrogenphosphat	10	Biotin	2
Magnesiumchlorid Hexahydrat	8,45	Pantothensäure Calciumslaz	400
Natriumchlorid	1	Folsäure	20
Calciumchlorid Anhydrat	1	Myo-Inositol	2000
Ammoniumchlorid	40,46	Nicotinsäure	400
		p-Aminobenzolsäure	200
		Pyridoxinhydrichlorid	400
		Riboflavin	200
		Thiamin HCl	400
		Borsäure	500
		Kupferchlorid	21,6
		Kaliumiodid	100
		Eisen-II-chlorid	200
		Manganchlorid	468,4
		Natriummolybdän	200
		Zinkacetat	305,2

#### 2.4.5 *Arabidopsis thaliana*

Alle Knock-Out- und Überexpressionslinien, die in dieser Arbeit verwendet wurden, haben als genetischen Background den Ökotyp Columbia-0, wenn nicht weiter speziell daraufhin gewiesen wird. Die KO-Linien wurden vom *Eurasian Arabidopsis Stock Centre* (NASC, Loughborough, UK) bezogen. Überexpressionslinien wurden mittels *A. tumefaciens*-vermittelter Transformation im Labor generiert.

Für die GST-Überexpressionslinien wurde das pGreen-Plasmid verwendet (Hellens et al. 2000). Das entsprechende GST-Gen steht bei diesem Plasmid unter der Kontrolle des 35S-Promotors aus dem Blumenkohlmosaikvirus (CaMV) und als Terminator dient der Nos-Terminator. Der Kanamycin-Marker auf dem Plasmid dient der Selektion der transgenen Bakterien. Die Selektion der transgenen Pflanzen erfolgt mit BASTA® (Bayer CropScience AG). Die Formulierung BASTA® enthält als Wirkstoff 200 g/l Glufosinat-Ammonium (Bayer CropScience 2012). Für das Screen nach transgenen Pflanzen mit dem entsprechenden Resistenzmarker (Murakami et al. 1986; Thompson et al. 1987) wurde eine 1:1.000-Verdünnung in Wasser verwendet.

Die Anzucht von Pflanzen für Versuche erfolgte auf ¼ Murashige und Skoog (MS)-Platten (Murashige und Skoog 1962), siehe Tabelle 2-7, während die Pflanzenanzucht für die Amplifizierung von Samen, sowie Basta-Screens und Genotypisierung auf Typ T-Erde erfolgte mit einer Unterschicht aus Perlite erfolgte. Die Anzucht in Erde erfolgt bei Langtag-Bedingung ( $160 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und einer

Umgebungstemperatur von 22 °C. Für physiologische Experimente auf MS-Platten wurden die Pflanzen bei Dauerlicht ( $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und 23 °C angezogen. Für die Anzucht und physiologische Versuche wurden *A. thaliana* Samen auf MS-Medium ausgebracht

**Tabelle 2-7: Zusammensetzung von MS-Medium**

	1x MS-Medium [l <sup>-1</sup> ]	½x MS-Medium [l <sup>-1</sup> ]	¼x MS-Medium [l <sup>-1</sup> ]
Makrosalze	1x	0,5x	0,25x
Mikrosalze	1x	0,5x	0,25x
MES	1 g	1 g	1 g
pH	5,8	5,8	5,8
<b>10x Makrosalze [g/l]</b>		<b>50x Mikrosalze [mg/l]</b>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	16,5	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	310
KNO <sub>3</sub>	19	CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	1,25
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,7	CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	1,25
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	4,4	FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1390
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	3,7	MnSO <sub>4</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	1115
		KI	41,5
		Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	12,5
		ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	430
		Na <sub>2</sub> EDTA x 2 H <sub>2</sub> O	1860

Für zuckerhaltiges Medium wurden 10 g/l Saccharose dem Medium hinzugegeben. Entsprechend wurde für ½-fach Zucker 5 g/l Saccharose dem Medium zugefügt. Für Festmedium wurden 9 g/l Agar zugegeben.

## 2.5 Molekularbiologische Methoden

### 2.5.1 Nukleinsäure Isolierung

#### 2.5.1.1 Plasmid-DNA Isolierung aus *E. coli*

Für die Präparation reiner Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das NucleoSpin® Plasmid EasyPure Kit (Macherey Nagel) nach Hersteller-Angaben verwendet. In einigen Fällen wurde die DNA ohne die dem Kit-enthaltenen Spin-Columns aufgereinigt. Hierfür wurden die Puffer des NucleoSpin® Plasmid EasyPure Kits verwendet. Eine Übernachtskultur wurde bei 11.000 g für 30 s abzentrifugiert und in 100 µl Resuspensionspuffer resuspendiert. Anschließend wurde diese Suspension mit 200 µl Lysepuffer des Herstellers versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Die Lyse wurde durch Gabe von 150 µl Neutralisierungspuffer gestoppt und das Lysat bei 20.000 g für mindestens 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 500 µl absoluten Ethanol versetzt und bei 4°C für 15 min und bei 20.000 g erneut



ab zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen und nach erneutem Zentrifugieren, getrocknet. Anschließend wurde das DNA-Pellet in 50 µl Wasser resuspendiert.

#### 2.5.1.2 Plasmid-DNA Isolierung aus *A. tumefaciens*

In einigen Fällen war die Überprüfung der Plasmid-DNA nach der Transformation von *A. tumefaciens* notwendig. Hierfür wurde das NucleoSpin® Plasmid EasyPure Kit von Macherey Nagel nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die isolierte Plasmid-DNA wurde anschließend in *E. coli* transformiert und isoliert, um eine höhere Plasmid-Ausbeute zu bekommen.

#### 2.5.1.3 Isolierung von genomischer *Arabidopsis* DNA

Zu Genotypisierung von *Arabidopsis* Pflanzen wurde ein Blatt von Einzelpflanzen abgeschnitten und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Diese wurden in einem *Tissue Lyser* (Qiagen, Hilden) homogenisiert. Dieses Homogenat wurde mit 800 µl vorgewärmten (65°C) DNA-Extraktionspuffer versetzt und im Thermoshaker (Eppendorf, Hamburg) für 15 min bei 65° inkubiert.

Anschließend wurden 520 µl einer 24:1 Chloroform:Isoamylalkohol-Lösung auf die Homogenatlösung gegeben und invertiert. Die Proben wurden bei mindestens 14.000 g für 2 min abzentrifugiert und der wässrige Überstand in ein frisches Mikroreaktionsgefäß überführt. Im Anschluss wurde diese Lösung mit 30 µg RNase versetzt und bei 37°C für 30 min inkubiert.

Zur Fällung der DNA wurden der wässrigen Lösung, ca. 700 µl, weitere 700 µl Isopropanol hinzugefügt und diese bei 14.000 g für 15 min ab zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde anschließend mit 70 %igem Ethanol, 700 µl, gewaschen und erneut ab zentrifugiert. Abschließend wurde das Pellet getrocknet und in 50 bis 100 µl Wasser resuspendiert.

Für das *High throughput-Screening* einer großen Anzahl an *Arabidopsis* Individuen wurde das Protokoll auf 96-Deep-Well-Platten (STARLAB, Hamburg) angepasst. Jeweils ein Blatt je Einzelpflanze wurde direkt in die Deep-Well-Platten (STARLAB, Hamburg) geerntet und in dieser in flüssigem Stickstoff weggefroren. Nach der Homogenisierung mittels einem *Tissue Lyser* (Qiagen, Hilden) in der Platte wurde das Homogenat mit 300 µl DNA-Extraktionspuffer versetzt.

Für die Chloroform-Extraktion wurde das Homogenat nach der 15-minütigen Inkubation bei 65°C mit 200 µl Chloroform:Isoamylalkohol-Lösung versetzt und zentrifugiert. Der Überstand, ca. 200 µl, wurde in eine neue Deep-Well-Platte (STARLAB, Hamburg) überführt und nach RNase-Verdau (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) wurde die DNA mittels 200 µl Isopropanol gefällt. Wie im Originalprotokoll wurde die DNA danach mit 400 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und nachdem das Pellet getrocknet war, wurde dieses 100 µl Wasser rückgelöst.

**Tabelle 2-8: DNA-Extraktionspuffer die Isolierung von gDNA aus Pflanzenmaterial**

Für die Extraktion von gDNA aus Pflanzematerial wurde ein Extraktionspuffer verwendet, der auf 65 °C vorgeheizt war.

DNA-Extraktionspuffer	
100 mM	Tris-Base, pH8
700 mM	NaCl
50 mM	EDTA, pH8

Vor der Nutzung wurden der Puffer mit 7 µl β-Mercaptoethanol pro 10 ml versetzt.

#### 2.5.1.4 Isolierung von RNA aus *Arabidopsis thaliana*

Zur Isolierung von RNA aus *A. thaliana* wurde entweder Blattmaterial oder Keimlinge verwendet. Die Isolierung erfolgte mittels dem innuPrep RNA Mini Kit (Analytik Jena, Jena). Hierfür wurde das Hersteller-Protokoll verwendet. Die RNA-Konzentration wurde spectrophotometrisch mittels Nanodrop-Photometer (Implen GmbH, München) bestimmt.

#### 2.5.1.5 cDNA-Synthese

Für die Synthese der komplementären DNA (cDNA; *complementary DNA*) durch eine Reverse Transkriptase wurde das cDNA Synthese-Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) mit Oligo-d(t)-Primern verwendet. Das cDNA-Synthese-Kit wurde nach Herstellerangaben verwendet. Die cDNA wurde, falls nicht unmittelbar verwendet, für Klonierungen bei 20 °C und für Expressionsanalysen mittels RT-qPCR bei 80 °C gelagert.

#### 2.5.2 Polymerasekettenreaktion

Zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurde die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*: PCR) verwendet. Hierbei wird ausgehend von einem spezifischen DNA-Oligonukleotid, dem sogenannten Primer, eine neue DNA komplementär zu einem einzelsträngigen Nukleinsäure-Template synthetisiert. Die PCR wurde verwendet um DNA-Fragmente, die für die Klonierung von spezifische Konstrukt benötigt wurden, zu vermehren. Des Weiteren wurde mit Hilfe der zielgerichteten Mutagenese (*site directed mutagenesis*: SDM (Carter 1986; Mülhardt 2013)) in Plasmiden Mutationen eingefügt, die zu einzelnen Aminosäureaustauschen innerhalb der Proteinsequenz führten. Für den schnellen Nachweis der Transformation von Plasmiden in Mikroorganismen wurden Kolonie-PCRs durchgeführt. Bei diesen Anwendungen kamen die Phusion High Fidelity Polymerase oder die Phire II Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) zum Einsatz. Zur Überprüfung von T-DNA Pflanzenlinien und die Prüfung auf Mutationen durch CRISPR/Cas9 wurde die Phire II Polymerase von Thermo Fisher Scientific verwendet.

**Tabelle 2-9: PCR-Ansätze**

Für eine PCR wurde abhängig von der Polymerase folgende Ansätze verwendet.

Phusion-Ansatz (20 µl)		Phire II-Ansatz (20 µl)	
5x HF-Puffer	1x	5x Phire-Puffer	1x
DNA	0,1 – 1 ng	DNA	
Primer	je 0,5 µM	Primer	
dNTPS	0,5 mM	dNTPS	
Phusion-Polymerase	0,4 U	Phire-Polymerase	0,2 – 0,4 U

Im Thermo-Cycler wurden für die unterschiedlichen Polymerasen unterschiedliche PCR-Programme programmiert (Tabelle 2-10). In Abhängigkeit der Template-DNA und dem PCR-Produkt wurde die Zyklenzahl variiert.

**Tabelle 2-10: PCR-Programme**

Folgende Zyklen wurden abhängig von der Polymerase verwendet.

	Phusion		Phire II		
Initiale Denaturierung	98 °C	1 min	98 °C	1 min	30 – 40 Zyklen
Denaturierung	98 °C	30 s	98 °C	20 s	
Primer-Anlagerung	50 – 65 °C	30 s	50 – 60 °C	20 s	
Elongation	72 °C	30 s/kb	72 °C	10 – 15 s/kb	
Abschluss-Elongation	72 °C	2 min	72 °C	1 min	

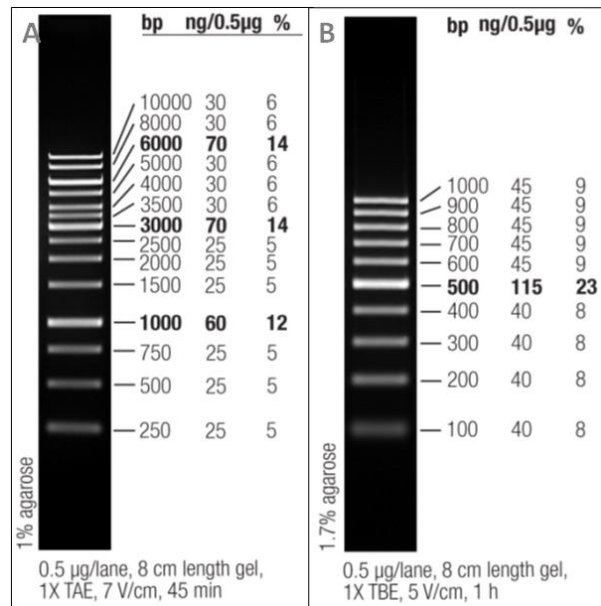
### 2.5.3 Genotypisierung von Pflanzen

Zur Prüfung von T-DNA-Insertionslinien und von CRISPR/Cas-Deletionsmutanten wurden die entsprechenden Pflanzen mittels PCR genotypisiert. Für die T-DNA-Insertionslinien wurden die flankierenden Primer für das Target-Gen und die T-DNA-spezifischen Primer miteinander kombiniert. Hierfür wurde in Vorversuchen festgestellt, welche Kombination von Target-Gen-Primern und T-DNA-Primern die Insertion detektieren. Zur Überprüfung auf Homozygotie wurde zusätzlich nur die beiden Primer für das Target-Gen verwendet. Bei Fehlen eines Amplikons für das Wildtyp-Gen und einem Vorhandensein der Insertion konnte davon ausgegangen werden, dass es sich um eine homozygote Insertionsmutante handelte.

Für die Genotypisierung der CRISPR/Cas-Deletionsmutanten wurden mehrere Primer-Paarungen verwendet. Es wurden Primer verwendet, die außerhalb der Deletion binden und bei einer Deletion ein Amplikon generieren. Zudem wurde eine Paarung verwendet, die nur über eine der Cas9-Target-Sites amplifizierte. Zusätzlich wurden eine Paarung bei der Prüfung auf Homozygotie verwendet, die innerhalb der Deletion lagen. In einigen Fällen konnten keine Deletionsmutanten detektiert werden.

Um zu prüfen ob es zu Punktmutationen kam wurden die PCR Produkte mittels T7-Endonuklease I (New England Biolabs, Frankfurt am Main; M0302S und M0302L) verdaut (Dad et al. 2014; Hu et al. 2015).

Standardmäßig wurde bei der Agarosegel-Analyse der Thermo Scientific GeneRuler 1 kb Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) verwendet (Abbildung 2-1 A). In einigen Fällen wurde alternativ der Thermo Scientific GeneRuler 100 bp Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) aufgetragen (Abbildung 2-1 B).



**Abbildung 2-1: Verwendete GeneRuler für die Genotypisierung von Pflanzen**

Standardmäßig wurde der GeneRuler 1 kb Ladder von Thermo Fisher Scientific verwendet (A). Bei Analysen von kleineren PCR-Produkten wurde auch der GeneRuler 100 bp Ladder von Thermo Fisher Scientific verwendet (B).

#### 2.5.4 T7-Endonuklease I Assay

Die T7-Endonuklease I (New England Biolabs, Frankfurt am Main) schneidet in hybridisierter DNA an Stellen von Mismatches. Für den Verdau der PCR Produkte wurde die T7-Endonuklease I von NEB (New England Biolabs, Frankfurt am Main) verwendet (Babon et al. 2003). Die Durchführung erfolgt nach den Hersteller-Angaben.

#### 2.5.5 Klassische Klonierung

##### 2.5.5.1 DNA-Restriktion

Als Restriktionsenzyme dienten Endonukleasen, die von Thermo Fisher Scientific (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) bezogen wurden. Es wurden die Puffersysteme und Reaktionsbedingungen nach Angabe der Hersteller verwendet. Nach der Inkubation wurde die Restriktion überprüft, indem eine Aliquot des Ansatzes auf ein Agarosegel aufgetragen wurde und über Gelelektrophorese aufgetrennt wurde.

#### 2.5.5.2 DNA-Aufreinigung aus Agarosegelen

Wurden DNA-Fragmente, die weiterverwendet werden sollten, durch Restriktionsverdau oder auch PCR generiert, wurden diese über Gel-Elektrophorese getrennt und anschließend aus dem Gel ausgeschnitten und aus dem Gel extrahiert. Dazu wurde das NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up Kit (Macherey-Nagel; Düren) nach den Herstellerangaben verwendet.

#### 2.5.5.3 DNA-Aufreinigung aus PCR-Ansätzen

Sollten PCR-Produkte in weiteren Klonierungsschritten verwendet werden und waren auf dem analytischen Agarosegel keine Fehlamplikate zu sehen, konnte auch die PCR ohne vorherige Gel-Elektrophorese direkt aufgereinigt werden. Auch hierfür wurde das NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up Kit (Macherey-Nagel, Düren) verwendet. Dabei wurde dem Herstellerprotokoll für PCR-Aufreinigung gefolgt.

#### 2.5.5.4 DNA-Dephosphorylierung

Nach der Aufreinigung eines linearisierten Vektors wurde dessen 5'-Phosphorylrest durch 1U *Antarctic Phosphatase* (New England Biolab, Frankfurt am Main) abgespalten, um eine Religation zu vermeiden. Die Phosphatase wurde entweder dem Restriktionsansatz nach erfolgreichem Verdau oder dem aufgereinigten Vektorfragment zu gegeben und für 60 min bei 37 °C inkubiert. Nach den 60 min wurde der Reaktionsansatz zur Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 65 °C für 10 min inkubiert.

#### 2.5.5.5 DNA-Ligation

Für die Ligation von Vektor- und Insert-DNA-Fragmenten wurde die T4 DNA-Ligase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) verwendet. In den Standardansätzen wurden Vektor und Insert im Verhältnis 1:3 (100 ng Vektor und 300 ng Insert) mit 1x Puffer und 1,5 U Enzym verwendet. Diese Ansätze wurden für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16 °C inkubiert.

#### 2.5.6 Golden-Gate basierte Klonierung

Neben der traditionellen Klonierung von Vektoren wurden in dieser Arbeit auch das *Multi-Kingdom Golden-Gate-System* zur Klonierung verwendet. Dieses System basiert auf dem modularen Aufbau von Expressionskassetten und die Kombination dieser. In dieser Arbeit wurde das System, das von Binder und Kollegen (Binder et al. 2014) sowie von Chiasson und Kollegen (Chiasson et al. 2019) publiziert wurde, verwendet. Dieses System erlaubt es die Gene in Vektoren für unterschiedliche Organismen zu klonieren.

Die genaue Arbeitsmethodik des Systems können der Arbeit von Binder und Kollegen (Binder et al. 2014) sowie der Arbeit von Chiasson und Mitarbeitern (Chiasson et al. 2019) entnommen werden. In Kürze werden bei diesem System nur zwei Restriktionsenzyme verwendet. Bei diesen beiden handelt

sich um Bpil und Bsal. Beide Enzyme sind Typ IIS-Restriktionsenzyme und schneiden die DNA außerhalb ihrer Erkennungssequenz, was es möglich macht spezifische Überhänge zu generieren. Durch diese Überhänge lassen sich einzelne Elemente in definierter Reihenfolge miteinander zu assemblieren. Dieses Assemblee ersetzt im Vektorbackbone eine ccdB-Kassette, die für die verwendeten TOP10 *E. coli* ein toxisches Protein kodiert. So kann auf die Vektorklonierung selektiert werden.

Des Weiteren besitzen die einzelnen Vektoren verschiedene Klonierungsebene, die als Level bezeichnet werden. Sechs Elemente des Level I werden in einen Level II-Vektor kloniert und fünf Level II-Vektoren bilden die Elemente für die Klonierung in Level III. Höhere Ordnungen werden durch die Klonierung von Level III zurück in Level II-Vektoren und erneuter Kombination gewährleistet. Die Resistenzmarker für die Selektion der transformierten *E. coli* unterscheiden sich zwischen den einzelnen Klonierungsebenen.

Durch die Verwendung von Typ IIS-Restriktionsenzymen, der ccdB-Kassette und unterschiedlichen Selektionsmarkern, erfolgt die Assemblierung in einem Reaktionsansatz. Dieser kann anschließend ohne Gel-elektrophoretische Trennung und Aufreinigung direkt in *E. coli* transformiert werden.

#### 2.5.6.1 Cut/Ligation

Die gleichzeitige Restriktion und Ligation der Elemente für die Klonierung eines Vektors erfolgt in einem Reaktionsansatz. Dazu werden die einzelnen Elemente, sowie der benötigte Vektorbackbones und die entsprechenden Enzyme gemischt (Tabelle 2-11).

**Tabelle 2-11: Cut/Ligation Ansatz für die unterschiedlichen Level bei der Golden-Gate basierten Klonierung**  
In Abhängigkeit des zu klonierenden Levels wurden unterschiedliche Cut/Ligation-Ansätze verwendet. Im Fall der CRISPR/Cas-Klonierung wurden die teilweise variiert, um die Verhältnisse der einzelnen Elemente zu einander an zu passen.

LI-Cut/Ligation		LII-Cut/Ligation		LIII-Cut/Ligation	
Zielvektor [100 ng/μl]	1 μl	Zielvektor [100 ng/μl]	1 μl	Zielvektor [100 ng/μl]	1 μl
PCR-Produkt [20-100 ng/μl]	je 2 μl	Elemente [100 ng/μl]	6x2 μl	Elemente [100 ng/μl]	5x2 μl
Buffer G	1 μl	Buffer G	2 μl	Buffer G	2 μl
ATP	1 μl	ATP	2 μl	ATP	2 μl
Bpil [10 U/μl]	0,5 μl	Bsal [10 U/μl]	1 μl	Bpil [10 U/μl]	1 μl
T4 Ligase [5 U/μl]	0,5 μl	T4 Ligase [5 U/μl]	1 μl	T4 Ligase [5 U/μl]	1 μl
H <sub>2</sub> O, auf 10 μl auffüllen		H <sub>2</sub> O, auf 20 μl auffüllen		H <sub>2</sub> O, auf 20 μl auffüllen	

Das parallele Schneiden und Ligieren wird durch eine zyklische Änderung der Reaktionsbedingungen ermöglicht. Dabei wird zwischen der optimalen Reaktionstemperatur für das Restriktionsenzym und der Ligase gewechselt (Tabelle 2-12).

**Tabelle 2-12: Zyklische Änderung der Reaktionsbedingungen für die Cut/Ligation**

Die Cut/Ligation in einer zyklischen Änderung der Reaktionsbedingungen. Es wird zwischen der Optimal-Temperatur für das Restriktionsenzym und der Ligase gewechselt.

Cut/Ligation		
37 °C	5 min	10-15 Zyklen
16 °C	5 min	
16 °C	10 min	1 Zyklus
80 °C	20 min	1 Zyklus
10 °C	10 s	1 Zyklus

#### 2.5.6.2 CRISPR/Cas

Das in dieser Arbeit genutzte CRISPR/Cas-System wurde für das *Multi-Kingdom Golden-Gate* System etabliert. Für die Generierung von Deletionsmutanten wurden gRNAs mittels der Website <http://chopchop.cbu.uib.no/> konzipiert (Montague et al. 2014; Labun et al. 2016; Labun et al. 2019). Anschließend wurden die gRNAs als Primer (Eurofins, Ebersberg) bestellt. Die Target-Sequenz wurde mit einem ATG-Überhang und die komplementäre Sequenz mit einem AAAC-Überhang versehen (Abbildung 2-2).

Target-Site	TCGCTTGTTTATATATTGTTCTT <b>TACTTGCAGATCCTAACACTAGGGT</b> TTAGGTCCTTGTA <b>AAAAGCAGA</b>
Primer 1	attg <b>TACTTGCAGATCCTAACAC</b>
Primer 2	aaac <b>GTGTTAGGATCTGCAAGTAA</b>

#### Abbildung 2-2: gRNA-Design

Exemplarisch dargestellt sind die Primer für die gRNAs. In Grün ist die Target-Site innerhalb eines Genes gezeigt und in Blau die PAM-Sequenz. Diese wird als Primer einmal mit einem ATG-Überhang und deren komplementäre Sequenz mit einem AAAC-Überhang bestellt.

Jeweils 5 µl des einzelsträngigen Target-Sequenz-Primer (100 µM) und des komplementären Primer (100 µM) wurden in einem 50 µl Ansatz bei Raumtemperatur vereinigt. Dieser Ansatz wurde anschließend zur Hybridisierung auf 98 °C für 5 min erhitzt und daraufhin bei Raumtemperatur wieder abkühlen lassen. Die hybridisierten Primer wurden anschließend mit Vektoren, Plasmiden mit Promotor und der tracrRNA in eine Cut/Ligation gegeben. Die so erhaltenen Vektoren wurden als Expressionskassette in LIII-Vektoren mit Resistenzmarkern und den entsprechenden Cas9-Konstrukten für die Pflanzentransformation assembliert.

### Nomenklatur von CRISPR-Linien

Für die generierten Pflanzen Linien wurden zudem eine Nomenklatur festgelegt. Dabei wurden das transformierte und nicht selektierte Saatgut stets mit dem genetischen Background und dem Transformierten-Konstrukt bezeichnet. Neben der verwendeten Cas9, deren Promotor, N- und/oder C-Terminalen Tags wurden die Target-Sites für die Cas9 angegeben, wobei im Fall von GSTs nur die Klasse und Nummer verwendet wurden (Beispiel: U1+U2).

Nach dem Screening und der Genotypisierung wurden entsprechende Deletionen oder Mutationen klein geschrieben angegeben. Für Mutationen oder Deletionen von einzelnen Genen wurden diese Linien als CRISPR und dem entsprechendem Gen bezeichnet. Für Mehrfachmutanten wurde abhängig davon ob es sich um eine Deletion eines Abschnittes oder mehrere Deletionen bzw. Mutationen wie folgt bezeichnet. Ein Bindestrich (-) wurde verwendet um eine Deletion zwischen den beiden angegebenen Genen zu bezeichnen. Waren zwei oder mehrere Gene mutiert und/oder deletiert, wurden die Gene mittels eines Plus (+) aufgezählt. Für alle Linien wurde als eine Art Präfix die Bezeichnung CRISPR vor den Genen angegeben, unabhängig ob das CRISPR/Cas-Konstrukt vorhanden war oder durch pFAST-Screening der segregierenden Linien ausselektiert wurde.

### 2.5.7 Transformation von Organismen

#### 2.5.7.1 *E. coli* Transformation

Zur Transformation von *E. coli* wurden in den meisten Fällen chemisch kompetente Zellen verwendet. Für einige Anwendungen, wie beispielsweise große Plasmide (>20 kB), kamen auch elektrokompente *E. coli* zum Einsatz. Für die Herstellung von chemisch kompetenten *E. coli* wurde eine 250 ml Hauptkultur in Medium A bei 18 °C und 200 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 angezogen. Diese Kultur wurde auf Eis für 10 min abgekühlt und anschließend zum Ernten bei 4 °C für 15 min bei 2.500 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 80 ml eiskaltem TB-Medium resuspendiert und mit 0,7 ml DMSO versetzt. Nach einer Inkubation von 10 min auf Eis wurden die Zellen in 200 µl Aliquote aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff weggefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Aliquote bei -80 °C gelagert.

Für die Herstellung von elektrokompenten Zellen wurde eine 250 ml Hauptkultur über Nacht angezogen. Diese wurde bei 5.000 g für 10 min bei einer Temperatur von 4 °C abzentrifugiert und das Pellet in sterilem eiskaltem bidestilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurde die Kultur erneut durch Zentrifugieren pelletiert. Nach einem zweiten Waschschrift mit anschließender Zentrifugation, wurden die Zellen in 20 ml 10 %igem Glycerol aufgenommen und ein weiteres Mal bei 5.000 rpm abzentrifugiert. Zum Abschluss wurden die Zellen in 3 ml 10 %igem Glycerol aufgenommen und in 50 µl Aliquote bei -80 °C aufbewahrt.



Für die Transformation wurden die chemisch kompetente Zellen auf Eis aufgetaut. Jeweils 50 µl der kompetenten Zellen wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und mit 10-500 ng DNA gemischt. Nach 10 min auf Eis wurden die Zellen bei 42 °C für 1 min einem Hitzeschock ausgesetzt und dann erneut für 1 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden 550 µl LB- oder dYT-Medium zu den Zellen gegeben und diese für 60 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Abschließend wurden die Zellen zentrifugiert und der Überstand bis auf ca. 100 µl verworfen. In den verbleibenden 100 µl wurden die Zellen resuspendiert und auf LB- beziehungsweise dYT-Festmedium mit entsprechender Selektion ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

Die Transformation von elektrokompetenten *E. coli* erfolgt in einem Elektroporator (Eppendorf, Hamburg). Hierfür werden 100 µl der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. In einer Elektroporationsküvette werden diese mit 10-100 ng Plasmid gemischt und im Elektroporator bei 2.500 V einem elektrischen Impuls ausgesetzt. Anschließend wurden die Zellen in LB- oder dYT-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37 °C und 80 rpm regeneriert. Nach der Regeneration wurden die Zellen auf entsprechende Antibiotika-Nährmedium-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

**Tabelle 2-13: Medien für elektrokompetente Zellen**

Für die Herstellung von elektrokompetenten Zellen wurden nachstehende Medien verwendet.

Medium A		TB-Medium	
Pepton	20 g	PIPES, pH 6,4	10 mM
Hefeextrakt	5 g	MnCl <sub>2</sub>	55 mM
NaCl	10 mM	CaCl <sub>2</sub>	15 mM
KCl	2,5 mM	KCl	250 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM		
MgSO <sub>4</sub>	10 mM		

#### 2.5.7.2 *A. tumefaciens* Transformation

Wie *E. coli* wurden zur Transformation auch *A. tumefaciens* sowohl als chemisch kompetente als auch elektrokompetente Zellen verwendet. Für die Herstellung der kompetenten Zellen wurde eine über-Nacht-Kultur in eine 250 ml Hauptkultur überführt und diese bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,7 inkubiert (ca. 4 bis 5 h). Nach dem Erreichen der gewünschten Zelldichte, wurden die Kultur für 20 min auf Eis abgekühlt. Für die elektrokompetenten Zellen wurde die Kultur bei 4 °C und 5.000 g für 10 min abzentrifugiert und das Zellpellet zweimal mit 500 ml eisgekühltem bidestilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 20 ml Glycerin-Wasser-Lösung (10 % v/v) aufgenommen und erneut bei 4 °C und 5.000 g für 10 min zentrifugiert. Die Zellen wurden in 9 ml einer sterilen Glycerin-Wasser-Lösung (10 % v/v) aufgenommen und aliquotiert. Die Aliquote wurden bei -80 °C gelagert.

Für die chemisch kompetenten Zellen wurde die gekühlte Kultur für 5 min bei 4.000 g bei 4 °C abzentrifugiert und anschließend in 25 ml 150 mM Natriumchlorid-Lösung aufgenommen. Nach erneutem Zentrifugieren bei gleichen Bedingungen wurde das Zellpellet in 5 ml 20 mM Kalziumchlorid-Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis stehen gelassen. Danach wurden die Zelllösung in 100 µl Aliquote in flüssigem Stickstoff weggefroren. Bis zur Nutzung wurden die Zellen bei -80 °C gelagert.

Bei der Transformation von elektrokompetenten Zellen wurden sie auf Eis aufgetaut und mit 10 bis 100 ng DNA versetzt. Anschließend wurden diese in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Im Elektroporator (Eppendorf, Hamburg) wurde ein elektrischer Impuls von 2.500 V durch die Kultur geleitet und im Nachhinein wurde 700 µl LB- oder dYT-Medium auf die Zellen gegeben. Diese wurden dann für 2 h bei 28 °C in einem frischen 1,5 ml Reaktionsgefäß inkubiert. Abschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, in 100 µl neue Medium aufgenommen und auf Festmedium mit entsprechender Selektion ausplattiert. Bei 28 °C Inkubation waren nach zwei bis drei Tagen Kolonien sichtbar.

Auf Eis aufgetaute chemisch kompetente Zellen wurden mit ca. 100 bis 500 ng Plasmid-DNA versetzt und für 15 min auf Eis gelagert. Anschließend wurden diese bei 37 °C für 5 min Hitze geschockt. Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen zurück auf Eis gestellt und für 5 min dort belassen. Nach dieser Zeit wurde die Zellen mit 600 µl LB- bzw. dYT-Medium versetzt und die Kultur für ca. 2 h zur phänotypischen Expression der Antibiotika-Resistenzen bei 28 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen auf entsprechendem selektivem Festmedium ausplattiert und für zwei Tage bei 28 °C inkubiert.

#### 2.5.7.3 *A. thaliana* Transformation

Durch *A. tumefaciens* vermittelten DNA-Transfer mittels der *floral dip* Methode (Clough und Bent) erfolgte die stabile Transformation von *A. thaliana*. Die Transformation wurde mit ca. 3 Wochen alten Pflanzen, die unter Langtag-Bedingungen angezogen wurden, durchgeführt. Wurden Pflanzen unter anderen Bedingungen, wie beispielsweise Dauerlicht, angezogen, konnte sich der Zeitpunkt der Transformation verschieben. Wichtig bei der Transformation war, dass die Blüte kurz vor der Öffnung stand.

Es wurden die *Golden-Gate*-Binärvektoren oder pGREEN-Vektoren verwendet, die im Vorhinein in *A. tumefaciens* eingebracht wurden. Die Agrobakterien wurden in einer 3 ml Vorkultur mit selektivem dYT-Medium angezogen. Dabei wurde dem Medium 25 µg/ml Rifampicin für die Agrobakterien Selektion, sowie das Plasmid spezifische Antibiotikum zugegeben. Die Kultur wurde über Nacht bei 28 °C und 200 rpm angezogen und am Folgetag in eine 200 ml Kultur mit selektivem dYT-Medium überführt und für 24 h bei 28 °C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 3.000 g für 10 min bei 4 °C geerntet und das Pellet in 300 ml Infiltrationsmedium aufgenommen. In diese

Bakteriensuspension wurden die Infloreszenzen für ca. 1 min getaucht. Nach 5 Tagen wurde dies wiederholt, um die Transformationseffizienz zu erhöhen. Nach dem Abreifen wurden die Samen geerntet und anschließend durch Selektionsmarker-Screens die Transformanten selektiert.

**Tabelle 2-14: Zusammensetzung des Infiltrationsmedium**

Infiltrationsmedium	
Saccharose	70 g/l
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	0,5 g/l
Silwet L-77 (Lehle Seeds, USA)	500 µl/l
pH 5,8	

#### Basta-Screen

Der Screen auf die Basta-Resistenz der *Arabidopsis*-Keimlinge erfolgte in den meisten Fällen, indem die Samen auf Erde ausgebracht wurden. Nach dem diese gekeimt waren, wurde BASTA (Bayer CropScience AG; 200 mg/l Glufosinat-Ammonium Endkonzentration) auf diese gegossen (ca. 250 ml/Schale). Nach zwei Tagen wurden die Keimlinge erneut behandelt.

In einigen Fällen, wie beispielsweise bei Segregationsanalysen, war es nötig die Samen auf MS-Platten keimen zulassen. Dazu wurde in das aufgekochte MS-Medium 10 mg/l Glufosinat-Ammonium zu gegeben und die Samen steril auf die festgewordene Platte ausplattiert. Anschließend wurden die Samen unter Dauerlicht inkubiert und die grünen Pflanzen nach zwei bis drei Wochen in Erde pikiert.

#### Kanamycin-Screen

Für das Screening auf Kanamycin-resistente Pflanzen wurden auf MS-Platten mit 50 mg/l Kanamycin oberflächensterilisierte Samen (2.6.1 Oberflächensterilisation von Samen) ausgebracht. Dabei wurden die Samen jedoch nicht einzeln auf die Platte gesetzt, sondern in 5 µl Wasser aufgeschwemmt und auf die Platte gegeben.

#### Sulfadiazin-Screen

GABI-Kat T-DNA-Insertionslinien wurden auf MS-Platten mit 10 mg/l Sulfadiazin ausgebracht. Dazu wurden die Samen oberflächensterilisiert. Anschließend wurden die Samen unter Dauerlicht inkubiert. Nach vier bis fünf Tagen wurde die Keimungsrate überprüft und nach 14 Tagen konnten resistente Pflanzen von den anderen unterschieden werden.

#### pFAST-Screen

Das pFAST-Element (*fluorescence associated seed technology*) basiert auf der Proteinfusion von RFP mit dem Oleosin1-Protein. Dabei steht das Gen unter dem endogenen Promotor für das OLE1-Gen. Das Protein wird in der Samenschale exprimiert und durch die RFP-Fusion können transgene Samen

unter einem Fluoreszenz-Mikroskop identifiziert werden. Es handelt sich dabei um einen fluoreszierenden Marker im Gegensatz zur Basta- und Kan-Resistenz, die Antibiotika-Resistenz Marker sind (Shimada et al. 2010; Endo et al. 2006).

#### 2.5.7.4 *S. cerevisiae* Transformation

Die Hefetransformation mit pSH-Vektoren und *Golden-Gate*-Hefevektoren erfolgte nach dem Protokoll von Amberg (Amberg et al. 2005). In Kürze, aus einer Übernachtskultur wurde eine 50 ml Kultur (5ml pro Transformationsansatz) mit einer OD<sub>600</sub> von 0,3 in SD-Minimalmedium angesetzt. Diese wurde bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bis 0,8 bei 200 rpm und 30 °C herangezogen. Anschließend wurden die Zellen bei 1.500 g für 5 min geerntet und mit sterilem bidestilliertem Wasser gewaschen.

Danach wurden die Hefezellen in 1 ml 100 mM Lithiumacetat aufgenommen und in einem frischen Reaktionsgefäß erneut wie oben beschrieben pelletiert. Das Pellet wurde erneut in 500 µl 100 mM Lithiumacetat aufgenommen und in 50 µl Ansätze aliquotiert. Diese Aliquote, pro Transformationsansatz eins, wurden erneut abzentrifugiert und der Überstand verworfen.

Auf das Zell-Pellet wurde 360 µl des Transformationsansatz (Tabelle 2-15) gegeben und in diesem resuspendiert. Nach 40 min bei 42 °C Inkubation wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und in 100 µl sterilem bidestilliertem Wasser aufgenommen. Abschließend wurde die Zellsuspension auf selektiven SD-Festmedium ausplattiert und für 2-4 Tage bei 30 °C inkubiert.

Die Transformation von *Golden-Gate*-Genom-Integrationsvektoren wurde wie bei den beiden anderen Vektortypen vorgegangen, mit dem Unterschied, dass ein lineares DNA-Fragment transformiert wurde. Dazu wurde der Integrationsvektor vor der Transformation mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und dieser Ansatz nach Hitzeinaktivierung bei 65 °C dem Transformationsansatz zu gegeben.

**Tabelle 2-15: Transformationsansatz für die Hefe Transformation**

Für die Transformation von Hefen wurde der Transformationsansatz zu dem Hefe-Pellet zugesetzt.

<b>Transformationsansatz</b>	
50 % PEG 4000	240 µl
1 M LiAc	36 µl
Heringssperma-DNA (Sigma; 2 mg/ml in TE, pH 8)	50 µl
Plasmid	je 200 ng / 500 ng verdauter Integrationsvektor
H <sub>2</sub> O	auf 360 µl Gesamtvolumen auffüllen

### 2.5.8 GST-Substratumsatz in *S. cerevisiae*

Um die Umsatzrate der GSTs aus *Arabidopsis* für verschiedene Substrate, wie Pestizide und auch Markersubstanzen, zu bestimmen, wurden die einzelnen Enzyme heterolog in Hefe unter dem GAL1-Promoter, der Galaktose-induzierbar ist, exprimiert. Dazu wurden die kodierende Sequenz der GSTs in den pSH62-Vektor kloniert (Gueldener et al. 2002). Der Auxotrophiemarker in diesem Plasmid ist das HIS3-Gen.

#### 2.5.8.1 *Heterologe AtGST-Expression in S. cerevisiae*

Für die heterologe Expression der GSTs wurden die entsprechenden Hefestämme auf SD-Festmedium ausgestrichen und für 2 d bei 30 °C inkubiert. Einzelkolonien wurden anschließend in 5 ml SD-Medium mit 2 % Saccharose (SD<sub>Sacch</sub>-Medium) überführt und als Vorkultur über Nacht bei 30 °C und 200 rpm angezogen. Mit der Vorkultur wurde dann eine Hauptkultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0,05 in 15 ml SD-Medium mit 2 % Galaktose (SD<sub>Gal</sub>-Medium) angesetzt. Die Konzentration an Saccharose wurde zudem stets auf 0,06 % (v/v) eingestellt. Dazu wurde die Kultur mit SD<sub>Sacch</sub>-Medium supplementiert.

Diese Kultur wurde fünf Stunden bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. In dieser Zeit kam es zur Induktion des Promotors und der Expression der GST.

#### 2.5.8.2 *Substratbelastung*

Nach der Induktion des Promotors und einer adäquaten Expression der GSTs wurden die Kulturen mit entsprechenden GST-Substraten belastet. Die Substrate waren in DMSO gelöst. Wenn nicht im Text anders angegeben, betrug die Endkonzentration der Substrate 5 µM. Zusätzlich betrug die DMSO-Konzentration in allen Experimenten 0,05 % (v/v). Die Hefe-Zellen wurden für 24 h unter Substratbelastung bei 30 °C und 200 rpm inkubiert.

#### 2.5.8.3 *Hefeernte*

Vor der Ernte der Hefen wurde für jede Kultur die OD<sub>600</sub> photometrisch zur Normalisierung der Proben bestimmt. Nach der Messung der OD<sub>600</sub> wurde die Kultur bei 4500 g und 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet zwei Mal mit bidestilliertem Wasser (4 ml und 1 ml) gewaschen und der Überstand entfernt. Die Proben wurden bei -80 °C gelagert, bis diese analysiert wurden.

#### 2.5.8.4 *Metabolitextraktion*

Für die analytische Untersuchung des Substratumsatzes wurden die Metabolite aus *S. cerevisiae* extrahiert. Hierfür wurden auf die pelletierten Zellen (ca. 100 bis 250 µl) Glasperlen (Ø 0,25 – 0,5 mm) im gleichen Volumen gegeben. Diese wurden mit 100 µl 100 % Methanol mit 0,1 % Ameisensäure gemischt und mit 30 Hz für 4 min im *Tissue lyser* (Qiagen, Hilden) homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat mit 150 µl MQ-Wasser mit 0,1 % Ameisensäure gemischt und mehrmals invertiert.

Das Homogenat wurde bei 14.000 g für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde ein weiteres Mal ebenfalls bei 14.000 g für 10 min abzentrifugiert und dann direkt in den Analysen eingesetzt. Die Analytik erfolgte stets unmittelbar nach der Extraktion.

#### 2.5.8.5 Toxizitätsassay

Um die Toxizität der einzelnen Substrate auf Hefe zu überprüfen, wurde eine Vorkultur über Nacht in 4 ml  $SD_{Sacc}$ -Medium angezogen. Mit dieser wurde eine 15 ml Hauptkultur mit  $SD_{Gal}$ -Medium auf  $OD_{600}$  von 0,1 angesetzt. Zusätzlich wurde um die Saccharose-Konzentration für alle Kulturen gleich zu halten, das Volumen der verwendeten Vorkultur auf 3 ml mit  $SD_{Sacch}$  aufgefüllt. Die Hauptkultur wurde für fünf Stunden bei 30 °C und 200 rpm inkubiert.

Nach der Induktion der Genexpression wurde die Kultur auf eine 96 *Deep-Well*-Platte (STARLAB, Hamburg) verteilt. Pro Well wurden 500 µl Kultur gegeben und diese mit entsprechenden Konzentrationen der Substrate belastet. Die *Deep-Well*-Platte (STARLAB, Hamburg) wurde für 16 h bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Nach diesen 16 h wurden 100 µl der Kultur in eine klare 96 *Well*-Platte überführt und am Mikroplattenleser Synergy 2 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA) die Absorption bei 600 nm gemessen.

## 2.6 Physiologische Methoden

### 2.6.1 Oberflächensterilisation von Samen

Für das Arbeiten unter kontrollierten Bedingungen auf Nährmedium mussten die Arabidopsis Samen im Vorhinein oberflächensterilisiert werden. Hierfür wurden ca. 500 Samen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit 80 % (v/v) Ethanol und 0,1 % (v/v) Triton X-100 (400 µl) für 20 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Alle folgenden Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Nach den 20 min wurde der Überstand verworfen und die Samen mit 3 % Natriumhypochlorid (300 µl) für 3 min sterilisiert. Abschließend wurden die Samen fünfmal mit sterilem bidestilliertem Wasser (500 µl) gewaschen, in 0,1 % Agar (300 bis 500 µl) aufgenommen und auf MS-Agarplatten (quadratisch; 100 x 100 mm) ausgebracht.

Um die Dormanz der Samen zu brechen, wurden die MS-Agarplatten für 2 Tage bei 4 °C gelagert. Nach diesen 2 Tagen wurden die Platten in der Zellkultur bei Dauerlicht und 24 °C gestellt, sodass die Samen keimen konnten. Die Platten standen dabei senkrecht, sodass die Wurzel nicht in das Medium, sondern auf der Oberfläche wuchs.

### 2.6.2 Belastung von Keimlingen

Um die Auswirkungen von Herbiziden und anderen Verbindungen auf Keimlinge zu prüfen, wurden diese nach fünf Tagen in der Zellkultur auf Belastungsplatten umgesetzt. Dabei wurde in dem

verflüssigtem  $\frac{1}{4}$  MS-Agarmedium, nachdem dieses etwas abgekühlt war, unterschiedliche Konzentrationen der Testsubstanz beigegeben und dann Platten gegossen. Die Keimlinge wurden vorsichtig mit einer Pinzette von der MS-Platte, auf der sie gekeimt waren, auf die Belastungsplatten umgesetzt. Anschließend wurden die Platten wieder bei Dauerlicht ( $70 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ),  $23 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Für den Wurzelwachstumsassay wurde vorher die Position der Wurzelspitze markiert.

### 2.6.3 Wurzelwachstumsassay

Nach zwei bzw. vier Tagen nach dem Umsetzen auf Belastungsplatten wurden die Wurzelspitzen erneut markiert. Die Platten mit den Keimlingen wurden fotografiert bzw. eingescannt. Mit Hilfe der Software ImageJ (Version 1.51j8, National Institutes of Health, USA) wurde die Wurzellängen bestimmt.

### 2.6.4 Bestimmung von Chlorophyll- und Carotinoid-Gehalt

Der Chlorophyll- und Carotinoid-Gehalt wurde fünf Tage nach dem Umsetzen auf die Belastungsplatten bestimmt. Hierzu wurden mehrere Keimlinge auf einer Platte gepoolt in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und deren Frischgewicht bestimmt. Anschließend wurden die Proben in flüssigem Stickstoff weggefroren und entweder direkt weiter analysiert oder bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

Für die weitere Analyse wurden die Proben mit  $50 \mu\text{l}$  Methanol und Keramik-Beads ( $\varnothing 2 \text{ mm}$ ) versetzt und im *Tissue Lyser* (Qiagen, Hilden) für 1 min homogenisiert. Auf das Homogenat wurden weitere  $1.150 \mu\text{l}$  Methanol gegeben und diese Probe für mindestens 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Homogenat bei mindestens  $14.000 \text{ rpm}$  bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  für mindestens 4 min abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde in eine Einmal-Küvette überführt und photometrisch vermessen.

Dabei wurden im Photometer die Extinktion bei  $700 \text{ nm}$ ,  $665 \text{ nm}$ ,  $652 \text{ nm}$  und  $470 \text{ nm}$  gemessen. Für die Berechnung der Pigmentkonzentrationen wurde von den Extinktionswerten bei  $665 \text{ nm}$ ,  $652 \text{ nm}$  und  $470 \text{ nm}$  der Wert bei  $700 \text{ nm}$  abgezogen. Diese korrigierten Extinktionswerte wurden für die Berechnung der Chlorophyll a, Chlorophyll b und Carotinoid-Gehälter verwendet. Hierfür wurden folgende Formeln verwendet (Lichtenthaler 1987).

$$c_{\text{Chl } a} = (16,72 \times E_{665} - 19,6 \times E_{652}) \times V$$

$$c_{\text{Chl } b} = (34,09 \times E_{652} - 15,28 \times E_{665}) \times V$$

$$c_{\text{Car}} = \left( \frac{1000 \times E_{470} - 1,63c_{\text{Chl } a} - 104,96 \times c_{\text{Chl } b}}{221} \right) \times V$$

### 2.6.5 *In planta* Bestimmung von Glutathion-Konjugaten

Zur Bestimmung der *in planta* Konjugation von Herbiziden mit Glutathion wurden entsprechende Samen oberflächensterilisiert, auf  $\frac{1}{4}$  MS-Platten ausgebracht und unter Standardbedingungen angezogen. Zehn Tage alte Keimlinge wurden anschließend von den MS-Platten in Flüssigkulturen

überführt und über Nacht inkubiert. Daraufhin wurden die Flüssigkulturen mit den jeweiligen Herbiziden belastet. Nach 24 h wurden die Keimlinge in einem Trennsieb geerntet und zweimal mit bidestilliertem Wasser gewaschen, das Frischgewicht bestimmt und anschließend in flüssigem Stickstoff weggefroren. Die Bestimmung der Konjugatmengen erfolgt mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC). Hierzu wurden die Keimlinge im *Tissue lyser* (Qiagen, Hilden) gemörsert und anschließend in 250 µl 20 % Methanol/Wasser aufgenommen. Nach zweimaliger Präzipitation der Zellbestandteile wurde der Überstand mittels HPLC analysiert.

## 2.7 Analytische Methoden

### 2.7.1 Nicht-enzymatische GSH-Konjugation

Für die Analytik der Glutathion-Konjugate der Herbizide und weiterer GST-Substrate wurden die entsprechenden Konjugate *in vitro* nicht-enzymatisch synthetisiert. Die nicht-enzymatische GSH-Konjugation kann durch basische Reaktionsbedingungen katalysiert werden. Der Reaktionsansatz besteht aus Glutathion und den zu untersuchenden Substraten in einem Gesamtvolumen von 200 µl. Anschließend wurde der pH-Wert der Reaktion durch Zugabe von Tris-Base pH 11 auf pH 9 bis 10 eingestellt. Der Reaktionsansatz wurde bei 37 °C für 24 h inkubiert.

Reaktionskomponenten	Endkonzentration
Glutathion	40 mM
Substrat	20 mM
Tris-Base pH 11	40 % Volumen

### 2.7.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die GST-Substrate und deren GSH-Konjugate, entweder aus *in vitro* Ansätzen oder aus *AtGST*-exprimierenden Hefen isoliert, wurden mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC: *high performance liquid chromatography*) aufgetrennt und quantifiziert. Eine C<sub>18</sub>-Säule (Prontosil 120-5-C18; 150 mm x 4 mm, 5 µM, Bischoff Chromatography, Deutschland) wurde als stationäre Phase verwendet. Als mobile Phase wurde ein Methanol-Gradient in Abhängigkeit der Substanz-Klasse genutzt. Für die Analytik der Diphenylether und deren GS-Konjugate wurde 20 minütiger Lauf verwendet mit einer Flussrate von 1 ml min<sup>-1</sup>.



Zeit [min]	Anteil Laufmittel B [%]
0 – 2	20
2 – 15	100
15 – 18	100
18 – 19	20
19 – 20	20

Die Analytik der Triazin-Herbizide und deren GS-Konjugate erfolgte mit einem 25 minütigem Lauf mit einer Flussrate von 1 ml min<sup>-1</sup>.

Zeit [min]	Anteil Laufmittel B [%]
0 – 2	35
2 – 12	50
12 – 15	100
15 – 20	100
20 – 22	35
22 – 25	35

Unter den verwendeten Parametern konnten die GST-Substrate und deren Konjugate sowohl *in vitro* als auch in den GST-exprimierenden Hefen detektiert werden. Mittels Standardkurven wurde die einzelnen Verbindungen quantifiziert. Hierfür wurden die Daten mittels der Software Chromeleon (Version 6.50), mit der auch die HPLC gesteuert wurde, analysiert und ausgewertet.

Substrat Klasse	GST-Substrat	Retentionszeit Substrat [min]	Retentionszeit Glutathion-Konjugat [min]
Diphenylether-Herbizide	Fluorodifen	14,89	11,67
	Acifluorfen	16,10	11,75
	Fomesafen	14,53	11,64
	Oxyfluorfen	16,31	11,73
	Bifenox	15,40	10,48
	Nitrofen		
	Aclonifen	15,36	11,60
Natürliche Diphenylether	Asterrinsäure	13,05	11,63
	Asterrinsäuremethylester	14,86	11,61
	Pestalotether D	12,52	11,58
	Chloroasterrinsäure	14,83	11,56
	Isochloroasterrinsäure	14,98	11,58
	Pesteinsäure	14,88	11,58
	Geodinhydrat	14,26	11,49
	Isogeodinydrat	14,90	11,55
	Dichloroasterinsäuremethylester	15,11	11,64
	Cyperin	13,32	11,60
	Violaceol I		11,61
	Violaceol II	14,30 / 14,91	11,63
Triazin-Herbizide	Atrazin	16,15	7,75
	Terbuthylazin	16,96	12,25
	Serbuthylazin	16,87	11,01
	Propazin	16,91	11,34
	Cyanazin	12,20	8,59
	Simazin	13,33	4,93

## 2.8 Software, Datenbanken und Internetressourcen

### 2.8.1 Datenbanken für DNA- und Protein-Sequenzen sowie Kristallstruktur

National Center for Biotechnology Information – NCBI

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

The Arabidopsis Information Resource – TAIR

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

Phytozome

<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>

ePlant

<https://bar.utoronto.ca/eplant/>

UniProt

<https://www.uniprot.org/>

Protein Data Bank – RCSB PDB

<https://www.rcsb.org/>

*Saccharomyces* Genome Database

<https://www.yeastgenome.org/>

### 2.8.2 Datenbank für Genexpression

GENEVERIGATOR®

<https://genevestigator.com/>

### 2.8.3 *Arabidopsis* T-DNA-Insertionslinien

European Arabidopsis Stock Centre

<http://arabidopsis.info/>

GABI-KAT

<https://www.gabi-kat.de/>

### 2.8.4 Analyse von DNA- und Protein-Sequenzen sowie phylogenetische Analyse

Gentle, v1.9.4

<http://gentle.magnusmanske.de/>

ClustalOmega

<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

Mega X

<https://www.megasoftware.net/>

2.8.5 Primer-Design

Primer3plus

<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>

Thermo Fisher Scientific - T<sub>m</sub> Calculator

<https://www.thermofisher.com/de/de/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html>

2.8.6 CRISPR gRNA-Design

CHOPCHOP

<http://chopchop.cbu.uib.no/>

2.8.7 Simulierung, Visualisierung und Interaktion von Protein-3-D-Strukturen

Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0 – Phyre<sup>2</sup>

<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>

PyMOL, V 2.5

<https://pymol.org/2/>

UCSF Chimera

<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>

AutoDock Vina

<http://vina.scripps.edu/>

2.8.8 Analyse von MS-Daten

Metlin

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

Pubchem

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

2.8.9 Strukturformeln

ChemSketch

<https://www.acdlabs.com/resources/freeware/chemsketch/index.php>

2.8.10 Daten Analyse und Darstellung

Origin 2020b und 2021b

<https://www.originlab.com/>

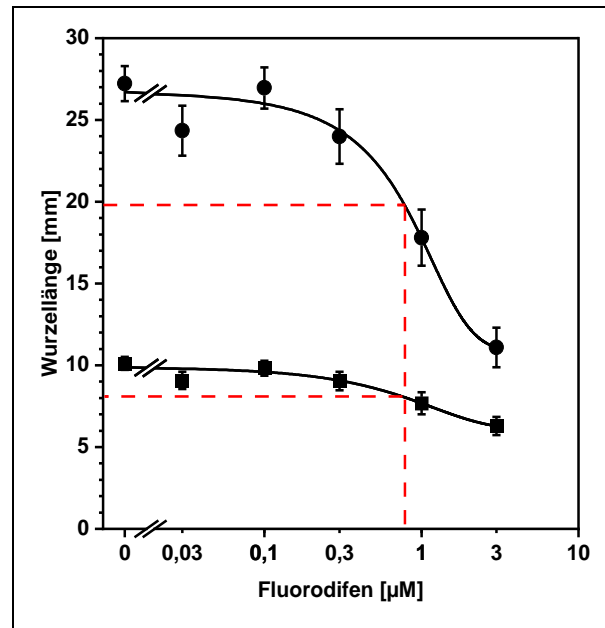
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Diphenylether-Herbizid-Wirkung auf *Arabidopsis thaliana*

Die Diphenylether-Herbizide werden als Vorlaufherbizide auf die Felder ausgebracht. Sie dienen dazu möglichen Beiwuchs, der bereits am auskeimen ist, zu eliminieren (Usui 2001; Vats 2015). Sowohl die physiologische als auch die molekulare Wirkung der Diphenylether-Herbizide auf Pflanzen ist weitestgehend bekannt (Roberts et al. 2007; Duke und Dayan 2011). Sie binden, mit Ausnahme von Aclonifen (Kahlau et al. 2020), in die Bindetasche der Protoporphyrinogen IX Oxidase und inhibieren diese somit (Duke und Dayan 2011). Dadurch kommt es zu einer Akkumulation von Protoporphyrinogen IX, das unter Lichteinfluss Sauerstoffradikale bildet. Diese Sauerstoffradikale reagieren vor allem mit ungesättigten Lipiden und es entsteht eine Kettenreaktion, bei der Lipid-Peroxide in den Zellmembranen und den Membranen der Organellen entstehen und diese dadurch in der Funktion beeinträchtigt werden. Die toxische Wirkung führt zu einem Ausbleichen des grünen Gewebes und zu Nekrosen in diesem Gewebe (Roberts et al. 2007).

Nicht nur die physiologische und die molekulare Wirkung der Diphenylether-Herbizide, sondern auch die Detoxifizierung durch GSTs ist für Fluorodifen und Acifluorfen am besten untersucht. Die aus Mais stammenden GSTs *ZmGSTU1* und *ZmGSTU2* zeigten für Fluorodifen einen hohen Umsatz, während beide für Acifluorfen kaum bis keine Aktivität aufwiesen (Dixon et al. 2003). Auch die aus Sojabohnen stammende *GmGSTU4-4* konjugierte Fluorodifen mit Glutathion (Axarli et al. 2009). Auf Grundlage dieser Daten konnte gezeigt werden, dass durch Mutationen der *GmGSTU4-4 in vitro* die Aktivität der *GmGSTU4-4* gegenüber Fluorodifen abnahm. In meiner Arbeit wollte ich die Wirkung von Diphenylether-Herbiziden und eine mögliche Detoxifizierung über spezifische *AtGSTs* untersuchen.

Dazu wurde zunächst die Wirkung von Fluorodifen auf das Wurzelwachstum von *Arabidopsis thaliana* Keimlingen sowohl nach zwei als auch nach vier Tagen bestimmt. Hierfür wurden *Arabidopsis thaliana* Samen auf MS-Platten ausgebracht und stratifiziert (2.6.1). Anschließend wurden die Platten bei Dauerlicht und 21 °C inkubiert. Nach fünf Tagen wurden die Keimlinge auf frische Platten mit unterschiedlichen Konzentrationen von Fluorodifen transferiert (2.6.2) und der Wurzelzuwachs in den folgenden Tagen bestimmt (2.6.3). Ab einer Konzentration von 1 µM inhibierte Fluorodifen den Wurzelzuwachs um 24 % nach zwei Tagen und nach vier Tagen um 34 % (Abbildung 3-1). Bei einer Konzentration von 3 µM wurde der Wurzelzuwachs bereits nach zweitägiger Belastung um 37 % reduziert.

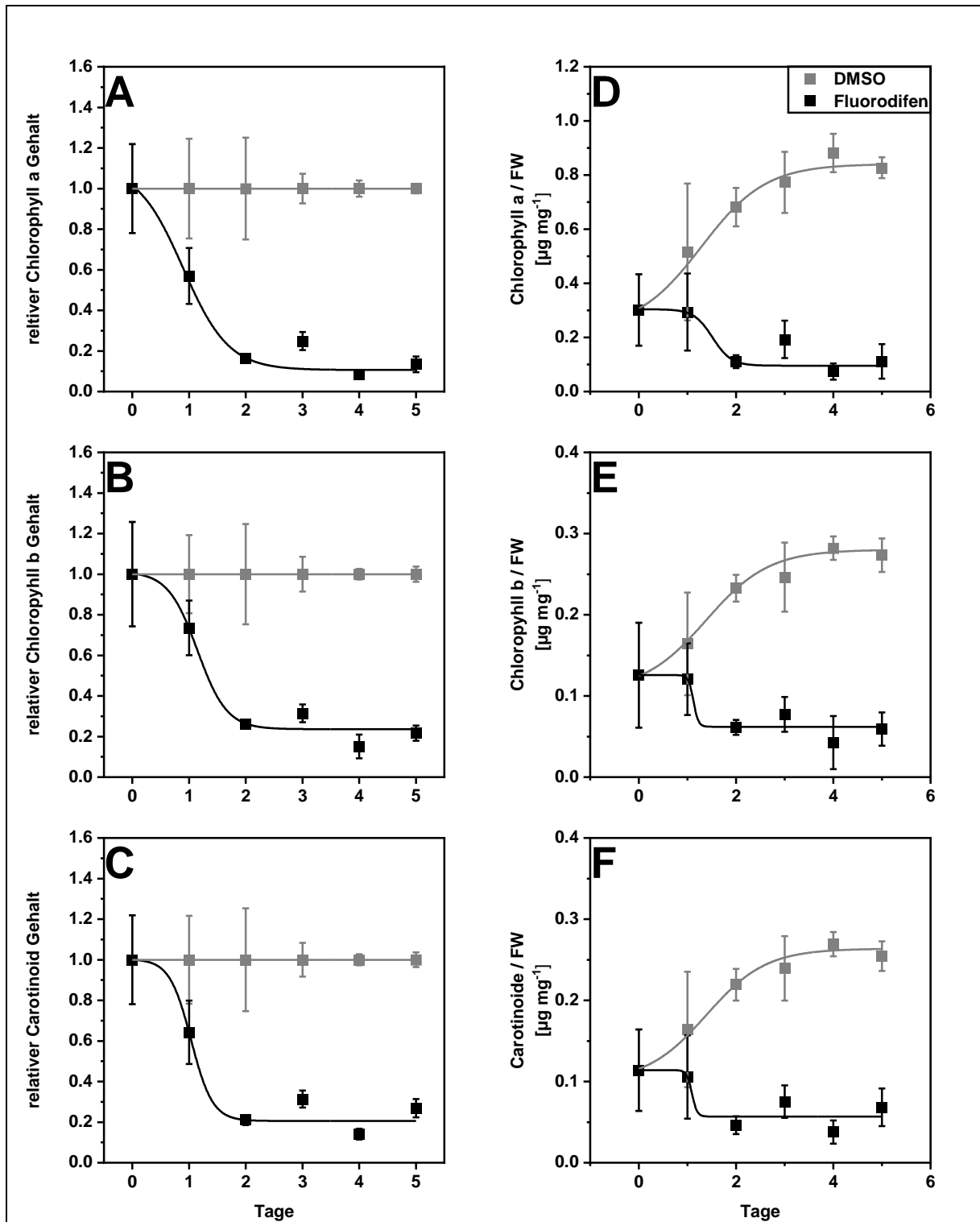


**Abbildung 3-1: Wurzelwachstum von Col-0 Keimlingen nach Fluorodifen-Belastung**

Auf MS-Platten wurden *Arabidopsis thaliana* Samen, wie unter 2.6.1 beschrieben, ausgebracht. Anschließend wurden die Keimlinge mit Fluorodifen belastet (2.6.2) und deren Wurzelwachstum bestimmt (2.6.3). Dargestellt ist der Mittelwert der Länge des Wurzelzuwachses von 40 bis 50 Keimlingen und der Standardfehler des Mittelwerts nach zwei ■ und nach vier Tagen ●.

Da es sich bei den Diphenylether-Herbiziden primär um Inhibitoren der Chlorophyll-Biosynthese handelt, war die Inhibierung des Wurzelwachstums ein sekundärer Effekt. Einerseits führt die Inhibierung der Protoporphyrinogen IX Oxidase dazu, dass die Keimlinge sowohl in der Bildung von Chlorophyll als auch Häm blockiert sind, andererseits führt die Akkumulation von Protoporphyrinogen IX zu Nekrosen des grünen Gewebes (Duke und Dayan 2011). So kommt es zu einer letalen Wirkung, die auch zur Inhibierung des Wurzelwachstums führt.

Die Inhibierung der Biosynthese von Chlorophyll a und Chlorophyll b im zeitlichen Verlauf (Abbildung 3-2) zeigte, dass bei einer Konzentration von 1 µM Fluorodifen bereits am zweiten Belastungstag die relativen Pigmentkonzentrationen abnahmen. In Vorversuchen konnte optisch bereits festgestellt werden, dass 1 µM Fluorodifen eine deutliche Wirkung auf den Chlorophyllgehalt hatte. Auch der physiologische Effekt auf den Wurzelzuwachs zeigte, dass bei dieser Konzentration Effekte auftraten. Neben dem Chlorophyll-Gehalt nahm ebenfalls die Konzentration der Carotinoide am zweiten Tag im Vergleich zum Versuchsbeginn deutlich ab. Hierbei handelte es sich wie beim Wurzelwachstum um einen sekundären Effekt, hervorgerufen durch die Membranschädigung durch die Sauerstoffradikale und der daraus resultierenden Nekrose. Nach dem zweiten Tag nahm der relative Gehalt der Pigmentkonzentrationen nicht weiter ab.



**Abbildung 3-2: Pigmentkonzentrationen von Col-0 Keimlingen nach unterschiedlich langer Fluorodifen-Belastung**

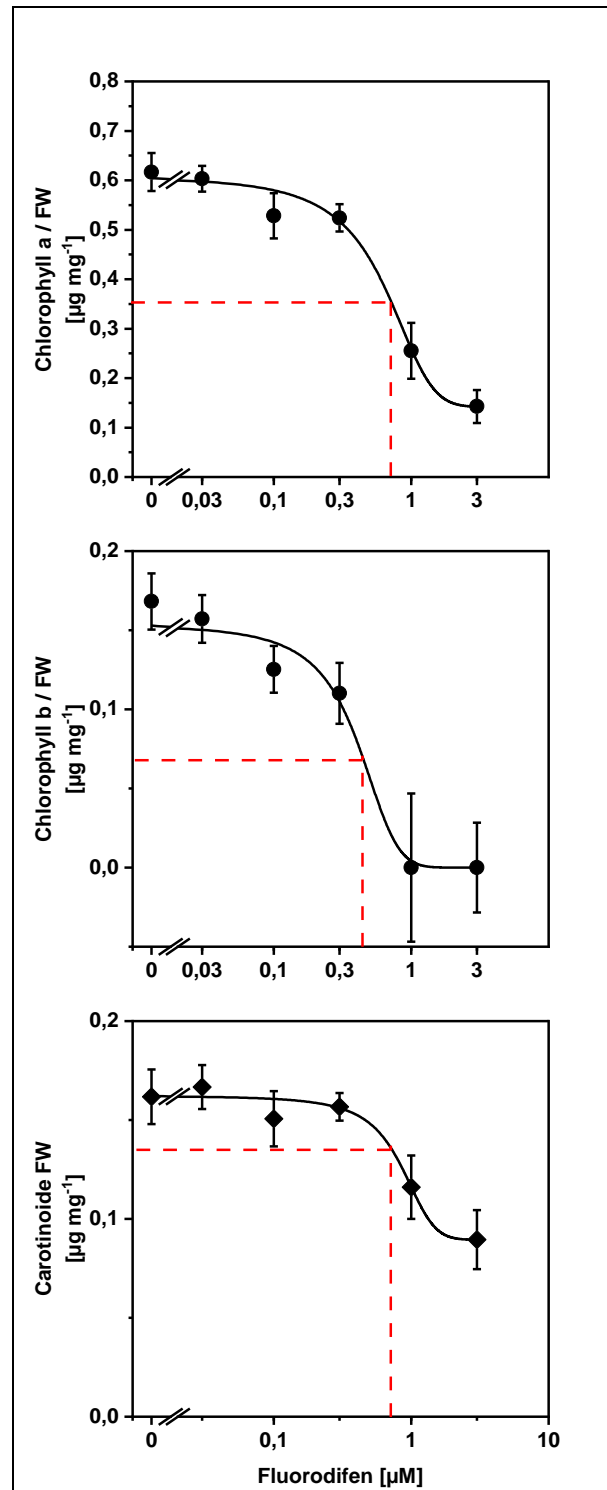
*Arabidopsis thaliana* Samen wurden wie unter 2.6.1 auf MS-Platten ausgebracht und anschließend bei Dauerlicht und 24 °C zur Keimung gebracht. Nach fünf Tage wurden die Keimlinge wie unter 2.6.2 beschrieben auf Herbizid-haltige MS-Platten transferiert. Jeden darauffolgenden Tag wurden Keimlinge von den Platten genommen, deren Pigmentkonzentrationen, wie unter 2.6.4 beschrieben, bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert mit dem Standardfehler von jeweils vier unabhängigen Proben, bestehend aus einem Pool von drei bis vier Keimlingen, für die relativen Pigmentkonzentrationen (A, B und C) bezogen auf die unbelasteten Keimlinge des entsprechenden Tages sowie für die absoluten Pigmentkonzentrationen der Keimlinge (D, E und F).



Die nicht belasteten Pflanzen zeigten über den Testzeitraum einen Anstieg der Pigmentkonzentrationen (Abbildung 3-2 **D**, **E** und **F**). Dieser Entwicklungsprozess wurde durch die Diphenylether-Herbizide maßgeblich inhibiert. Dies legte nahe, dass die Inhibierung der Chlorophyll-Biosynthese unmittelbar nach der Exposition mit dem Herbizid eintritt. Nach vier bis fünf Tagen ohne Belastung mit Fluorodifen zeigen die Keimlinge eine gleichbleibende Konzentration an Pigmenten. Deshalb wurde für weitere Analysen ein Belastungszeitraum von fünf Tagen gewählt, um auch mögliche Effekte bei niedrigeren Konzentrationen zu beobachten und somit die Dosis-abhängige Wirkung von Fluorodifen weiter untersuchen zu können.

Die Dosis-abhängige Wirkung von Fluorodifen (Abbildung 3-3) zeigte ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  nach fünftägiger Belastung eine Reduktion der Chlorophyll a und Chlorophyll b Konzentrationen um 58 % bzw. 100 %. Auch der Carotinoid-Gehalt nahm ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  Fluorodifen gegenüber der Negativkontrolle um 71 % ab. Bei einer Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  Fluorodifen nahm die Konzentration von Chlorophyll a und der Carotinoide im Vergleich zu 1  $\mu\text{M}$  Fluorodifen weiter ab.

Für die Vergleichbarkeit der physiologischen Wirkungen der Diphenylether-Herbizide wurden die konzentrationsabhängigen Effekte auf den Wurzelzuwachs und auf die Pigmentkonzentrationen mit weiteren Verbindungen untersucht. Dabei sollte geklärt werden in welchem Maß sich die Wirkung der Herbizide unterscheidet. Hierfür wurden sowohl Acifluorfen, für das, wie bereits für Fluorodifen, gezeigt wurde, dass GSTs dieses konjugieren können (Skipsey et al. 1997; Andrews et al. 1997; Sugiyama und Sekiya 2005), als auch Nitrofen, welches sich strukturell von Fluorodifen und Acifluorfen durch eine Chloro-Gruppe anstelle der Trifluoromethyl-Gruppe unterscheidet (1.3 Diphenylether-Herbizide und Abbildung 1-14), eingesetzt.



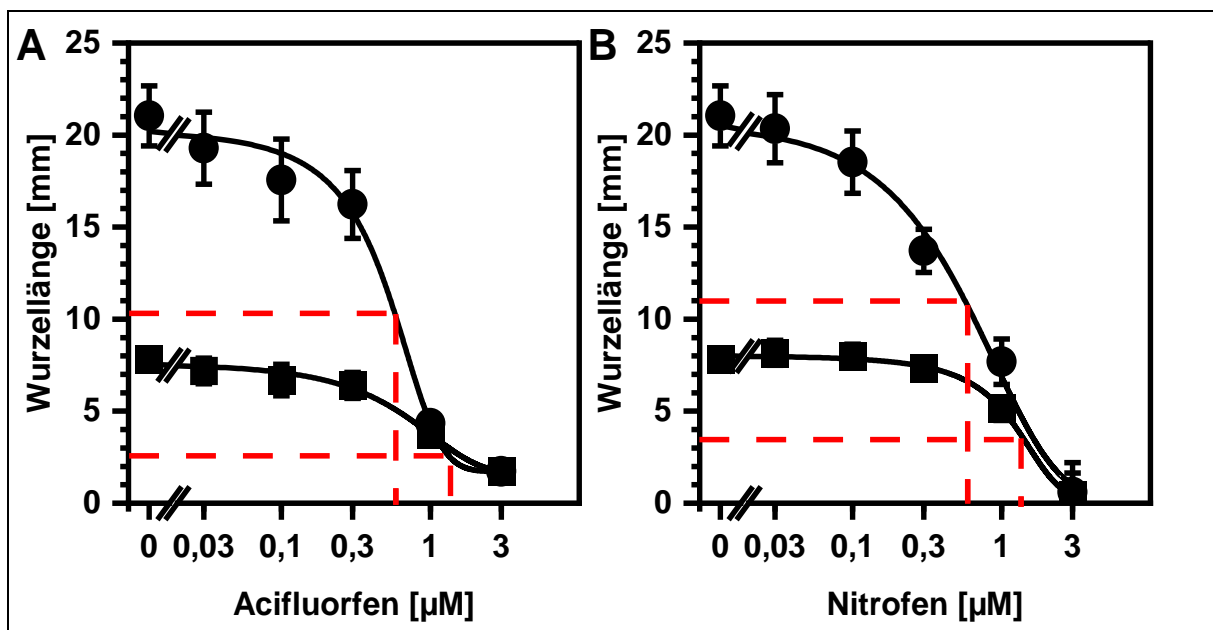
**Abbildung 3-3: Pigmentkonzentration von *Arabidopsis thaliana* Keimlingen nach Fluorodifen-Belastung**

*Arabidopsis thaliana* Samen wurden auf MS-Platten ausgebracht (2.6.1) und anschließend mit unterschiedlichen Fluorodifen-Konzentrationen belastet (2.6.2). Dargestellt ist der Mittelwert und der Standardfehler für vier unabhängige Probenpools bestehend aus je drei bis vier Keimlingen nach fünftägiger Belastung.

Acifluorfen inhibierte den Wurzelzuwachs der *Arabidopsis thaliana* Keimlinge bei einer Konzentration von 1 µM am zweiten Tag mit 52 % deutlich stärker als Fluorodifen bei der gleichen Konzentration (Abbildung 3-4, A). Nach vier Tagen war der weitere Wurzelzuwachs der Keimlinge bei einer

Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  Acifluorfen um 79 % inhibiert. Im Vergleich mit Fluorodifen wies Acifluorfen einen stärkeren inhibierenden Effekt auf den Wurzelzuwachs nach vier Tagen auf.

Der Wurzelwachstum der Keimlinge unter Belastung mit unterschiedlichen Konzentrationen Nitrofen wurde ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  Nitrofen um 66 % inhibiert (Abbildung 3-4, B). Bei der gleichen Konzentration führten auch Fluorodifen und Acifluorfen zu einer nachweisbaren Inhibierung des Wurzelzuwachs. Der Wurzelzuwachs wurde bei einer Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  Nitrofen nach zwei Tagen vollständig gehemmt. Nach viertägiger Belastung mit Nitrofen zeigte sich schon bei einer Konzentration von 0,3  $\mu\text{M}$  ebenfalls eine Abnahme des Wurzelzuwachs um 65 % im Vergleich zur Kontrolle. Weder für Fluorodifen noch für Acifluorfen konnten solche starken Wirkungen beobachtet werden. Somit ist die inhibierende Wirkung auf das Wurzelwachstum von Nitrofen stärker als die von Fluorodifen oder Acifluorfen.

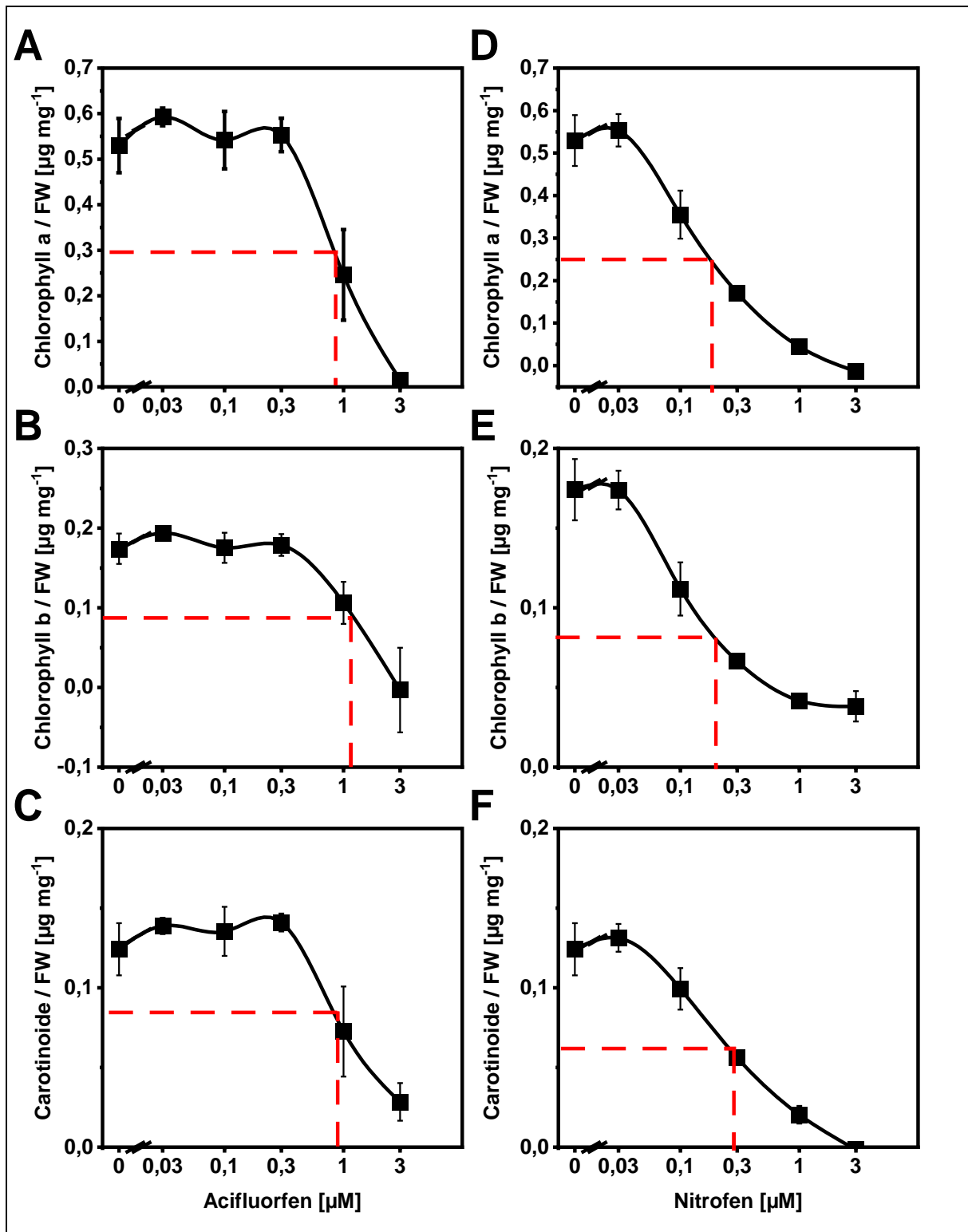


**Abbildung 3-4: Wurzelwachstum von Col-0 Keimlingen nach Belastung mit Acifluorfen und Nitrofen**

Die Bestimmung des Wurzelwachstums wurde durchgeführt wie bereits in Abbildung 3-1 beschrieben. Dargestellt sind der Mittelwert und der Standardfehler für den Wurzelzuwachs von 24 Keimlinge pro (A) Acifluorfen- und (B) Nitrofen-Konzentration, sowie der Wurzelzuwachs nach zwei Tagen ■ und nach vier Tagen ●.

Bei der Bestimmung der Pigmentkonzentration nach Belastung mit Acifluorfen konnte der unterschiedlich starke Effekt der beiden Diphenylether-Herbizide Acifluorfen und Fluorodifen nicht verifiziert werden. Im Gegenteil war die Wirkung von Acifluorfen auf die Pigmentkonzentrationen schwächer als die von Fluorodifen. Bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  Acifluorfen nahm der Gehalt von Chlorophyll a um 54 % und von Chlorophyll b um 39 % ab (Abbildung 3-5, A bis C). Wie zu erwarten sank der Gehalt der beiden Chlorophylle bei einer Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  Acifluorfen weiter. Dabei betrug der Gehalt für Chlorophyll a 3 % und für Chlorophyll b 0 %. Für den Gehalt der Carotinoide

konnte ebenfalls eine Dosis-abhängige Abnahme beobachtet werden, die vermutlich auf die Zellnekrose, ausgelöst durch das zytosolische Protoporphyrinogen IX, zurück zu führen ist.

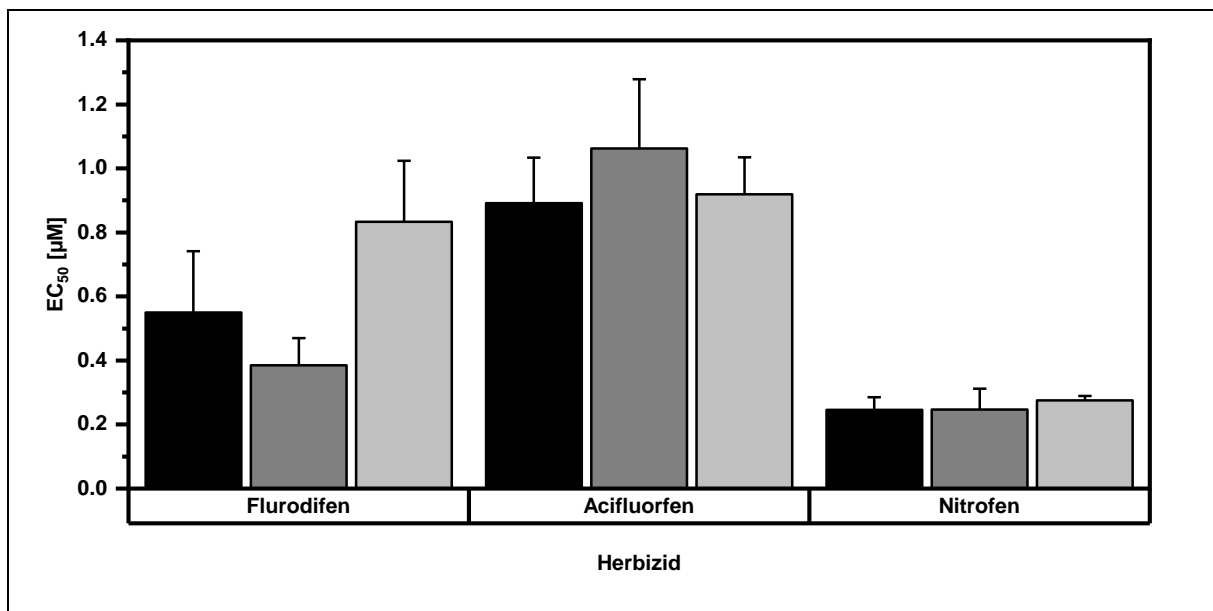


**Abbildung 3-5: Pigmentkonzentration von Arabidopsis thaliana Keimlingen nach Belastung mit Acifluorfen und Nitrofen**

Experimentell wurde vorgegangen wie in Abbildung 3-3. Die Keimlinge wurden jedoch auf (A bis C) Acifluorfen- und (D bis F) Nitrofen-haltige MS-Platten transferiert. Dargestellt ist der Mittelwert der Pigmentkonzentration mit dem Standardfehler für je vier Probenpools à drei bis vier Keimlingen.

Bei der Bestimmung der Pigmentkonzentration nach der Belastung mit Nitrofen zeigte sich eine stärkere inhibierende Wirkung von Nitrofen auf die Keimlinge im Vergleich zu den beiden Diphenylether-Herbiziden Fluorodifen und Acifluorfen. Die Pigmentkonzentration von Chlorophyll a und Chlorophyll b nahm bei einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  Nitrofen deutlich ab (Abbildung 3-5, D bis F). Somit zeigte Nitrofen sowohl auf das Wurzelwachstum als auch auf die Chlorophyll-Biosynthese eine klar inhibierende Wirkung bei einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$ . Weder Fluorodifen noch Acifluorfen zeigten im Vergleich dazu eine inhibierende Wirkung weder auf das Wurzelwachstum noch die Chlorophyll-Biosynthese bei dieser Konzentration.

Für den Vergleich der Wirksamkeit der Diphenylether-Herbizide wurde für jedes Herbizid jeweils der  $\text{IC}_{50}$ -Wert der Konzentrationsabnahme jedes Pigmentes bestimmt (Abbildung 3-6). Die  $\text{IC}_{50}$ -Werte für die Inhibierung der Pigmentbiosynthese lag für Fluorodifen bei Chlorophyll a bei  $550 \pm 190$  nM und für Chlorophyll b bei  $385 \pm 85$  nM. Dem gegenüber hatte Acifluorfen ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert für die Inhibierung der Chlorophyll a-Biosynthese von  $890 \pm 140$  nM und für Chlorophyll b von  $1060 \pm 220$  nM. Mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert für die Inhibierung der Chlorophyll a Biosynthese von  $250 \pm 40$  nM Nitrofen war die Wirkung von Nitrofen im Vergleich zu Fluorodifen und Acifluorfen deutlich stärker (Abbildung 3-6). Für die Chlorophyll b Biosynthese ergab sich ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $250 \pm 70$  nM Nitrofen. Somit wirkte Nitrofen im Vergleich zu den beiden anderen Diphenylether-Herbiziden stärker inhibierend auf die Chlorophyll-Biosynthese.



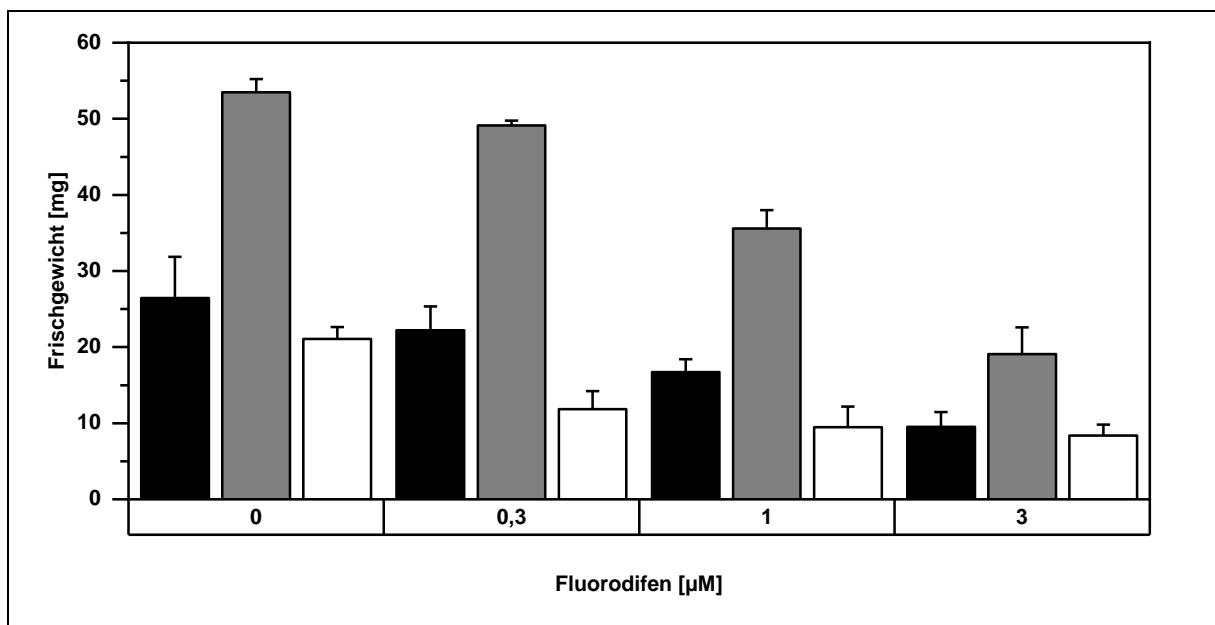
**Abbildung 3-6:  $\text{EC}_{50}$  Werte der Herbizide auf die Pigmentkonzentration**

Dargestellt sind die  $\text{EC}_{50}$ -Werte der drei Herbizide Fluorodifen, Acifluorfen und Nitrofen ermittelt aus den Fit-Kurven der Belastungen für Chlorophyll a (schwarz), Chlorophyll b (grau) und die Carotinoide (hellgrau). Die zugrunde liegenden Daten sind in Abbildung 3-3 und Abbildung 3-5 dargestellt. Der Fit der Kurven wurde als Dosis-Wirkungskurve bestimmt.

Im Vergleich zum Wurzelzuwachs zeigte die Bestimmung der Pigmentkonzentration vergleichbare Ergebnisse der Inhibierung. Da es sich bei den Diphenylether-Herbiziden im Allgemeinen um Inhibitoren der Chlorophyll-Biosynthese handelt, dürfte die Wirkung auf das Wurzelwachstum und auf die Carotinoid-Konzentration ein sekundärer Effekt sein.

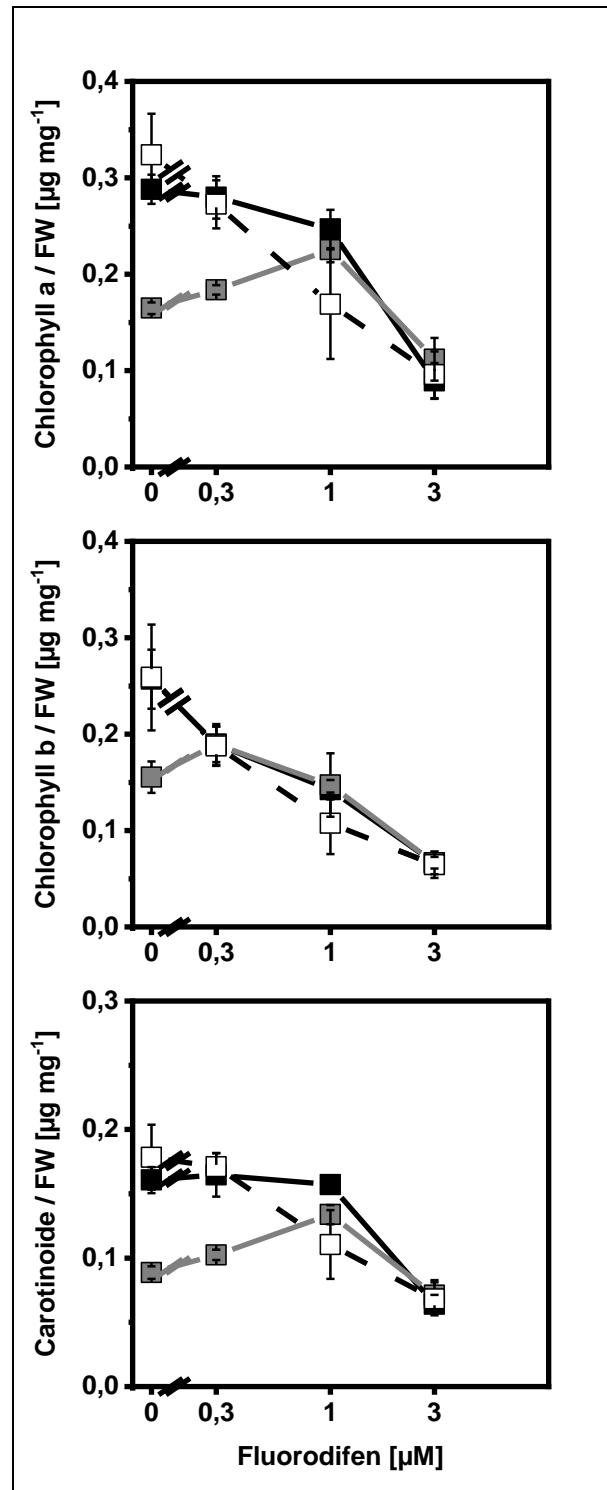
Um die inhibierende Wirkung der Diphenylether-Herbizide auf *Arabidopsis thaliana* genauer zu untersuchen wurden die Pigmentkonzentrationen in Abhängigkeit der Herbizid-Konzentration untersucht. Hierfür wurden drei Akzessionen verwendet. *Arabidopsis thaliana* Akzessionen können sich durch sogenannten Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs: *single nucleotide polymorphism*), oder in der Expression von einzelnen Genen unterscheiden (Atwell et al. 2010). Durch die unterschiedliche Expression von AtGSTs kann die Herbizid-Wirkung der Diphenylether-Herbizide für die unterschiedlichen Akzessionen verschieden ausfallen. Bei der Belastung mit den Diphenylether-Herbiziden und der Bestimmung der Pigmentkonzentrationen zeigten die Keimlinge der getesteten Akzessionen Col-0, Bur-0 und Ler-0 verschiedene Sensitivitäten gegenüber den Herbiziden.

Die Keimlinge der Bur-0 Akzession wiesen im Vergleich zu den beiden anderen Akzessionen ein höheres Frischgewicht sowohl ohne als auch unter Belastung mit Fluorodifen auf. So wiesen die Bur-0 Keimlinge unter Fluorodifen-Belastung stets ein doppelt so hohes Frischgewicht im Vergleich zu den die Col-0 Keimlinge auf (Abbildung 3-7). Zudem war das Frischgewicht der Ler-0 Keimlinge im Vergleich zu den Col-0 Keimlingen etwas verringert.



**Abbildung 3-7: Frischgewicht der mit Fluorodifen belasteten Akzessionen**

Wie in Abbildung 3-3 beschrieben wurden *Arabidopsis thaliana* Keimlinge mit Fluorodifen belastet. Es wurden zusätzlich zu Keimlingen der Akzession Col-0 (schwarze Balken) auch Keimlinge der Akzessionen Bur-0 (graue Balken) und Ler-0 (weiße Balken) belastet. Dargestellt ist das mittlere Frischgewicht der Keimlinge nach der Belastung und der entsprechende Standardfehler von vier Proben à drei bis vier Keimlingen.



**Abbildung 3-8: Pigmentkonzentration nach Fluorodifen-Belastung**

Für die Proben, gezeigt in Abbildung 3-7, wurde die Pigmentkonzentrationen, wie für Abbildung 3-3 beschrieben, bestimmt und auf das Frischgewicht bezogen. Zu sehen ist der Mittelwert der jeweiligen Pigmentkonzentration von je vier Proben à drei bis vier Keimlingen und der Standardfehler. ■ Col-0, ■ Bur-0, □ Ler-0

Die Belastung mit Fluorodifen zeigte, dass die Bur-0 Keimlinge bei den Fluorodifen-Konzentrationen von 0,3 und 1,0 µM eine Zunahme der Pigmentkonzentrationen im Vergleich zur Negativkontrolle aufwiesen (Abbildung 3-8). Diese Zunahme könnte auf eine endogene Kompensation des toxischen Effektes hindeuten. Da nicht nur die Konzentrationen der beiden Chlorophylle a und b anstieg, sondern

auch die Konzentration der Carotinoide, dürfte diese Kompensation nicht ausschließlich auf eine gesteigerte Expression der Protoporphyrinogen IX Oxidase zurückzuführen sein. Weil das Frischgewicht abnahm (Abbildung 3-7), wirkt Fluorodifen bei niedrigen Konzentrationen möglicherweise positiv auf die Keimlingsentwicklung, ohne die Biosynthese der Chlorophylle a und b maßgeblich zu inhibieren. Im Gegensatz zu den Bur-0 Keimlingen nahm die Pigmentkonzentration der belasteten *Ler-0* und *Col-0* Keimlinge mit steigender Fluorodifen-Konzentration ab.

Die Belastungen mit den anderen Diphenylether-Herbiziden zeigten Unterschiede zwischen den einzelnen Akzessionen in Abhängigkeit vom Herbizid. Während die Belastung mit Fomesafen (6 Anhang, Abbildung 6-1, A bis C), Oxyfluorfen (6 Anhang, Abbildung 6-1, D bis F) und Nitrofen (6 Anhang, Abbildung 6-1, G bis I) für alle drei Akzessionen eine Dosis-abhängige Abnahme der Pigmentkonzentrationen zeigte, konnten teilweise Kompensationsreaktionen der Keimlinge bei den Belastungen mit Acifluorfen (6 Anhang, Abbildung 6-2, A bis C), Bifenox (6 Anhang, Abbildung 6-2, D bis F) und Aclonifen (6 Anhang, Abbildung 6-2, G bis I) beobachtet werden. So kam es wie bei Fluorodifen auch bei der Belastung mit Acifluorfen zu einer Erhöhung der Pigmentkonzentrationen der Bur-0 Keimlingen für Chlorophyll a und für die Carotinoide (6 Anhang, Abbildung 6-2, A und C). Dieser Effekt konnte weder für die *Col-0* noch für die *Ler-0* Keimlinge bei der Acifluorfen-Belastung beobachtet werden.

Alle drei Akzessionen zeigten einen Anstieg der Chlorophyll a und Carotinoid-Konzentration bei einer Bifenox-Konzentration von 0,3  $\mu\text{M}$  im Vergleich zur Negativkontrolle (6 Anhang, Abbildung 6-2, D bis F). Für die *Col-0* und *Ler-0* Keimlinge konnte auch eine Zunahme der Chlorophyll b Konzentration bei einer Belastung mit 0,3  $\mu\text{M}$  Bifenox beobachtet werden, während die Chlorophyll b Konzentrationen der Bur-0 Keimlinge bei der verwendeten Herbizid-Konzentration abnahm. Bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  Bifenox zeigten die *Ler-0* Keimlingen eine deutliche Reduktion der Pigmentkonzentrationen im Vergleich zur Negativkontrolle. Es zeigte sich, dass Bifenox auf die *Ler-0* Keimlinge stärker wirkte als auf die beiden anderen Akzessionen und im speziellen wiesen die Bur-0 Keimlinge eine erhöhte Resistenz auf.

Bei der Belastung mit Aclonifen erwiesen sich die *Col-0* Keimlinge als die sensitivsten für das Herbizid (6 Anhang, Abbildung 6-2, G bis I). Während die Konzentration von Chlorophyll b und den Carotinoiden der *Col-0* Keimlingen bei einer Aclonifen-Konzentration von 0,3  $\mu\text{M}$  im Vergleich zur Negativkontrolle anstiegen, sanken die Pigmentkonzentrationen ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  Aclonifen wieder ab. Wie bei der Belastung mit Fluorodifen, Acifluorfen und Bifenox stieg die Konzentration von Chlorophyll a und den Carotinoiden in den Bur-0 Keimlingen bei 0,3  $\mu\text{M}$  Aclonifen gegenüber der Negativkontrolle an. Zudem wiesen die Bur-0 Keimlinge im Vergleich zu den beiden anderen Akzessionen eine geringere Sensitivität gegenüber Aclonifen auf.



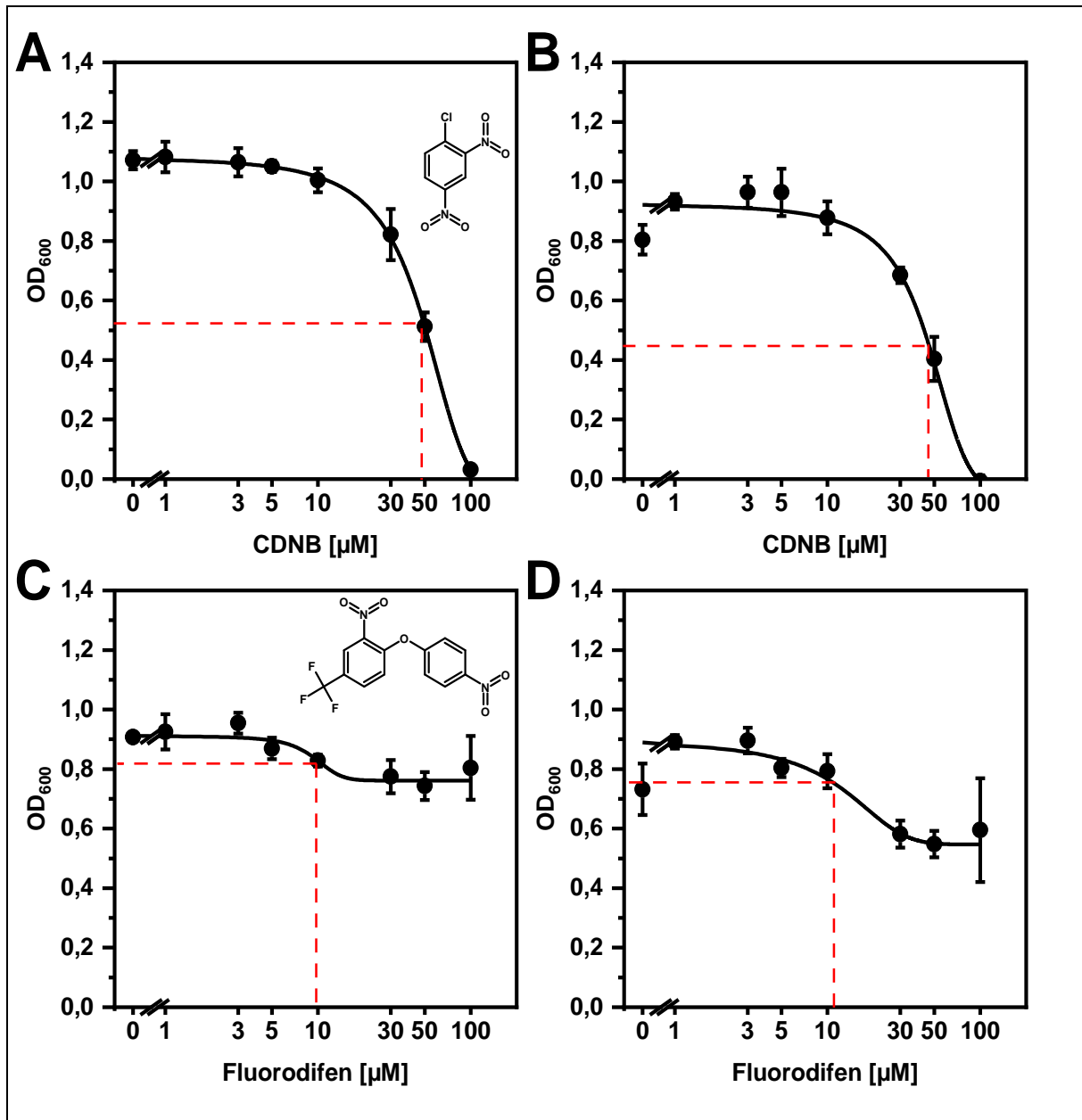
Alle sieben getesteten Diphenylether-Herbizide wirkten inhibierend auf *Arabidopsis thaliana* Keimlinge. In vorherigen Arbeiten wurde gezeigt, dass die Diphenylether durch GSTs mit Glutathion konjugiert werden können (Kowalski 2016). Da es in *Arabidopsis thaliana* 55 GST-Gene gibt, die hohe Redundanzen aufweisen (Dixon et al. 2009; Chen et al. 2012; Krajewski et al. 2013), ist eine *in planta* Identifizierung der gegenüber den Diphenylether-Herbiziden aktiven GSTs schwer möglich. Jedoch können die Gene heterolog in Hefe exprimiert werden und nach Belastung dieser Hefen den Diphenylether-Herbiziden der Umsatz der Herbizide durch die spezifische AtGST analytisch bestimmt werden (Krajewski et al. 2013; Kowalski 2016).

### 3.2 Einfluss der Diphenylether-Herbizid auf das Hefe-Wachstum

Die heterologe Expression der *AtGSTs* in Hefe ermöglicht eine Untersuchung der einzelnen *AtGSTs* auf ihre Substratspezifität und spezifischen Aktivität (Krajewski et al. 2013; Kowalski 2016). Hierzu wurden in vorherigen Arbeiten alle 55 GSTs in einen Hefektor kloniert und diese Plasmide in einem Hefestamm mit multiplen Genveränderungen transformiert (2.4.4 *Saccharomyces cerevisiae*; Kowalski 2016). Diese als genetischen Background dienende Mutante ist weitgehend defizient in der endogenen Konjugation von Substraten mit Glutathion sowie vollständig für den Katabolismus von Glutathion-Konjugaten (Krajewski et al. 2013). Mit analytischer HPLC und Massenspektroskopie konnten die Glutathion-Konjugate nachgewiesen werden und somit die Spezifität einzelner *AtGSTs* bestimmt werden.

In dieser Arbeit wurde der Umsatz von Diphenylethern durch die *AtGSTs* untersucht. Diphenylether sind die am zweithäufigsten vorkommende Grundstruktur für Pharmaka und Agrochemikalien (Chen et al. 2020). Als Herbizide hemmen die meisten Diphenylether die Protoporphyrinogen IX Oxidase (PPO; Roberts et al. 2007; Kahlau et al. 2020). Die PPO katalysiert den letzten gemeinsamen Biosynthese-Schritt von Chlorophyll und Häm (Matringe et al. 1989b; Jacobs et al. 1991). Sie kommt nahezu ubiquitär in allen Organismen vor, so auch in Hefe. Es ist demzufolge möglich, dass durch die Behandlung der Hefen mit den Diphenylether-Herbiziden die endogene PPO der Hefe ebenfalls gehemmt wird und es zu einem Häm-Mangel in den Hefen kommen könnte (Matringe et al. 1989a). Um sicherzustellen, dass die zu untersuchenden Diphenylether-Herbizide keinen Einfluss auf das Wachstum der Hefen bei der Konjugationsanalyse der einzelnen GSTs nahmen, wurden zwei Hefestämme mit unterschiedlichen Konzentrationen der Herbizide belastet. Hierfür wurden beide Stämme, einerseits der Stamm mit dem Leervektor (*eV: empty vector*), andererseits der Stamm, der die *AtGSTU1* exprimiert, über Nacht angezogen. Am nächsten Tag wurden die Hefen in Galaktosehaltiges Medium überführt um die Gen-Expression zu induzieren. Nach fünf Stunden wurden die Kulturen mit unterschiedlichen Konzentrationen der entsprechenden Diphenylether-Herbizide belastet. Das Wachstum wurde nach 16 h durch Messung der Absorption bestimmt (2.5.8.5 Toxizitätsassay).

Als Kontrolle für die Wirkung auf das Hefe-Wachstum diente 2,4-Dinitrochlorbenzol (CDNB). CDNB ist eine Marker-Substanz für GST-Aktivität, die jedoch bei höheren Konzentrationen letal auf Hefen wirkt (Izawa et al. 1995; Collinson und Grant 2003; Krajewski et al. 2013). Sowohl die Belastung der *eV*-Kontrolle, als auch der *AtGSTU1*-exprimierenden Hefe (*AtGSTU1*-Hefe) zeigte einen zytotoxischen Effekt (Abbildung 3-9 A und B). Der  $LD_{50}$ -Wert für die *eV*-Kontrolle betrug  $46,3 \pm 1,0 \mu\text{M}$ , während der Wert für die *AtGSTU1*-Hefe bei  $44,8 \pm 5,2 \mu\text{M}$  lag. Bei der höchsten verwendeten Konzentration von  $100 \mu\text{M}$  wirkte CDNB auf bei Hefestämme letal.



### Abbildung 3-9: Wirkung von CDNB und Fluorodifen auf das Hefe-Wachstum

Die Bestimmung der Wirkung von CDNB und Fluorodifen auf das Wachstum der Hefe-Stämme basierend auf dem Hefe-Stamm  $\Delta gto1$ ,  $\Delta gto2$ ,  $\Delta gto3$ ,  $\Delta tef4$ ,  $\Delta cis2$ ,  $\Delta cpc$  und  $\Delta cpy$  wurde durchgeführt wie unter 2.5.8.5 beschrieben. Verwendet wurden der AtGSTU1-exprimierende Hefestamm sowie die Leervektor-Kontrolle. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Belastungen sowie der entsprechenden Standardfehler für die optische Dichte bei 600 nm. In **A**) ist die Belastung der Leervektor-Kontrolle und in **B**) der AtGSTU1-exprimierenden Hefe mit CDNB gezeigt. In **C**) ist die Belastung der Leervektor-Kontrolle und in **D**) der AtGSTU1-exprimierenden Hefe mit Fluorodifen dargestellt.

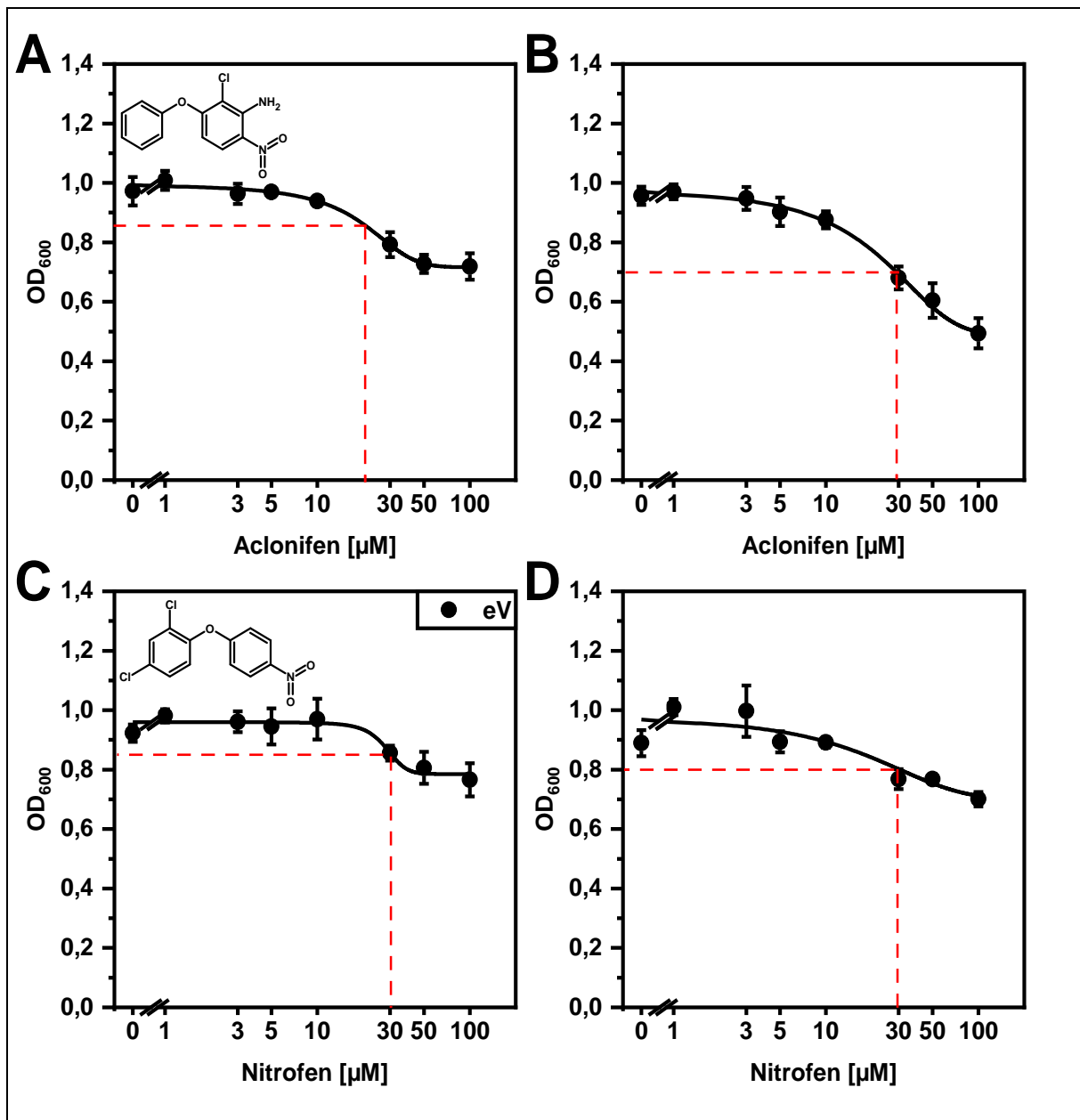
Im Vergleich zu CDNB zeigte die Belastung der Hefen mit Fluorodifen über den getesteten Konzentrationsbereich schwache wachstumsinhibierende Effekte auf die beiden verwendeten Hefestämme (Abbildung 3-9 C und D). Die optische Dichte der *eV*-Kontrolle sank von 0,91 bei der Lösungsmittelkontrolle auf 0,74 bei einer Konzentration von 50 µM Fluorodifen ab, was eine Reduktion von 18 % entsprach. Die Wirkung auf die AtGSTU1-Hefe war vergleichsweise stärker als die Wirkung auf die *eV*-Hefe. Die optische Dichte des AtGSTU1-Stammes sank ab einer Fluorodifen-Konzentration

von 50  $\mu\text{M}$  auf 0,55 ab gegenüber der  $\text{OD}_{600}$  von 0,73 der mit Lösungsmittel behandelten Kultur. Folglich betrug das Wachstum nur noch 75 % des Wachstums der nicht-behandelten Kultur. Der  $\text{EC}_{50}$ -Wert für Fluorodifen betrug für die *eV*-Kontrolle  $9,5 \pm 1,5 \mu\text{M}$  und für die *AtGSTU1*-Hefe  $9,3 \pm 1,5 \mu\text{M}$ . Bei niedrigen Konzentrationen zwischen 1  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$  Fluorodifen wies die *AtGSTU1*-Hefe ein gesteigertes Wachstum auf. Auch die *eV*-Hefe zeigte ein gesteigertes Wachstum bei 5  $\mu\text{M}$  Fluorodifen.

Es wäre anzunehmen, da die *AtGSTs* die Konjugation der Diphenylether mit Glutathion katalysieren, dass die wachstumsinhibierende Wirkung von Fluorodifen in der *AtGSTU1*-Hefe weniger stark ausfällt als in der *eV*-Kontrolle. Eine mögliche Erklärung für die Verringerung des Wachstum könnte darin bestehen, dass die GS-Konjugation der Diphenylether-Herbizide zu Produkten führen, die ihrerseits eine Wirkung haben, da es sich hierbei um eine thiolytische Konjugation handelt (Andrews et al. 1997; Dixon et al. 2003). Bei der thiolytischen Konjugation wird einer der beiden Phenylringe an Glutathion konjugiert, während der zweite Ring als Phenyl-Derivat freigesetzt wird. Dieses Phenyl-Derivat könnte ebenfalls eine Wirkung auf das Hefe-Wachstum haben. Im Fall von Fluorodifen wird *p*-Nitrophenol freigesetzt.

Die Wirkung der anderen Diphenylether-Herbizide auf das Hefe-Wachstum wurden auf die gleiche Weise wie für Fluorodifen untersucht. Für das Herbizid Aclonifen, das sich nicht nur strukturell, sondern auch in seiner molekularen Wirkung von den anderen Diphenylether-Herbiziden unterscheidet (Kahlau et al. 2020), konnte gezeigt werden, dass dieses stärker inhibierend auf das Hefe-Wachstum als Fluorodifen wirkte. Strukturell unterscheidet sich Aclonifen von den restlichen Diphenylether-Herbiziden darin, dass nur einer der beiden Phenylringe substituiert ist (Abbildung 3-10 A, Inlay). Aclonifen wirkt nicht inhibierend auf die Protoporphyrinogen IX Oxidase, sondern auf Solanesyldiphosphatsynthase (1.3 Diphenylether-Herbizide; Kahlau et al. 2020).

Aclonifen hemmte das Hefe-Wachstum der *eV*-Kontrolle bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  um 26 % (Abbildung 3-10 A). Wie für Fluorodifen wirkt auch Aclonifen auf die *AtGSTU1*-Hefe im Vergleich zur *eV*-Kontrolle stärker. Das Wachstum dieses Hefe-Stammes wurde bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  um 52 % gehemmt (Abbildung 3-10 B). Während die nicht-belastete Kultur eine  $\text{OD}_{600}$  von  $0,95 \pm 0,3$  hatte, lag die  $\text{OD}_{600}$  bei der maximal verwendeten Konzentration bei  $0,49 \pm 0,05$ .



**Abbildung 3-10: Wirkung von Aclonifen und Nitrofen auf das Hefe-Wachstum**

Zur Bestimmung der Wirkung von Aclonifen auf das Wachstum der Hefe-Stämme wurde die Analyse wie in Abbildung 3-9 durchgeführt. Anstelle von Fluorodifen wurden die Hefen mit Aclonifen belastet. Dargestellt ist der Mittelwert OD<sub>600</sub> von je drei unabhängigen Belastungen und der Standardfehler. Dargestellt sind in **A**) die Belastung der Leervektor-Kontrolle und in **B**) der AtGSTU1-exprimierenden Hefe mit Aclonifen. In **C**) ist die Belastung der Leervektor-Kontrolle und in **D**) der AtGSTU1-exprimierenden Hefe mit Nitrofen gezeigt.

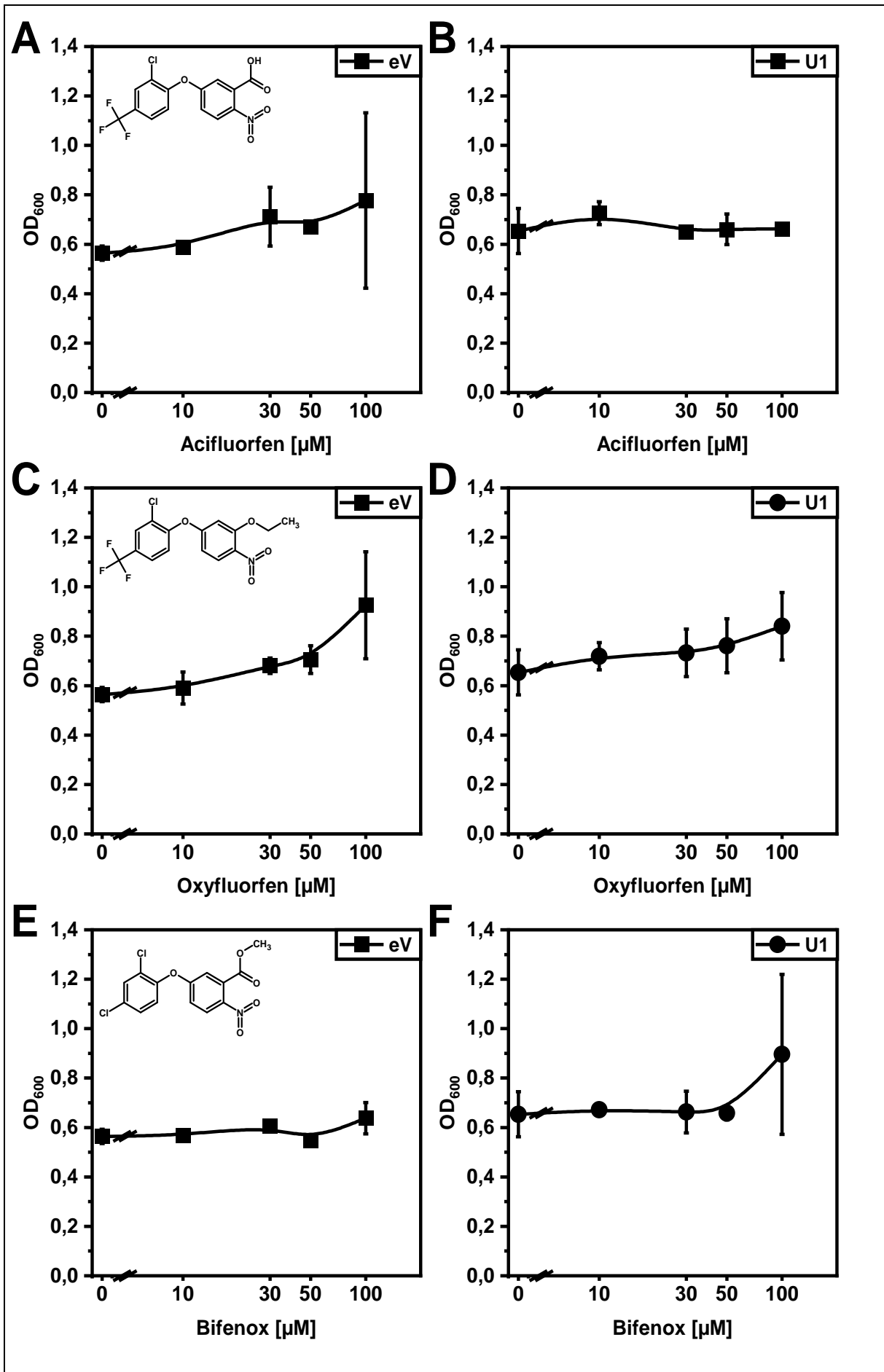
Nitrofen unterscheidet sich von Fluorodifen durch die Substitution der Nitro- und der Trifluoromethyl-Gruppe durch jeweils eine Chloro-Gruppe des ersten Ringes (Abbildung 3-10 C, Inlay). Bei der Wirkungsanalyse von Nitrofen auf das Wachstum der Hefen zeigt sich, wie bereits bei der Belastung mit Fluorodifen, dass bei niedrigen Konzentrationen Nitrofen eine Induktion des Hefe-Wachstums gegenüber der Lösungsmittelkontrolle für die eV-Kontrolle auftrat (Abbildung 3-10 C). Bei einer Konzentration von 30 μM Nitrofen sank die OD<sub>600</sub> der Leervektorkontrolle im Vergleich zur nicht-

belasteten Kultur um 18 %. Bei der höchsten eingesetzten Konzentration wurde das Wachstum der *eV*-Kontrolle um 26 % gehemmt (Abbildung 3-10 C)

Für den *AtGSTU1*-Hefe-Stamm konnte ebenfalls eine Steigerung des Wachstumes bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  und 3  $\mu\text{M}$  Nitrofen beobachtet werden. Bei 1  $\mu\text{M}$  Nitrofen lag die  $\text{OD}_{600}$  dieses Hefe-Stammes bei  $1,01 \pm 0,03$  während die nicht-belastete Kultur eine  $\text{OD}_{600}$  von  $0,89 \pm 0,04$  aufwies (Abbildung 3-10 D). Mit steigender Konzentration trat ein wachstumshemmender Effekt für Nitrofen auf. Wie bereits für die beiden Diphenylether-Herbizide Fluorodifen und Aclonifen war der Effekt auf die *AtGSTU1*-exprimierende Hefe stärker als auf die Leervektorkontrolle. Bei der Maximal-Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  Nitrofen sank die  $\text{OD}_{600}$  auf  $0,70 \pm 0,02$  für die *AtGSTU1*-Hefe (Abbildung 3-10, D).

Alle drei Diphenylether-Herbizide Fluorodifen, Aclonifen und Nitrofen zeigten einen inhibierenden Effekt auf das Wachstum der Hefen. Dabei lag die Inhibierung des Hefe-Wachstums bei 100  $\mu\text{M}$  Herbizide bei 50 % im Vergleich zur Kontrolle. Neben diesen drei Herbiziden wurden in dieser Arbeit weitere Diphenylether-Herbizide untersucht. Um deren inhibitorische Wirkung zu klären, wurden diese Diphenylether-Herbizide in einem Konzentrationsbereich zwischen 10 und 100  $\mu\text{M}$  weiter untersucht.

Acifluorfen und Oxyfluorfen unterscheiden sich strukturell von Fluorodifen durch die Substitution der Nitrogruppe durch eine Chloro-Gruppe am ersten Phenylring (Abbildung 3-11 A und C, Inlays). Im Gegensatz zu Nitrofen tragen beide jedoch eine Trifluoromethyl-Gruppe am ersten Phenylring. Die Belastung der Hefe-Kulturen mit Acifluorfen zeigte keinen inhibitorischen Effekt auf das Wachstum der Hefen (Abbildung 3-11 A und B). Für die *eV*-Kontrolle konnte ein wachstumstimulierender Effekt über den gesamten Konzentrationsbereich beobachtet werden. Auf die *AtGSTU1*-exprimierende Hefe konnte ausschließlich bei einer Acifluorfen-Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  ein erhöhtes Wachstum beobachtet werden (Abbildung 3-11 B).



**Abbildung 3-11: Wirkung von Acifluorfen, Oxyfluorfen und Bifenox auf das Hefe-Wachstum**

Wie für Fluorodifen wurde auch die Analyse für Acifluorfen durchgeführt (Abbildung 3-9), jedoch im Konzentrationsbereich von 10  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$  Acifluorfen. Dargestellt ist der Mittelwert der  $OD_{600}$  von drei unabhängigen Belastungen und der Standardfehler. In **A**) ist die Belastung der Leervektor-Kontrolle und in **B**) der AtGSTU1-exprimierenden Hefe mit Acifluorfen dargestellt. Die Belastung mit Oxyfluorfen der Leervektor Kontrolle ist in **C**) und der AtGSTU1-exprimierenden Hefe ist in **D**) dargestellt. In **E**) ist die Belastung der Leervektor-Kontrolle und in **F**) die Belastung der AtGSTU1-exprimierenden Hefe mit Bifenox dargestellt.

---

Oxyfluorfen hatte ebenfalls keinen inhibierenden Effekt auf das Wachstum der Hefen, sondern wirkte wachstumsstimulierend (Abbildung 3-11 C und D). Die eV-Kontrolle zeigte eine stetige Zunahme des Wachstums bis 100  $\mu\text{M}$ . Bei dieser Konzentration betrug die  $OD_{600}$   $0,92 \pm 0,22$  während die  $OD_{600}$  der nicht-belasteten Kultur bei  $0,56 \pm 0,03$  lag (Abbildung 3-11 C). Die Zunahme der  $OD_{600}$  für die AtGSTU1-sHefe war deutlich geringer. Es konnte für die AtGSTU1-Hefe ein Anstieg um das 1,3-fache beobachtet werden, während das Wachstum der Lösungsmittelkontrolle um den Faktor 1,6 anstieg (Abbildung 3-11 D).

Bifenox (Abbildung 3-11 E, Inlay) ist strukturell ähnlich zu Nitrofen, zeigte aber bei der Wirkungsanalyse einen ähnlichen Effekt wie Acifluorfen und Oxyfluorfen (Abbildung 3-11). Das Wachstum beider Hefestämme wurde bei der höchsten Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  Bifenox stimuliert. Für die eV-Kontrolle stieg die  $OD_{600}$  von  $0,56 \pm 0,03$  für die nicht-belasteten Kulturen auf  $0,63 \pm 0,06$  der mit 100  $\mu\text{M}$  Bifenox belasteten Kulturen (Abbildung 3-11 E). Der Anstieg des Wachstums für die AtGSTU1-Hefe war vergleichsweise stärker. Die nicht-belasteten Kulturen hatten eine  $OD_{600}$  von  $0,65 \pm 0,09$ , während die mit 100  $\mu\text{M}$  Bifenox belasteten Kulturen eine  $OD_{600}$  von  $0,90 \pm 0,32$  hatten (Abbildung 3-11 F). Dies entspricht einem Anstieg um den Faktor 1,4.

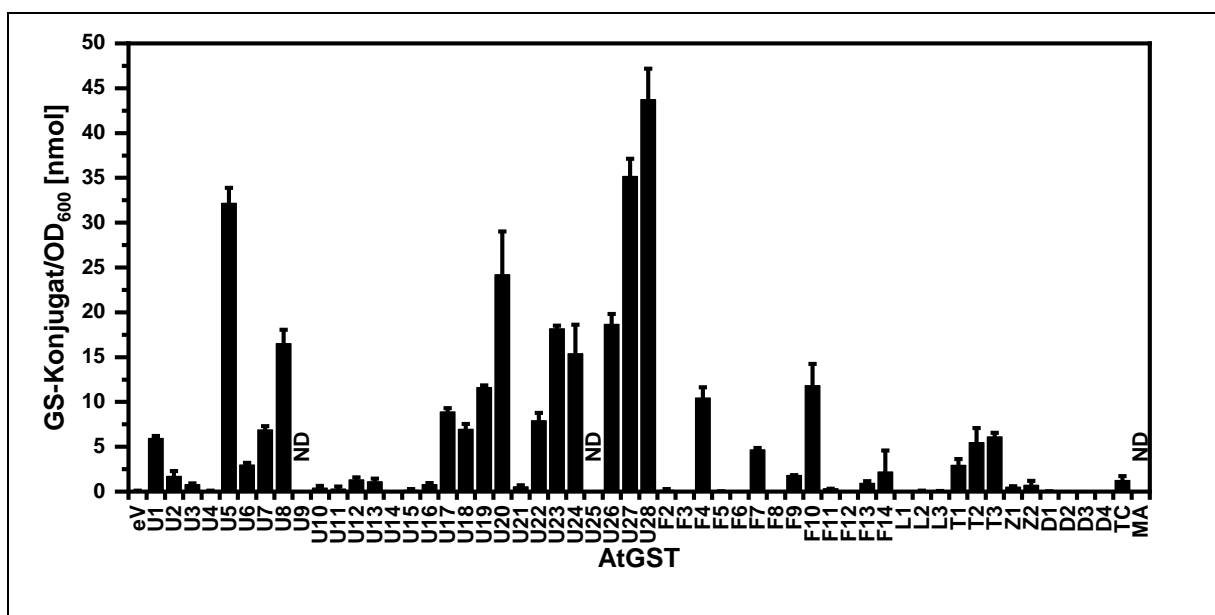
Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass CDNB auf beide Hefestämme Dosis-abhängig wachstumsinhibierend wirkte. Für die Diphenylether konnte teilweise ein schwacher wachstumsinhibierender Effekt beobachtet werden. Dies legte nahe, dass der verwendete Konzentrationsbereich für weitere Analysen geeignet ist.



### 3.3 GS-Konjugation von Herbiziden durch AtGSTs in Hefe

In vorherigen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden (Krajewski et al. 2013), dass die in Hefe exprimierten AtGSTs sowohl Marker-Substanzen als auch Herbizide konjugieren (Wünschmann et al. 2010; Krajewski et al. 2013; Kowalski 2016). Mit diesem AtGST-Hefe-System konnte bereits gezeigt werden, in welchen Mengen CDNB und 4-Chlor-7-Nitrobenzofuranan (NBD-Cl) umgesetzt werden (Krajewski et al. 2013). Weiterhin konnte eine Substratspezifität für die Triazin-Herbizide der AtGSTU5, AtGSTU18 und AtGSTU21 bestimmt werden (Kowalski 2016).

Im Zuge dieser Arbeit wurde die Aktivität der AtGSTs gegenüber CDNB erneut überprüft. Dies diente dazu, eine Vergleichbarkeit der AtGST-Aktivität zu erhalten. Hierfür wurden die AtGST-exprimierenden Hefen über Nacht angezogen und anschließend mit 5  $\mu$ M CDNB belastet. Im Gegensatz zu vorherigen Arbeiten wurden die Hefen erst nach 24 h geerntet und die Konjugatmenge bestimmt (Krajewski et al. 2013), da der Belastungszeitraum der Hefen mit den Diphenylether-Herbizide, nach der Analyse der zeitabhängigen Konjugation, ebenfalls 24 h betrug.



**Abbildung 3-12: CDNB-Konjugation durch heterolog exprimierte AtGSTs in Hefe**

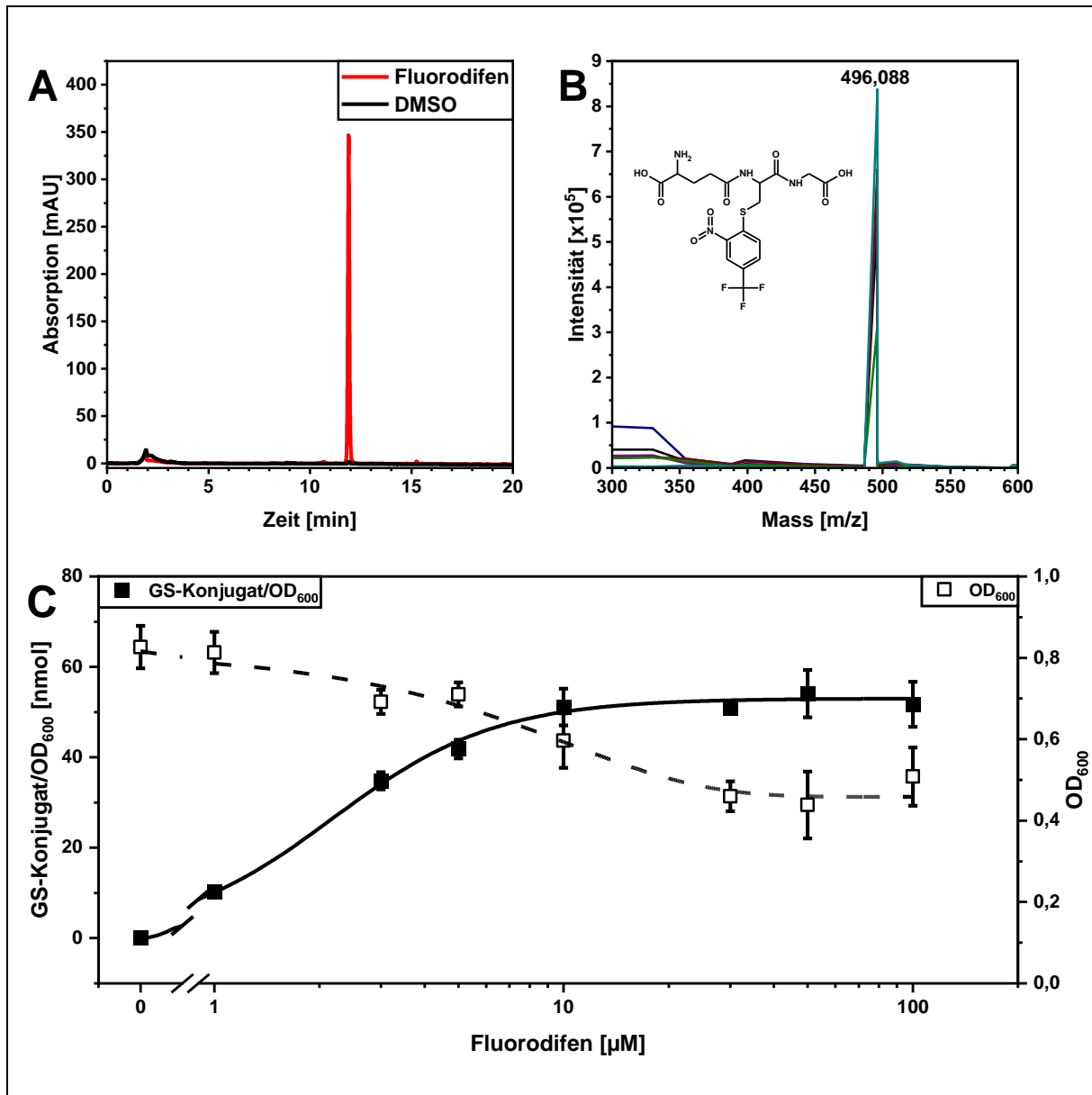
Die 55 AtGST-exprimierenden Hefen wurde, wie unter 2.5.8.1 angezogen, und mit 5  $\mu$ M CDNB nach 2.5.8.2 belastet. Anschließend wurden die Hefe-Kulturen geerntet (2.5.8.3) und die Metabolite extrahiert (2.5.8.4) Dargestellt ist der Mittelwert der mittels HPLC bestimmten Konjugatmenge (2.7.2) von drei unabhängigen Belastungen und deren Standardfehler bezogen auf die jeweilige OD<sub>600</sub> der Hefe-Kultur.

Die Analyse der Konjugation von CDNB durch die AtGSTs (Abbildung 3-12) ergab im Vergleich zu vorherigen Arbeiten eine jeweils erhöhte Menge an DNB-Glutathion-Konjugat. Jedoch ist das Profil der Konjugatmenge vergleichbar mit den bisherigen Ergebnissen (Krajewski et al. 2013). Die erhöhte Menge an Konjugat lässt sich durch die länger Belastungszeit erklären. Somit konnte die generelle Aktivität aller AtGSTs erneut verifiziert werden.

### 3.3.1 Fluorodifen

Durch die Analyse der Wirkung der Diphenylether-Herbizide auf das Wachstum der Hefen konnte ein Konzentrationsbereich festgelegt werden, in dem es zu keinem wachstumsinhibierenden Effekt auf die Hefen kam. Neben dem Wachstums-inhibierenden Effekt war es ebenfalls nötig festzulegen, welche Konzentration der Herbizide eingesetzt werden muss, um mögliche Glutathion-Konjugate zu identifizieren. Um die Konjugatmenge zu bestimmen, war es weiterhin erforderlich für die HPLC-Analyse die Retentionszeit des Konjugates zu bestimmen. In Vorversuchen konnte *in vitro* gezeigt werden, dass das Glutathion-Konjugat von Fluorodifen bei 12 min eluiert. Es wurde die *AtGSTU28*-Hefe, die sich in Vorversuchen als hoch aktiv gegenüber Fluorodifen zeigte, mit dem Diphenylether-Herbizid belastet und anschließend geerntet (2.5.8.3). Mittels HPLC konnte das Phenyl-Glutathion-Konjugat identifiziert werden und mittels präparativer HPLC aufgereinigt werden (Abbildung 3-13). Zur Verifizierung, dass es sich bei dem Konjugat um das erwartete Produkt handelt, wurde die aufgereinigte Fraktion mittels LC-MS analysiert. Die erwartete Masse des Phenyl-Glutathion-Konjugates von Fluorodifen betrug  $m/z = 496,087$  u. In den aufgereinigten Proben konnte eine Masse von  $m/z = 496,088$  detektiert werden (Abbildung 3-13 B).

Mit diesen analytischen Parametern konnte eine Herbizid-Konzentration bestimmt werden, bei der große Mengen Phenyl-Glutathion-Konjugat nachgewiesen werden konnten. Die bereits verwendete *AtGSTU28*-Hefe wurde hierfür mit unterschiedlichen Konzentrationen des Diphenylether-Herbizid Fluorodifen belastet und anschließend analysiert. Diese Analyse zeigte einen Dosis-abhängigen Anstieg des Phenyl-Glutathion-Konjugates (Abbildung 3-13 C). Bei einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  wurde die maximale Konjugat-Konzentration erreicht. Die Korrelation der  $\text{OD}_{600}$  der belasteten Hefe-Kultur zeigte, wie bereits bei der Wirkungsanalyse, einen Dosis-abhängige Abnahme des Hefe-Wachstums. Um den wachstumsinhibierenden Effekt bei weiteren Versuchen zu minimieren und gleichzeitig eine möglichst hohe Konjugatmenge zu generieren, wurden diese Versuche mit einer Diphenylether-Herbizid-Konzentration von  $5 \mu\text{M}$  durchgeführt.

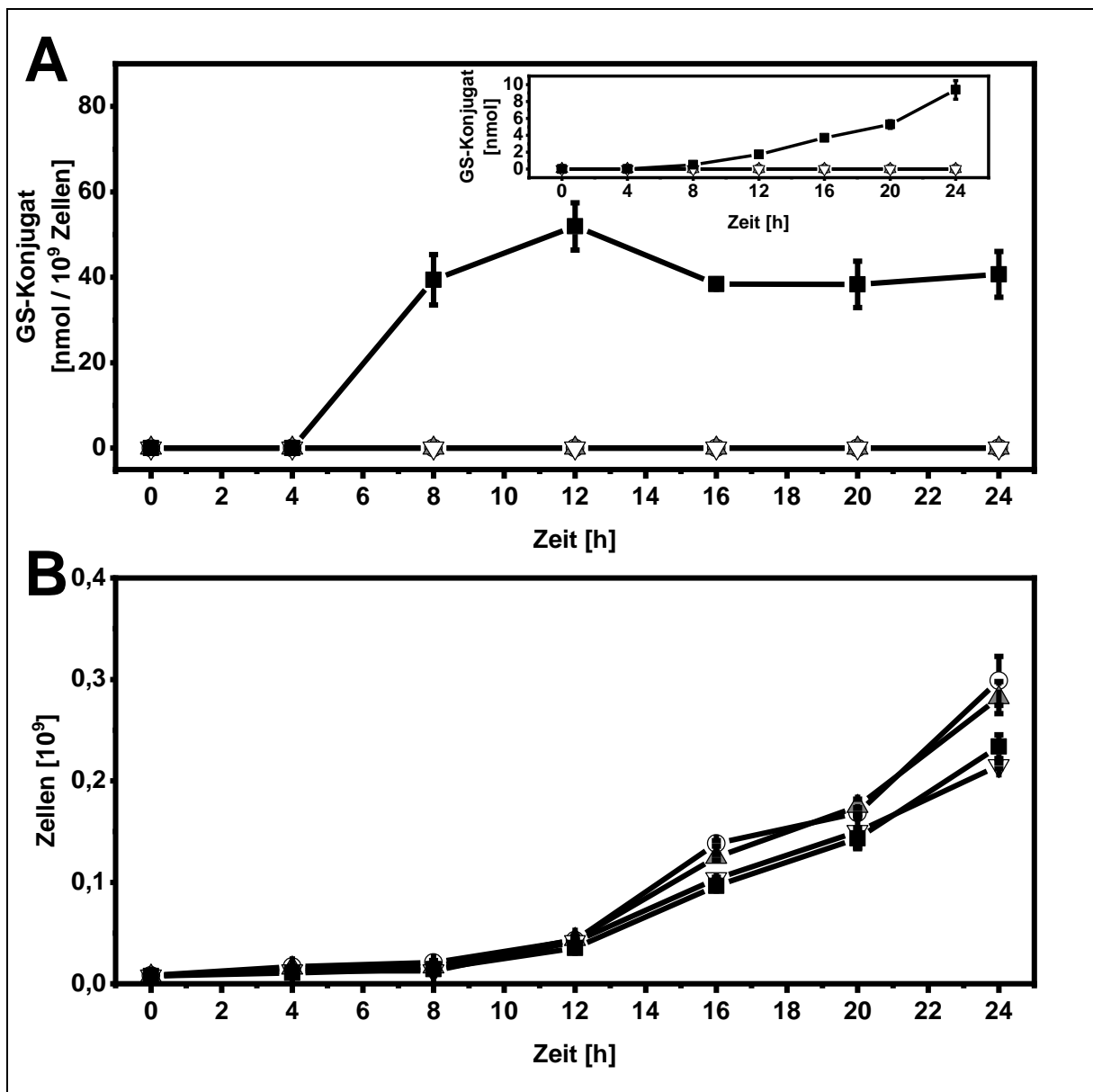


### Abbildung 3-13: Analytik GST exprimierender Hefen nach Belastung mit Fluorodifen

Die AtGSTU28-exprimierende Hefen wurden, wie unter 2.5.8.1 beschrieben, kultiviert und anschließend mit Fluorodifen, wie unter 2.5.8.2 beschrieben, belastet. Nach der Metabolit-Extraktion (2.5.8.4) wurde der Extrakt mittels HPLC analysiert. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 325 nm (2.7.2). Für das Konjugat konnte eine Retentionszeit von 11,67 min bestimmt werden (2.7.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie). Dargestellt ist ein repräsentatives Chromatogramm für das GSH-Konjugat von Fluorodifen (A). Das Konjugat wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt und das Isolat mittels Massenspektroskopie analysiert. Für das Phenyl-Glutathion-Konjugat wurde eine Masse von 496,088 berechnet  $[M-H]^-$ , die auch detektiert wurde. Es wurden sechs unabhängige Belastungen der AtGSTU28-Hefe (B). Gezeigt werden die gemessenen Intensitäten der für die sechs Kulturen. Für die Bestimmung der optimalen Belastungskonzentration wurden ebenfalls die AtGSTU28-Hefen angezogen (2.5.8.1) und mit unterschiedlichen Fluorodifen-Konzentrationen belastet (2.5.8.2). Anschließend wurde die OD<sub>600</sub> bestimmt. Dargestellt ist die relative OD<sub>600</sub> bezogen auf die nicht-belastete Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 1,6. Zudem wurde die Menge des Phenyl-Glutathion-Konjugates bestimmt. Je Konzentration wurde vier unabhängige Kulturen belastet. Dargestellt ist der Mittelwert der Konjugatmenge und der OD<sub>600</sub> sowie der jeweilige Standardfehler (C).

Um die optimale Belastungszeit für die Hefen mit Fluorodifen zu bestimmen, wurde eine Zeitreihe durchgeführt, bei der alle 4 h Proben genommen wurden. Als Hefestämme wurden sowohl der

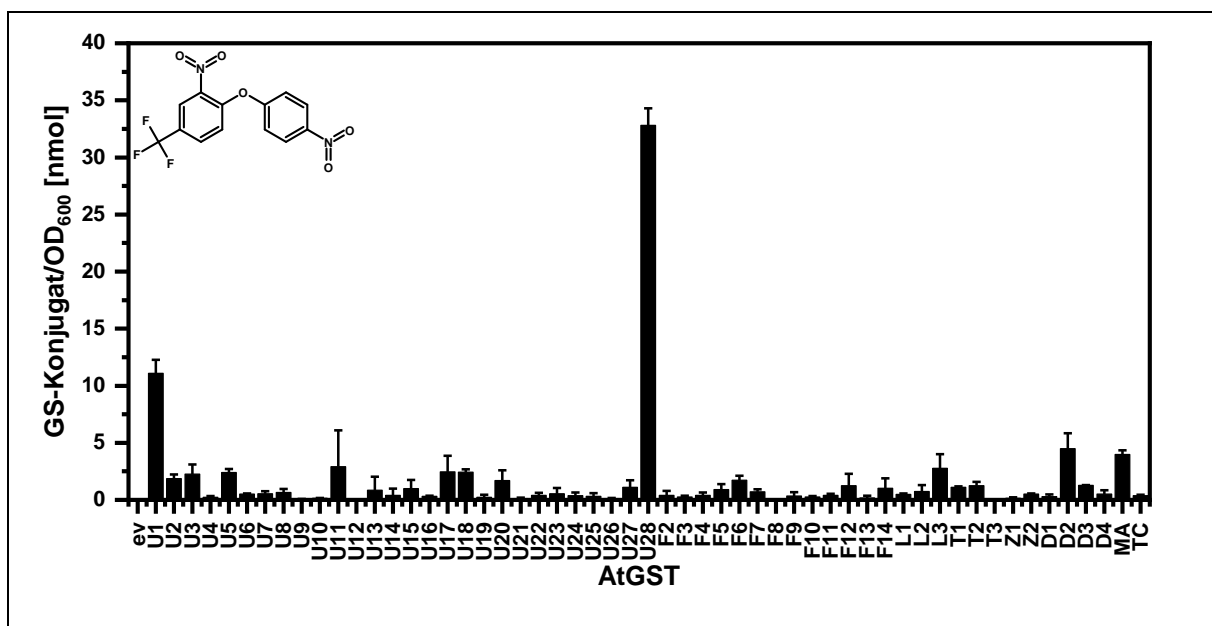
*eV*-tragende als auch der *AtGSTU1*-Stamm verwendet. Je Stamm und Messpunkt wurden drei Kulturen mit 0,1 % DMSO belastet und fünf Kulturen mit 5  $\mu$ M Fluorodifen belastet. Weder für beide Stämme, behandelt mit DMSO, noch für den *eV*-Stamm, belastet mit Fluorodifen, konnte über den Messzeitraum ein GS-Fluorodifen-Konjugat nachgewiesen werden (Abbildung 3-14 A). Für den *AtGSTU1*-Hefestamm konnte nach 8 h das GS-Konjugat detektiert werden. Mit zunehmender Zeit konnte relativ zur Zellzahl gleichbleibende Mengen des Konjugat bestimmt werden. Jedoch zeigten alle Belastungen im zeitlichen Verlauf eine Zunahme der Zellzahl (Abbildung 3-14 B). Ohne die Normalisierung auf die Zellzahl ist ersichtlich, dass mit zunehmender Zeit mehr Konjugat in einer Probe detektiert werden konnte (Abbildung 3-14 A, Inlay). Für weitere Versuche wurde eine Belastungszeit von 24 h verwendet, da es zeitlich zu einer Akkumulation des Konjugat kommt. Vom experimentellen Ablauf war es sinnvoll am Folgetag der Belastung die Kulturen zu ernten.



**Abbildung 3-14: Zeit-abhängige Konjugation von Fluorodifen durch die AtGSTU1**

Die beiden verwendeten Hefestämme wurden, wie unter 2.5.8.1 beschrieben, kultiviert. Verwendet wurden der Leervektor-tragende (eV) und der AtGSTU1-exprimierende Hefestamm. Von jedem Stamm wurden entsprechende Kulturen entweder mit Fluorodifen oder mit DMSO belastet (2.5.8.2). Nach der Belastung wurden alle 4 h unabhängige Kulturen geerntet und deren  $OD_{600}$  bestimmt. Nach der Extraktion der Metabolite wurde der Extrakt mittels HPLC auf das Glutathion-Konjugat von Fluorodifen hin analysiert (2.7.2). Dargestellt ist in (A) die auf die Zellzahl normalisierte GS-Konjugatmenge, im (Inlay) die nicht normalisierte GS-Konjugatmenge und in (B) die mittlere Zellzahl für ■ U1 + Fluorodifen, U1 + DMSO, eV+ Fluorodifen und eV + DMSO. Für die Belastung mit Fluorodifen wurden je Zeitpunkt und Stamm fünf Kulturen belastet, während drei Kulturen je Zeitpunkt und Stamm mit DMSO belastet wurden.

Für die Bestimmung der Konjugationmenge der AtGSTs, exprimiert in Hefe, von Fluorodifen wurden die zuvor etablierten Bedingungen verwendet. Das heißt, die Hefe-Kulturen wurden mit  $5 \mu\text{M}$  des Herbizides belastet und nach 24 h die Phenyl-Glutathion-Konjugatmenge mittels analytischer HPLC bei einer Retentionszeit von 12 min bestimmt. Bei diesen Analysen konnte gezeigt werden, dass die AtGSTU28 die höchste Aktivität gegenüber Fluorodifen aufwies (Abbildung 3-15). Die Sequenzhomologie der AtGSTU28 beträgt gegenüber der AtGSTU27 47,75 % und gegenüber der AtGSTU26 53,21 %. Mit 62,39 % weist die AtGSTU28 die höchste Homologie mit der AtGSTU25 auf. Alle drei AtGSTs zeigten keine Aktivität gegenüber Fluorodifen.

**Abbildung 3-15: Fluorodifen-Konjugation durch heterolog exprimierte AtGSTs in Hefe**

Die 55 AtGST-exprimierenden Hefen wurde, wie unter 2.5.8.1 angezogen, und mit  $5 \mu\text{M}$  Fluorodifen nach 2.5.8.2 belastet. Anschließend wurden die Hefe-Kulturen geerntet (2.5.8.3) und die Metabolite extrahiert (2.5.8.4). Dargestellt ist der Mittelwert der mittels HPLC bestimmten Konjugatmenge (2.7.2) von drei unabhängigen Belastungen und deren Standardfehler bezogen auf die jeweilige  $OD_{600}$  der Hefe-Kultur.

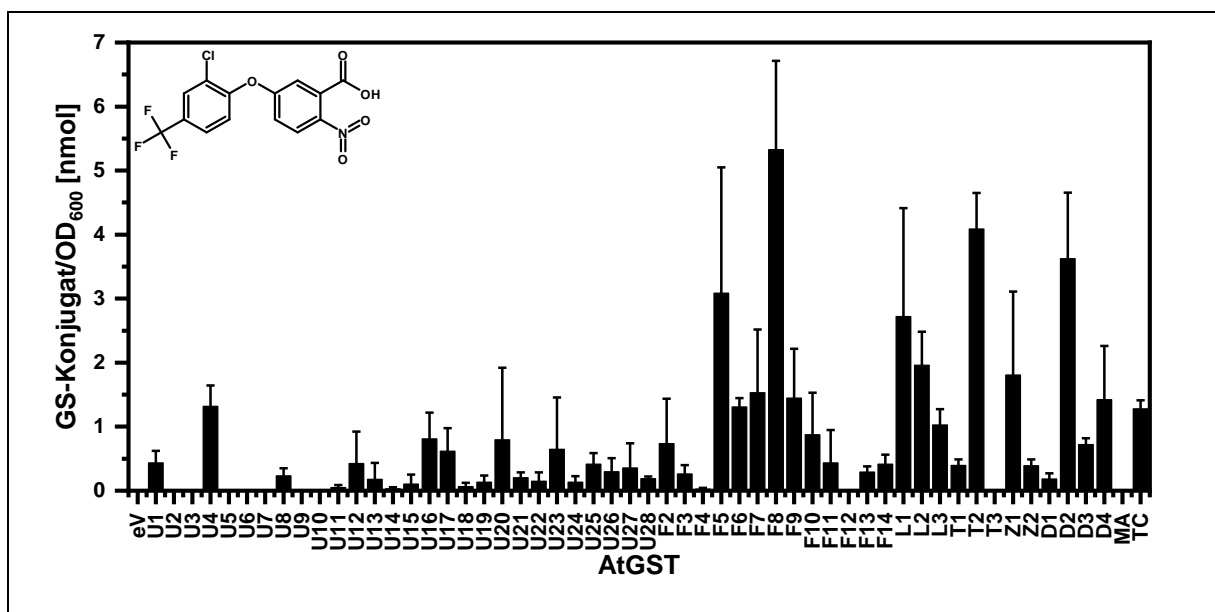
Die zweit-aktivste AtGST war die AtGSTU1 mit einer Konjugatmenge von  $11,1 \pm 1,2$  nmol. Im Vergleich haben die AtGSTU1 und die AtGSTU28 eine Proteinhomologie von 38,64 %. Mit AtGSTU2 bis AtGSTU7 weist die AtGSTU1 eine hohe Proteinhomologie (81,7 bis 55,8 %) auf und bildet mit diesen eine Gen-Cluster auf dem zweiten Chromosom. Jedoch konjugierten diese sechs AtGSTs Fluorodifen mit

Glutathion nur im geringen Maß. Auf Grund der hohen Strukturähnlichkeit und der damit verbundenen Redundanz wäre eine ähnliche Aktivität zu erwarten. In vorherigen Arbeiten konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass Proteine mit hoher Homologie unterschiedlich Substrate diskriminieren können (Kowalski 2016).

Zur Vergleichbarkeit der Aktivität der AtGST gegenüber den weiteren Diphenylether-Herbiziden wurden die Hefe-Kulturen ebenfalls mit einer Herbizid-Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  belastet. Durch diese Messungen sollte ein Aktivitätsprofil generiert werden, das Gemeinsamkeiten und auch Unterschiede der einzelnen AtGSTs aufzeigen sollte.

### 3.3.2 Acifluorfen

Die Bestimmung der intrazellulären Menge des Glutathion-Konjugates von Acifluorfen zeigte, dass im Gegensatz zu Fluorodifen die GSTUs eine geringe Rolle spielten. Vor allem die GSTF8 und GSTF5 zeigten mit  $5,3 \pm 1,4$  und  $3,1 \pm 1,9$  nmol hohe Umsatzraten. Auch die AtGSTL1 ( $2,7 \pm 1,6$  nmol) und AtGSTT2 ( $4,1 \pm 0,6$  nmol) sowie die AtDHAR2 ( $3,6 \pm 1,0$ ) zeigten vergleichbare Konjugatmengen (Abbildung 3-16). Die Klassen AtGSTL, AtGSTT und AtDHAR sind bisher nicht bekannt, dass diese Xenobiotika am aktivsten umsetzen. Vielmehr sind die AtGSTU- und AtGSTF-Klasse bekannt dafür, dass Proteine dieser Klassen aktiv bei der Konjugation von Xenobiotika sind (Wagner et al. 2002; Krajewski et al. 2013). Für die anderen Klassen wird eher eine endogene Aktivität vermutet (Dixon und Edwards 2009; Mashiyama et al. 2014).

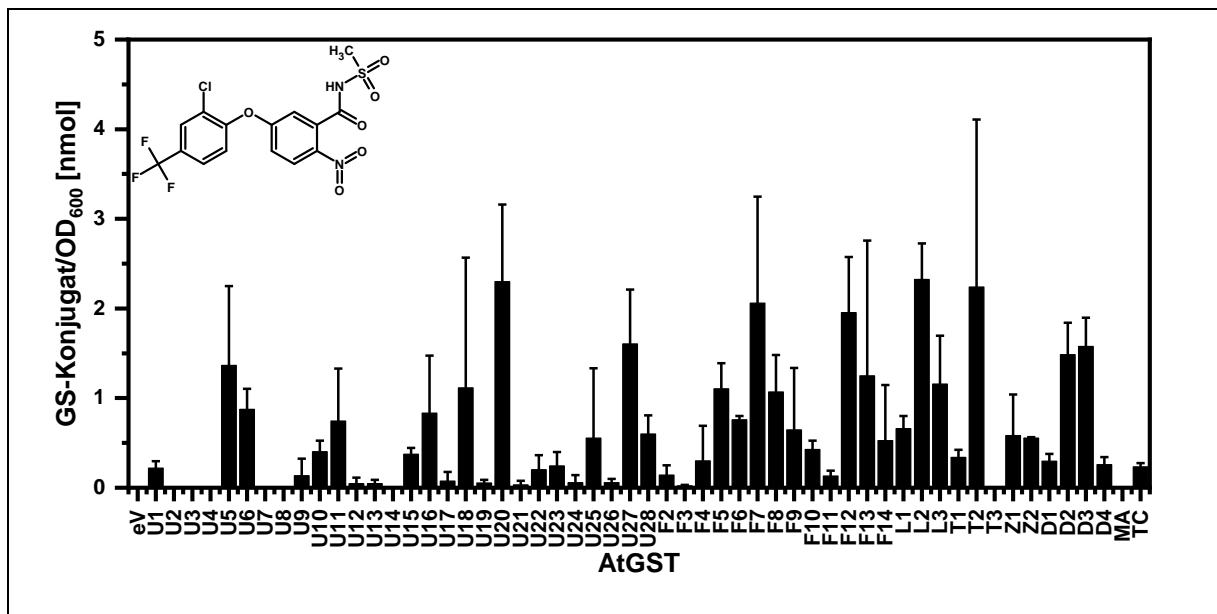


**Abbildung 3-16: Acifluorfen-Konjugation durch heterolog exprimierte AtGSTs in Hefe**

Anstelle von Fluorodifen (Abbildung 3-15) wurden die 55 AtGST-exprimierenden Hefen mit 5  $\mu\text{M}$  Acifluorfen belastet. Dargestellt ist wie in Abbildung 3-15 der Mittelwert der Konjugatmenge bezogen auf die OD<sub>600</sub> der Hefekultur und der Standardfehler für das Phenyl-Glutathion-Konjugat von Acifluorfen.

### 3.3.3 Fomesafen

Die Aktivität der AtGSTs gegenüber Fomesafen unterschied sich deutlich von der AtGST-Aktivität gegenüber den beiden anderen Diphenylether-Herbizide Fluorodifen und Acifluorfen (Abbildung 3-17). Während Fluorodifen bevorzugt durch die Tau-Klasse umgesetzt wurde und Acifluorfen von der Phi-Klasse favorisiert mit Glutathion konjugiert wurde, gab es keinen klaren klassenspezifischen Trend für Fomesafen. Zudem bilden die AtGSTs nur geringe Mengen des Glutathion-Konjugat als für Fluorodifen oder Acifluorfen. Zu ähnlichen Ergebnissen sind bereits *in vitro* Analysen von GST-Protein Extrakten aus Sojabohne gekommen (Skipsey et al. 1997; Andrews et al. 1997).

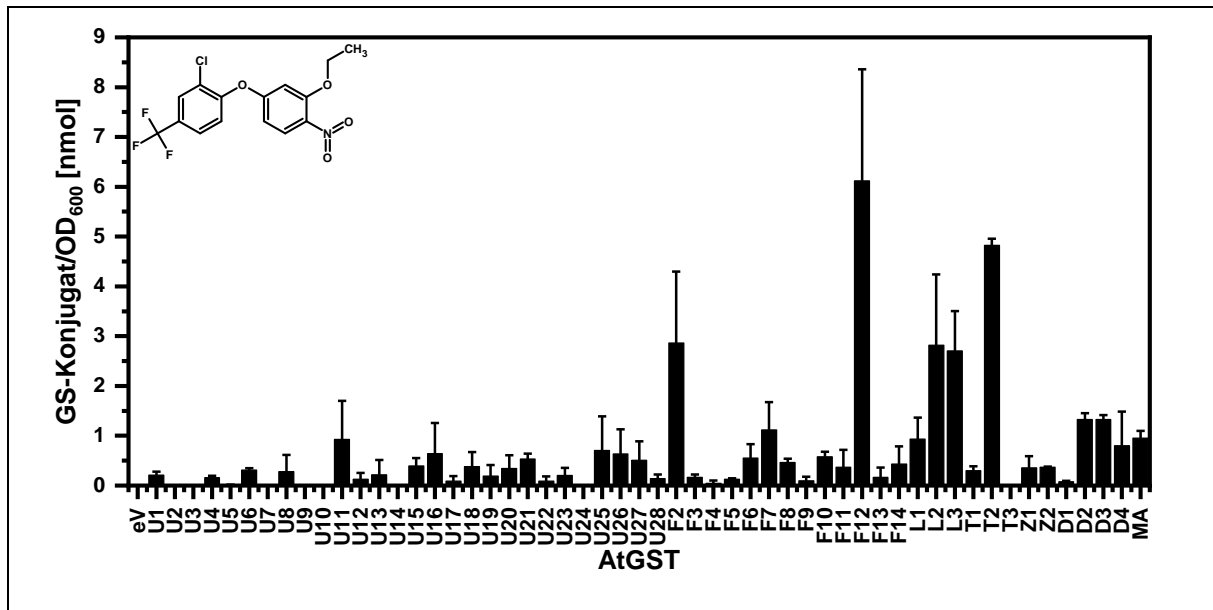


**Abbildung 3-17: Fomesafen-Konjugation durch heterolog exprimierte AtGSTs in Hefe**

Die 55 AtGST-exprimierenden Hefe-Stämme wurden wie in Abbildung 3-15 beschrieben mit Fomesafen anstelle von Fluorodifen belastet und analysiert. Dargestellt ist ebenfalls der Mittelwert der Konjugatmenge bezogen auf die jeweilige OD<sub>600</sub> und der entsprechende Standardfehler von drei unabhängigen Belastungen.

### 3.3.4 Oxyfluorfen

Das Diphenylether-Herbizid Oxyfluorfen wurde, wie auch Acifluorfen, hauptsächlich durch die AtGSTs der Phi-Klasse konjugiert. Hauptsächlich wurde Oxyfluorfen durch die GSTF12 ( $6,1 \pm 2,2$  nmol) und GSTF2 ( $2,9 \pm 1,4$  nmol) sowie durch die GSTT2 ( $4,8 \pm 0,1$  nmol) umgesetzt (Abbildung 3-18).



**Abbildung 3-18: Oxyfluorfen-Konjugation durch heterolog exprimierte AtGSTs in Hefe**

Anstelle von Fluorodifen wurden die 55 AtGST-exprimierenden Hefen mit Oxyfluorfen, wie in Abbildung 3-15 für Fluorodifen beschrieben, belastet. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte der Konjugatmenge von drei unabhängigen Belastungen bezogen auf die OD<sub>600</sub> und der entsprechende Standardfehler.

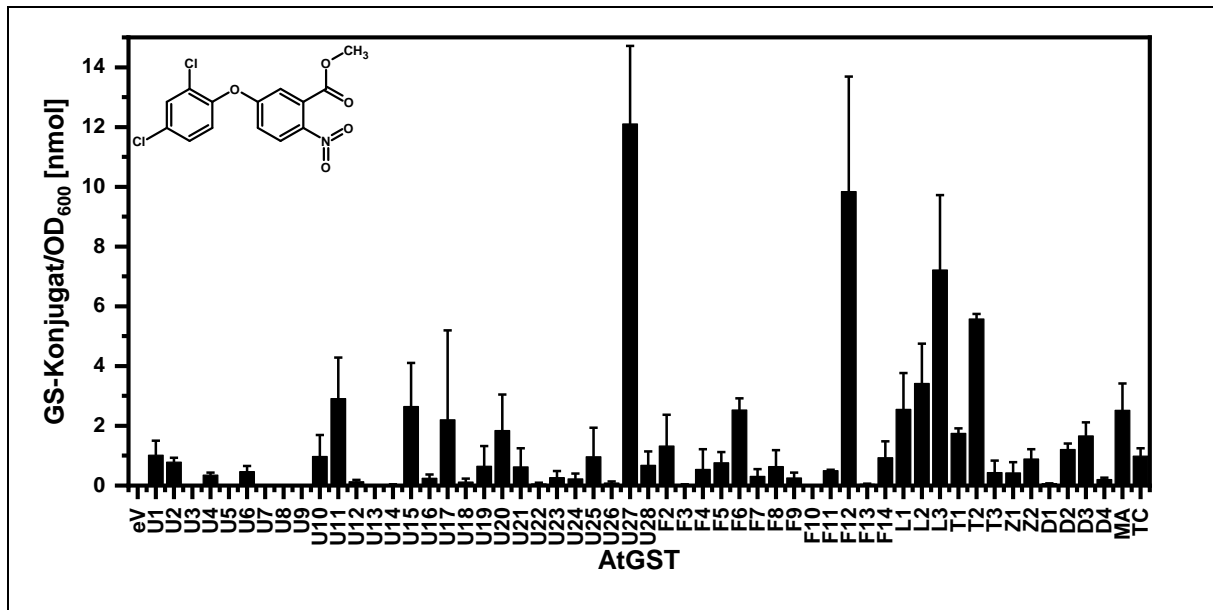
Strukturell unterscheidet sich Fluorodifen im ersten Phenylring von den anderen drei Herbiziden Acifluorfen, Fomesafen und Oxyfluorfen, durch eine Nitrogruppe anstelle einer Chlorgruppe. Es konnte gezeigt werden, dass die thiolytische Glutathion-Konjugation von Acifluorfen und Fomesafen am zweiten Phenylring erfolgt, während Glutathion Fluorodifen thiolytische am ersten Phenylring (Abbildung 1-15) konjugiert (Andrews et al. 1997; Dixon et al. 2003). Dieser strukturelle Unterschied könnte für die divergierende Substratspezifität verantwortlich sein.

Bei den drei Diphenylether-Herbizide Acifluorfen, Fomesafen und Oxyfluorfen war die AtGSTT2 eine der aktivsten GSTs. Zudem zeigte auch die AtGSTL2 eine Konjugation für diese drei Diphenylether-Herbizide. Die beiden Herbizide Bifenox und Nitrofen unterscheiden sich von den dreien durch die Substitution der Trifluoromethyl-Gruppe durch eine Chlorgruppe. Um eine mögliche Strukturspezifität feststellen zu können, wurde die Konjugation der beiden Herbizide getestet.

### 3.3.5 Bifenox

Gegenüber Bifenox zeigte die AtGSTU27 die höchste Aktivität (Abbildung 3-19). Es wurden  $12,1 \pm 2,6$  nmol Konjugat durch die AtGSTU27 gebildet. Die zweithöchste Aktivität zeigte die AtGSTF12 mit  $9,8 \pm 3,8$  nmol Phenyl-Glutathion-Konjugat. Im Gegensatz zu den vorherigen Herbiziden, wurde Bifenox stark durch die AtGSTL3, anstatt der AtGSTL2, umgesetzt. Es konnte eine Konjugatmenge von  $7,2 \pm 2,5$  nmol detektiert werden. Jedoch war weiterhin auch die AtGSTT2 für Bifenox aktiv.



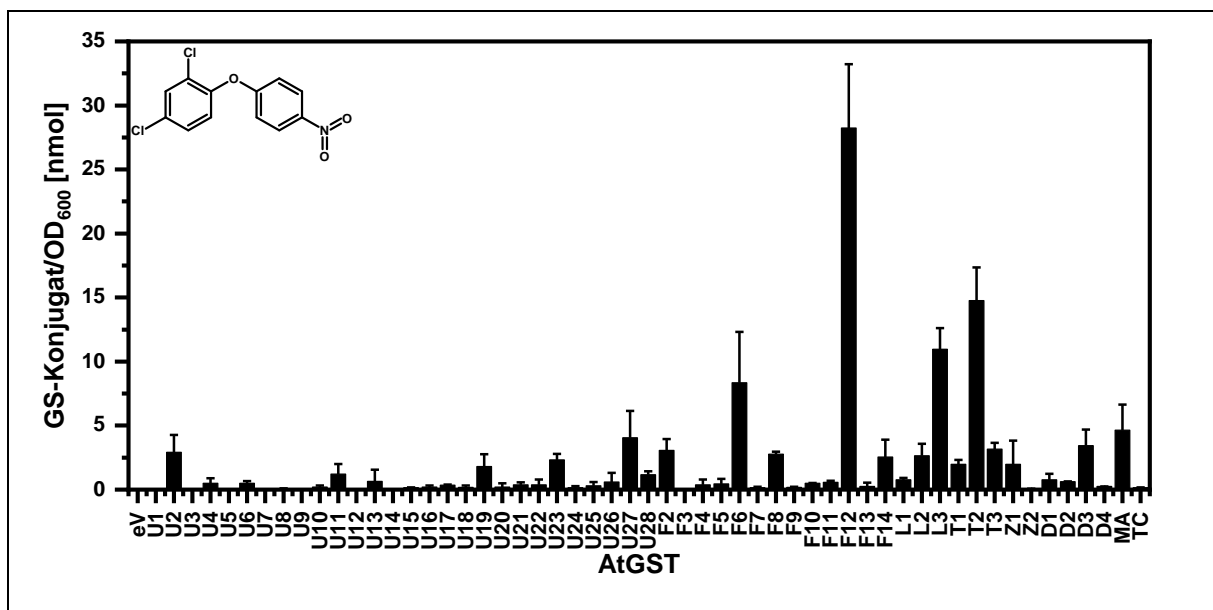


**Abbildung 3-19: Bifenox-Konjugation durch heterolog exprimierte AtGSTs in Hefe**

Die 55 AtGST-exprimierenden Hefen wurden mit Bifenox anstelle von Fluorodifen, wie in Abbildung 3-15 beschrieben, belastet. Dargestellt ist der Mittelwert der Konjugat-Menge bezogen auf die OD<sub>600</sub> der Hefekultur von drei unabhängigen Kulturen und der entsprechende Standardfehler.

### 3.3.6 Nitrofen

Nitrofen wurde im Gegensatz zu Bifenox nur in geringen Mengen durch die AtGSTUs umgesetzt. Jedoch wurde Nitrofen wie Bifenox durch die AtGSTF12 ( $28,2 \pm 4,9$  nmol), AtGSTL3 ( $11,0 \pm 1,6$  nmol) und AtGSTT2 ( $14,7 \pm 26$  nmol) konjugiert. Beide Diphenylether-Herbizide unterscheiden sich von den vorherig getesteten Herbiziden durch die Substitution der Trifluoromethyl-Gruppe durch eine Chlorgruppe.



**Abbildung 3-20: Nitrofen-Konjugation durch heterolog exprimierte AtGSTs in Hefe**

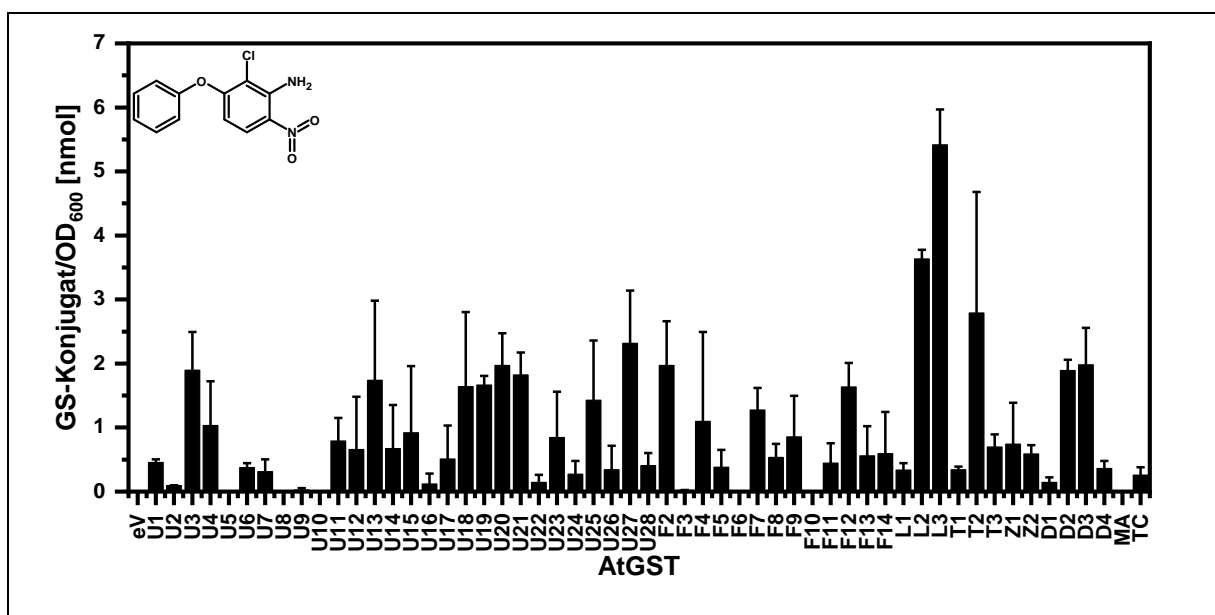
Anstelle von Fluorodifen (Abbildung 3-15) wurden die 55 AtGST-exprimierenden Hefen mit Nitrofen belastet. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der Konjugat-Menge bezogen auf die OD<sub>600</sub> der Hefe Kultur und der Standardfehler von drei unabhängigen Belastungen.

Somit ergab sich, dass die AtGSTL3 für die Diphenylether mit dem dichlorierten Phenylring aktiv war, während die Herbizide mit dem monochlorierten Trifluoromethyl-Phenylring bevorzugt durch die AtGSTL2 konjugiert wurden. Zudem war die AtGSTT2 für die Herbizide mit einem oder zwei Chlor-Substituenten am ersten Phenylring aktiv. Für Fluorodifen, das einen Nitro-Substituenten am ersten Phenylring trägt, zeigte die AtGSTT2 jedoch kaum Aktivität.

## 3.3.7 Aclonifen

Aclonifen weist in zweierlei Hinsicht Unterschiede gegenüber den anderen Diphenylether-Herbiziden auf. Zum einen trägt Aclonifen keine Substituenten am ersten Phenylring. Zum anderen unterscheidet sich die molekulare und physiologische Wirkung von Aclonifen von der der anderen Herbizide. Aclonifen ist kein PPO-Inhibitor, sondern inhibiert die Solanesyldiphosphatsynthese (Kahlau et al. 2020).

Die Umsatzanalyse von Aclonifen durch die AtGSTs ergab, ähnlich zu Fomesafen, keine hohe Spezifität für eine GST-Klasse (Abbildung 3-21). Wie Bifenox und Nitrofen wurde Aclonifen durch die AtGSTL3 umgesetzt. Im Fall von Aclonifen war die AtGSTL3 die aktivste AtGST mit einer Konjugatmenge von  $5,4 \pm 0,6$  nmol. Die AtGSTL2 war mit  $3,6 \pm 0,1$  nmol GS-Konjugat die zweit aktivste AtGST, gefolgt von der AtGSTT2 mit  $2,8 \pm 1,8$  nmol Konjugat.

**Abbildung 3-21: Aclonifen-Konjugation durch heterolog exprimierte AtGSTs in Hefe**

Die Belastung mit Aclonifen der 55 AtGST-exprimierenden Hefen wurde durchgeführt wie bereits für Fluorodifen (Abbildung 3-15). Wie bei Fluorodifen ist der Mittelwert der Konjugat-Menge bezogen auf die OD<sub>600</sub> der jeweiligen Hefe-Kultur und der Standardfehler von drei unabhängigen Belastungen.

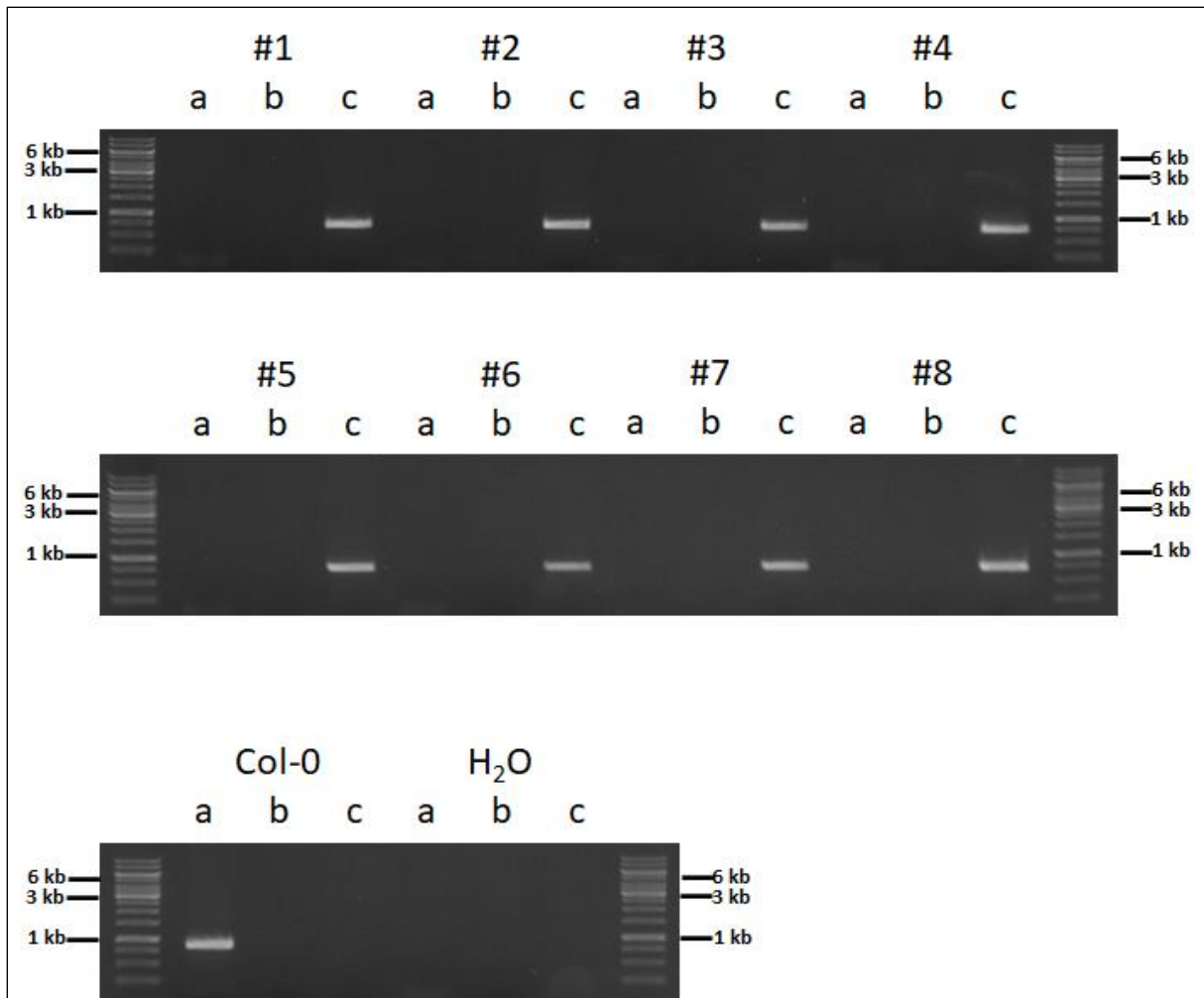
Es konnte keine eindeutige Spezifität der AtGSTs für die Konjugation aller Diphenylether-Herbizide festgestellt werden, wie es beispielsweise der Fall für die Triazin-Herbizide ist (Kowalski 2016). Eine Abhängigkeit der AtGST-Spezifität von dem Substituenten des ersten Phenylrings der Diphenylether-Herbizide konnten festgestellt werden. Neben der Nitrogruppe des zweiten Phenylrings der Diphenylether-Herbizide variieren die Substituenten des zweiten Phenylrings für alle Diphenylether-Herbizide.

### 3.4 Herbizid-Belastung von *gstu28* T-DNA-Insertionslinie

Auf Grundlage der Daten der heterolog in Hefe exprimierten *AtGSTs* konnten Gene für GSTs identifiziert werden, die *in planta* durch Mutation oder Überexpression zu sensitiven oder resistenten Pflanzen führen könnten. Es wurde bereits gezeigt, dass die Überexpression der *AtGSTU5* in *A. thaliana* zu einer erhöhten Resistenz dieser Pflanzen gegenüber den Triazin-Herbizide führt (Kowalski 2016). Der *atgstu5*-Knock-Out erhöhte die Sensitivität der Pflanze gegenüber den Triazin. In solchen Mutanten können weitere und sekundäre Effekte untersucht werden.

Die heterolog exprimierte *AtGSTU28* zeigte die höchste Konjugationsrate für Fluorodifen (3.3.1 Fluorodifen). Um die Aktivität der *AtGSTU28 in planta* zu überprüfen beziehungsweise zu klären, ob es Effekte gibt, wie beispielsweise Heterodimer-Bildung, die im Detoxifizierungsprozess involviert sind, wurde eine *gstu28* T-DNA-Insertionslinie mit dem Diphenylether-Herbizide Fluorodifen belastet. Da bereits gezeigt wurde, dass es unter Fluorodifen-Belastung zu einem Verlust der Pigmente Chlorophyll a und b, sowie der Carotinoide kommt (3.1 Diphenylether-Herbizid-Wirkung auf *Arabidopsis thaliana*), wurden die Knock-Out-Linie auf diesen physiologischen Effekt untersucht (Abbildung 3-23).

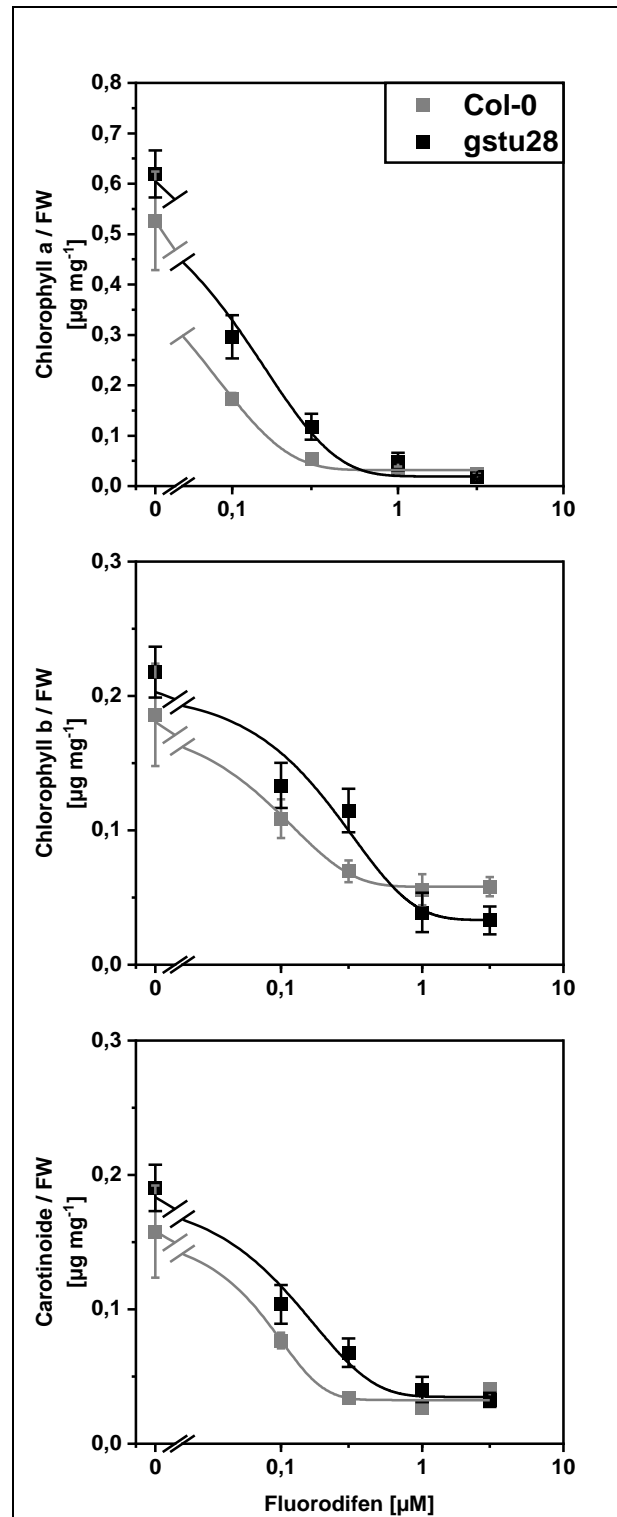
Bei der *gstu28* Knock-Out Linie handelte es sich um eine einzelne GABI-Kat T-DNA-Insertionslinie. Sie war die einzige verfügbare Knock-Out Linie für das *AtGSTU28*-Gen beim *Eurasian Arabidopsis Stock Centre* (NASC, Loughborough, UK). Sie wurde vor der Verwendung mittels Sulfadiazin-Screenings auf die T-DNA spezifische Resistenz überprüft. Von der Sulfadiazin-resistenten Linie wurden acht nicht-belastete Keimlinge mittels PCR auf die Insertion hin überprüft. Hierfür wurden Gen-spezifische Primer für das *AtGSTU28*-Gen verwendet, sowie der *left-border* Primer für die GABI-Kat Insertionslinien. Dabei konnte verifiziert werden, dass alle Keimlinge die T-DNA-Insertion homozygot trugen (Abbildung 3-22). Für das Wildtypgen wurde kein PCR-Produkt amplifiziert, während die Kombination von Gen-spezifischen Primer und dem *left-border* Primer der GABI-Kat-Linien ein PCR-Produkt ergab (Abbildung 3-22). In der Wildtyp-Kontrolle konnte nur ein Produkt mit den Gen-spezifischen Primer generiert werden. Für die *gstu28* Knock-Out stand ausschließlich diese eine T-DNA-Insertionslinie zur Verfügung, sodass im Lauf der Arbeit mittels CRISPR/Cas9 (3.8.2 Multi-Kingdom Golden-Gate basiertes Cas9-System) mehrere *gstu28* Deletionsmutanten generiert wurden.



**Abbildung 3-22: Genotypisierung *gstu28***

Die GABI-Kat-Linien wurden mittels Sufladiazin-Screenings auf die Homozygotie der T-DNA-Insertion hin geprüft (2.5.7.3). Von der vollständig Sulfadiazin-resistenten Linie wurde von acht Keimlinge die genomische DNA isoliert und anschließend mittels PCR auf die Insertion geprüft. Je Keimling wurden hierfür drei Primer-Kombinationen verwendet mit einer maximalen Produktgröße von 1 kb. Gezeigt sind (a) *GSTU28\_for* und *GSTU28\_rev*, die das Wildtypgen amplifizieren, (b) *GSTU28\_for* und *GK\_LB* (GABI-Kat left boarder primer) und (c) *GSTU28\_rev* und *GK\_LB* für die acht Sulfadiazin-resistenten Keimlingen und für den Col-0 Wildtyp. Als Standard-Marker wurde der Thermo Scientific GeneRuler 1kb Ladder mit aufgetragen (2.5.3 Genotypisierung von Pflanzen).

Die *gstu28*-Keimlinge zeigten im Vergleich zur Wildtypkontrolle keinen Unterschied für die gemessenen Pigmentkonzentrationen nach der Belastung mit Fluorodifen (Abbildung 3-23). Die Pigmentkonzentrationen für die nicht belasteten *gstu28*-Keimlinge waren im Vergleich zur Wildtyp im Mittel etwas erhöht. Auch bei der Belastung mit Fluorodifen wiesen die *gstu28*-Keimlinge stets eine erhöhte Pigmentkonzentration auf, dabei war die relative Abnahme der Pigmentkonzentrationen für die Mutante und die Wildtypkontrolle vergleichbar.

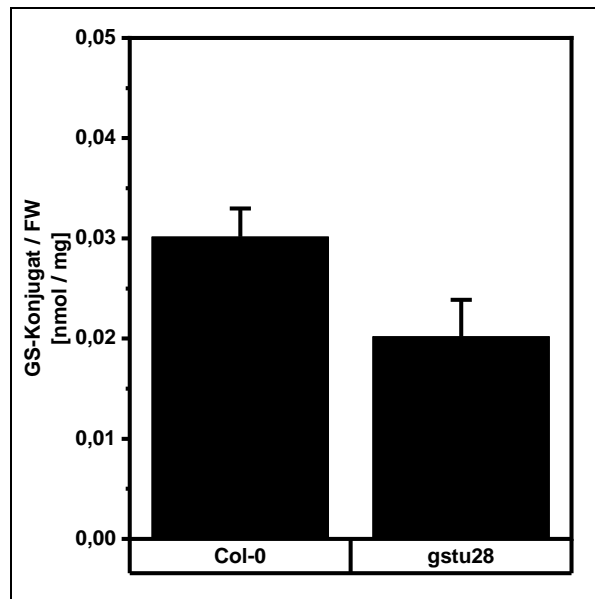


**Abbildung 3-23: Pigmentkonzentrationen nach Fluorodifen Belastung**

Sowohl Col-0 Keimlinge als auch Keimlinge der *gstu28*-Knock-Out im Genotyp Col-0 wurden mit Fluorodifen belastet, wie in Abbildung 3-3 beschrieben. Je Konzentration und Linie ist der Mittelwert der jeweilige Pigmentkonzentration bezogen auf das Frischgewicht von vier Proben à drei bis vier Keimlingen und der Standardfehler abgebildet.

Die Metabolit-Analyse der Keimlinge, in Flüssigkultur mit Fluorodifen belastet und mittels HPLC analysiert, zeigte, dass die Menge an GS-Konjugat in den *gstu28*-Keimlingen etwas verringert war (Abbildung 3-24). Diese Diskrepanz könnte darauf zurückgeführt werden, das mögliche AtGST-

Heterodimere eine höhere Aktivität haben, als das AtGSTU28-Homodimer. Möglich wäre auch, dass die T-DNA-Insertion selbst einen Effekt auf die Detoxifizierung von Fluorodifen nimmt.



**Abbildung 3-24: In planta Konjugation von Fluorodifen**

Col-0 und gstu28-Knock-Out Keimlinge wurden in Flüssigkultur überführt und mit Fluorodifen belastet (2.6.5). Anschließend wurden die Metabolite der Keimlinge extrahiert und der Extrakt wurde mittels HPLC analysiert (2.7.2). Gezeigt wird der Mittelwert des detektierten Glutathion-Konjugat von vier unabhängigen Belastungen und der Standardfehler.

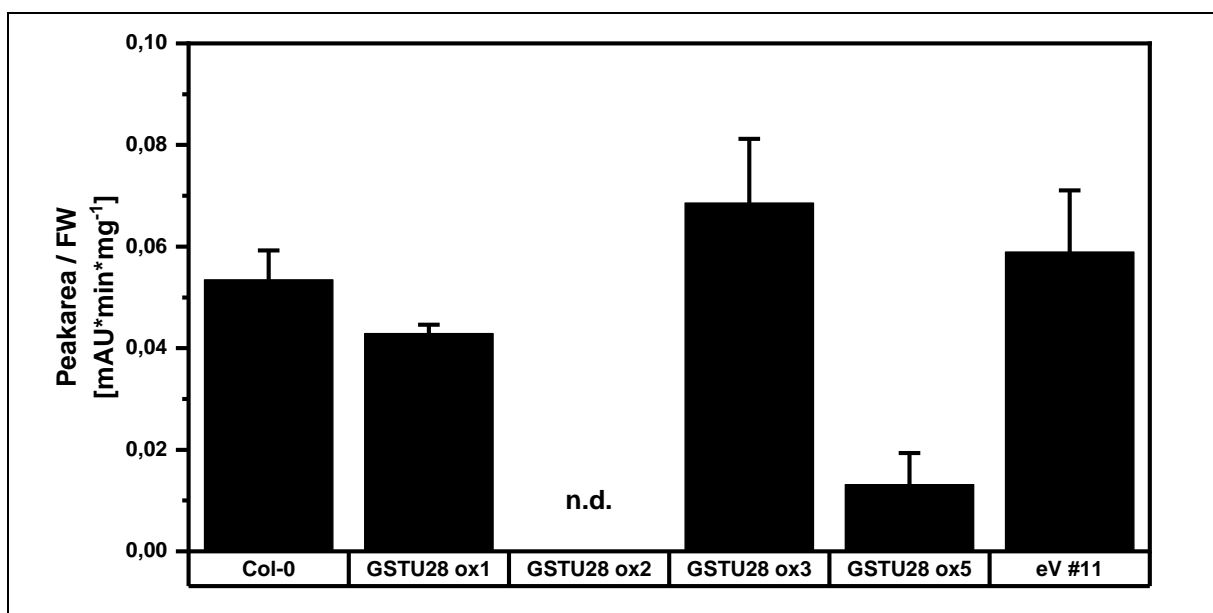
Da nur eine T-DNA-Insertionslinie zur Verfügung stand wurde mittels des im Zuge dieser Arbeit entwickelten CRISPR/Cas-System (3.8.2 Multi-Kingdom Golden-Gate basiertes Cas9-System) Deletionsmutanten geschaffen. Es wurden fünf unabhängige Deletionsmutanten mit der CRISPR/Cas9-Methode generiert. Die segregierenden Generationen der fünf CRISPR-Linien wurden physiologisch untersucht. Ebenso wie für die T-DNA-Insertionslinie zeigte die Pigmentgehalte der Deletionsmutanten nach der Belastung mit Fluorodifen keinen signifikanten Unterschied zum Col-0 Wildtyp (6 Anhang, Abbildung 6-3).

Die Belastung mit den anderen Diphenylether-Herbiziden zeigte gleichfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen der gstu28 Knock-Out-Linie und dem Col-0 Wildtyp (6 Anhang, Abbildung 6-4 und Abbildung 6-5). Während die AtGSTU28 in Hefe exprimiert einen hohen Umsatz für Fluorodifen zeigte, wurden durch die AtGSTU28 die anderen sechs Diphenylether-Herbizide nur gering umgesetzt. Daher war ein Effekt nicht zu erwarten. Dennoch sollten Effekte wie beispielsweise die Bildung eines aktiven Heterodimers, bestehend aus der AtGSTU28 und einer weiteren AtGSTU, nicht vernachlässigt werden.

### 3.5 Herbizid-Belastung GSTU28 Überexpressionslinien

Die Überexpression von AtGSTs kann *in planta* zur Generierung von erhöhten Resistenzen gegenüber Herbiziden führen (Karavangeli et al. 2005; Hu et al. 2009; Benekos et al. 2010). Zur Untersuchung einer solchen Resistenzbildung wurden p35S-Überexpressionslinien der AtGSTU28 und entsprechende Kontrollen generiert.

Die Metabolit-Analyse von fünf unabhängigen AtGSTU28-Überexpressionslinien zeigte, dass die Linien #1, wie bereits die *gstu28*-Knock-Out-Linie, um ca. 20 % weniger Glutathion-Konjugat bildeten (Abbildung 3-25). Zu erwarten war jedoch eine erhöhte Konjugatmenge für die AtGSTU28-Überexpressionslinien, wie es der Trend für die Überexpressionslinie #3 und auch die Kontrolle #11 war. Die Überexpressionslinie #5 zeigte deutlich weniger Glutathion-Konjugat. Da die Phenyl-GS-Konjugatkonzentration durch weitere Faktoren, wie dem Katabolismus des Konjugates, beeinflusst wird, wurde der Effekt von Fluorodifen auf den Chlorophyll- und Carotinidgehalt der Überexpressionslinien untersucht.



**Abbildung 3-25: Konjugation von Fluorodifen in GSTU28 Überexpressionslinien**

Von unabhängigen Überexpressionslinien sowie Col-0 und einer Vektorkontrolle wurde Keimlinge, wie in Abbildung 3-24 beschrieben, mit Fluorodifen belastet. Dargestellt ist der Mittelwert der Konjugat-Menge von vier unabhängigen Belastungen und der Standardfehler. N.d. = keine Daten.

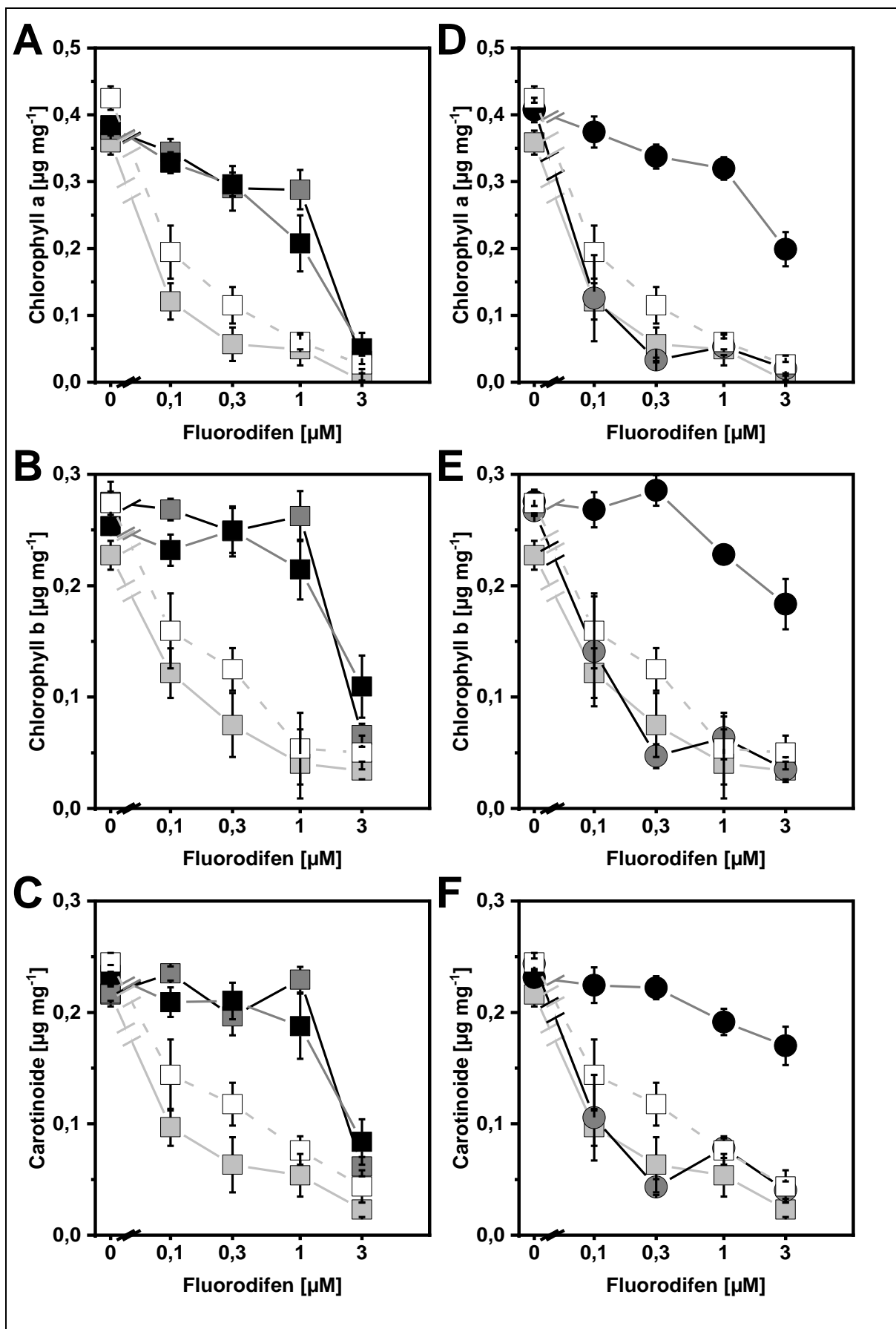
Der metabolischen Analyse stehen die Ergebnisse der physiologischen Untersuchung entgegen. Bei der Bestimmung der Pigmentkonzentrationen zeigten die beiden Überexpressionslinien #1 und #2 eine erhöhte Resistenz gegenüber dem Herbizid Fluorodifen (Abbildung 3-26 A, B und C). Da die Linie #1 weniger Konjugat als der Wildtyp zeigte, wäre eine Sensitivität gegenüber Fluorodifen zu erwarten gewesen. Die beiden Linien #1 und #2 zeigten bis zu einer Konzentration von 1  $\mu$ M Fluorodifen nur eine geringe Abnahme der Pigmentkonzentrationen. Die Konzentration von Chlorophyll a sank bei



einer Belastung mit 3  $\mu$ M Fluorodifen annähernd auf den Wert der Wildtypkontrolle. Auch die Konzentration von Chlorophyll b und den Carotinoiden nahm bei einer Konzentration von 3  $\mu$ M Fluorodifen ab.

Die Überexpressionslinie #5 zeigte die geringste Menge an gebildetem Konjugat im Vergleich zu allen anderen getesteten Linien. Wie auch die Linien #1 und #2 war diese Linie trotz verringerter Konjugat-Menge resistent gegenüber dem Diphenylether-Herbizid Fluorodifen (Abbildung 3-26 D, E und F). In dem Maß wie die Konjugat-Menge verringert war, war die Resistenz der Überexpressionslinie #5 stärker ausgeprägt als bei den beiden anderen Linien #1 und #2. Selbst bei einer Fluorodifen-Konzentration von 3  $\mu$ M waren die Pigmentkonzentrationen im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöht.

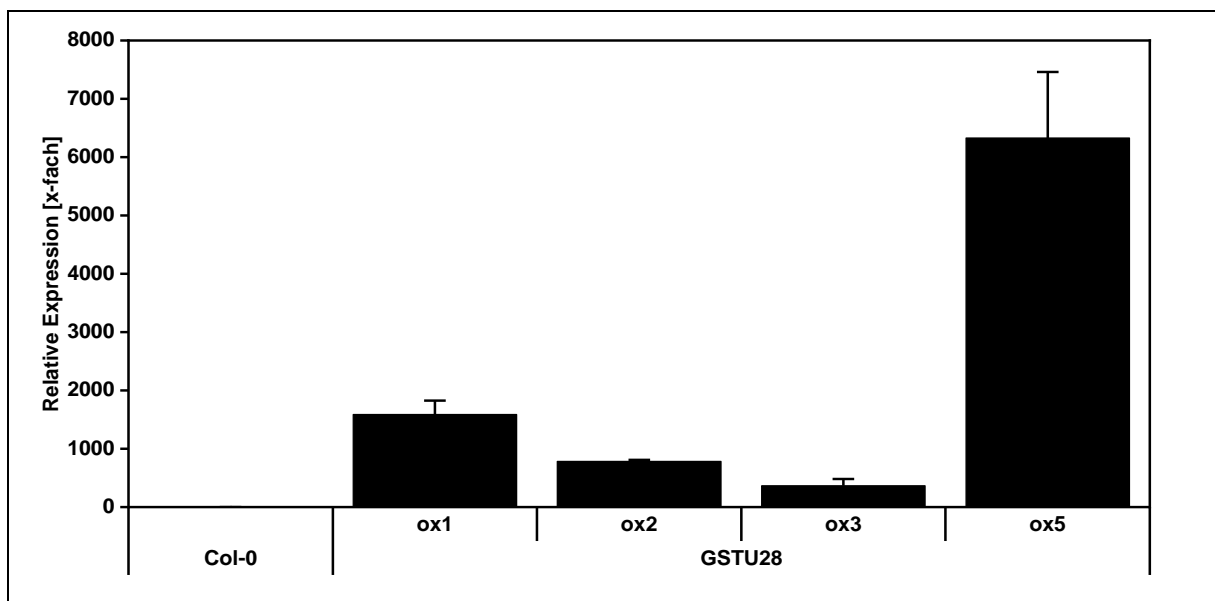
Sowohl die Kontrolllinie #11 als auch die Überexpressionslinie #3 zeigten bei der Konjugatanalyse eine Anreicherung des Konjugat gegenüber dem Wildtyp. Physiologisch konnten keine Unterschiede zwischen den Linien und dem Wildtypen ausgemacht werden (Abbildung 3-26). Dass die Resistenz und die gebildete Menge an Glutathion-Konjugat zu einander gegenläufig waren, war nicht zu erwarten. Jedoch wird *in planta* das Glutathion-Konjugat durch katabolische Prozesse weiter prozessiert (Gläser et al. 2014). Von dem Glutathion-Konjugat werden die Glutaminsäure und das Glycin abgespalten. Anschließend kann von der Phenylmercaptursäure auch das Cystein unter Alaninfreisetzung abgespalten werden, sodass ein Thiol entsteht. Dieser Prozess dient Organismen der Ressourcenerhaltung.



**Abbildung 3-26: Pigmentkonzentration der AtGSTU28-Überexpressionslinien nach Fluorodifen-Belastung**

Die AtGSTU28-Überexpressionslinien #1, #2, #3 und #5 (■, ■, ● und ●) sowie der Wildtyp Col-0 (□) und die Leervektorkontrolle (□) wurden mit Fluorodifen belastet und deren Pigmentkonzentrationen bestimmt, wie in Abbildung 3-3 beschrieben. Als Kontrolle dienten Col-0 Keimlinge. Je vier Proben à drei bis vier Keimlinge wurden gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert der Pigmentkonzentrationen dieser Proben und der Standardfehler.

Um die Herbizid-Resistenz mit der Überexpression korrelieren zu können, wurden für alle vier Linien die Transkript-Menge mittels *Real Time Quantitative PCR* (RT-qPCR) bestimmt (Abbildung 3-27). Als Referenz diente die Transkript-Menge der AtGSTU28 des Wildtyp Col-0. Die höchste Transkript-Menge hatte die Überexpressionslinie #5. Hier konnte eine relative Transkript-Menge von  $6326 \pm 1132$  bestimmt werden, während die Linie #1 und #2 eine relative Transkript-Menge von  $1587 \pm 240$  und  $780 \pm 28$  aufwiesen. Somit zeigen diese drei Linien eine Korrelation zwischen der Überexpression und der Herbizid-Resistenz. Auch für die Linie #3 war die Transkript-Menge um den Faktor  $365 \pm 117$  im Vergleich zur Expression der AtGSTU28 im Wildtypen erhöht. Das diese Linie keine Resistenz gegenüber dem Fluorodifen zeigte, könnte darin liegen, dass die Translation der mRNA in Protein in dieser Linie im Vergleich zu den drei anderen Linien geringer ausfällt.

**Abbildung 3-27: Expressionsanalyse mittels qPCR**

Zehn Tage alte Keimlinge wurden von MS-Platten genommen und nach erfolgreicher RNA-Isolierung wurde die RNA in cDNA transkribiert. Die Transkriptmenge für die AtGSTU28 wurde mittels qPCR im Triplikate, bezogen auf die house keeping Gene AtUBI10 und AtUBC9 für die Überexpressionslinien bestimmt und relativ zur Expression der Col-0 Keimlinge gesetzt.

### 3.6 GS-Konjugation von natürlichen Diphenylethern

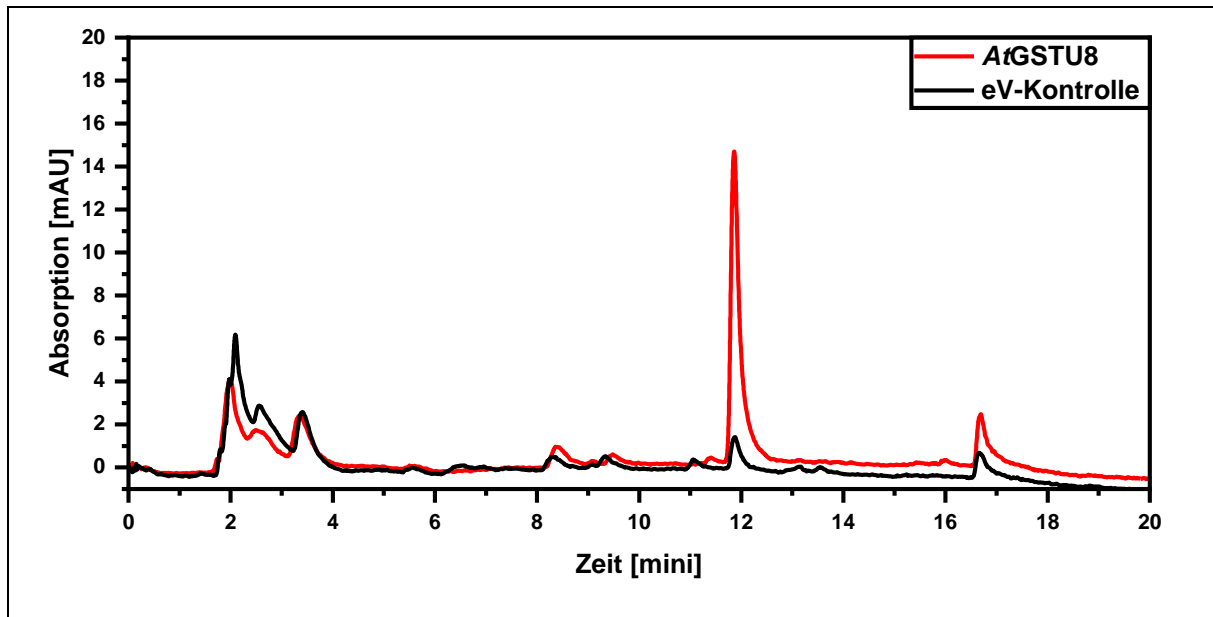
Neben den anthropogenen Diphenylether-Herbiziden gibt es ebenfalls Diphenylether die in der Natur vorkommen. Diese stammen aus unterschiedlichen Pilzen, die teilweise mit Pflanzen assoziiert sind (1.4 Natürliche Diphenylether; Venkatasubbaiah et al. 1992; Hargreaves et al. 2002; Rukachaisirikul et al. 2014). Natürlichen Verbindungen, die phytotoxisch wirken, rücken immer mehr in den Fokus der Forschung (Dayan et al. 2009; Dayan et al. 2012; Dayan und Duke 2014; Cimmino et al. 2015). Die natürlichen Diphenylether zeigen in einigen Fällen phytotoxische Eigenschaften und werden aktiv von phytopathogenen Pilzen synthetisiert (Overy et al. 2005).

In dieser Arbeit war es die Überlegung, dass die AtGSTs nicht nur die Diphenylether-Herbizide, sondern auch die natürlichen Diphenylether konjugieren können. Da einige Verbindungen von Pflanzen-assoziierten Pilzen stammen, die teils Phytopathogene sind, und physiologische Effekte der Verbindungen auf Pflanzen beobachtet werden konnten (1.4 Natürliche Diphenylether; Hargreaves et al. 2002; Dayan et al. 2008), könnte eine evolutionäre Korrelation zwischen den natürlichen Diphenylethern und der GST-Aktivität gegenüber Diphenylether im Allgemeinen bestehen. Zudem weisen die natürlichen Diphenylether in ihrer Substitution teilweise eine Heterogenität auf. Dadurch kommt es zu einer hohen Vielfalt an Verbindungen. Dies könnte auch erklären, warum keine spezifische AtGST eine exklusive Aktivität für die Diphenylether-Herbizide zeigte. Somit könnten die natürlichen Diphenylether ein Beispiel für eine mögliche evolutionäre Triebkraft der Vielfalt pflanzlicher GSTs darstellen.

Die in dieser Arbeit verwendeten natürlichen Diphenylether lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Zum einen die Diphenylether mit Carboxyl-Substituenten an den Phenylringen, zum anderen die ausschließlich hydroxylierten und methylierten Diphenylether (1.4). Bei den carboxylierten natürlichen Diphenylethern lassen sich chlorierte Verbindungen finden. Die carboxylierten natürlichen Diphenylether wurden in dieser Arbeit weiter in die nicht-chlorierten, monochlorierten und dichlorierten carboxylierten natürlichen Diphenylether gruppiert.

#### 3.6.1 Asterrinsäure

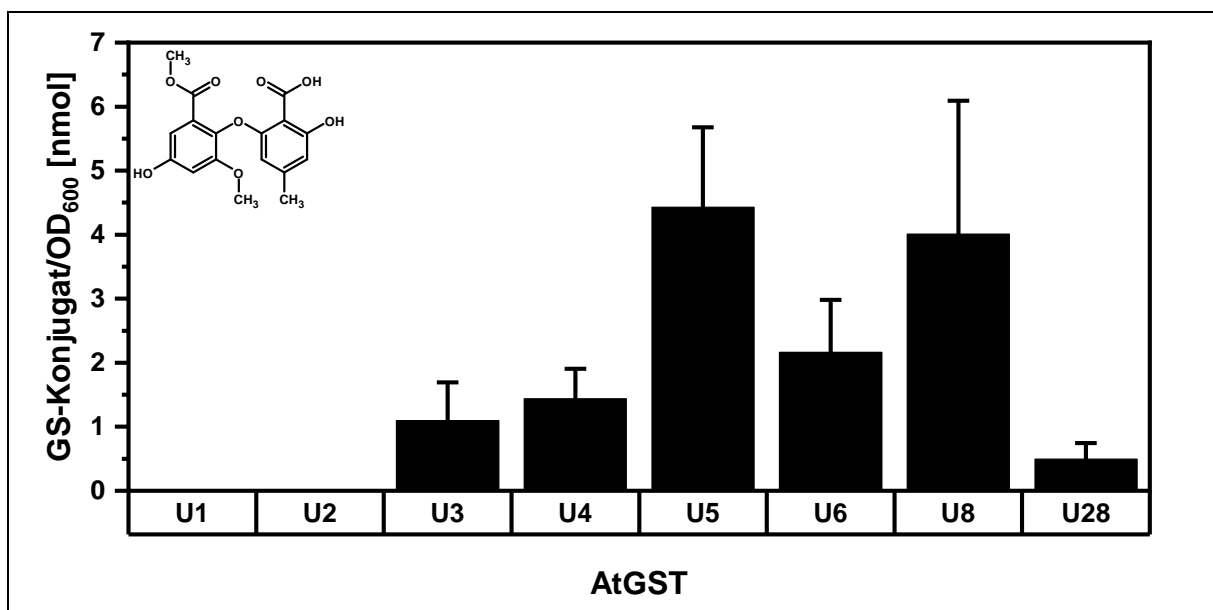
Asterrinsäure stellt die Leitstruktur der in dieser Arbeit verwendeten carboxylierten natürlichen Diphenylether dar. Die chromatographische Analyse von zwei unterschiedlichen Hefestämme zeigte ein GST-abhängige Konjugation der Asterrinsäure (Abbildung 3-28). Während die Leervektorkontrolle zwar ein Hintergrundsignal zeigte, konnte für die AtGSTU8-Hefe ein starkes Signal bei einer Retentionszeit von 12 min detektiert werden. Die Retentionszeit des Glutathion-Konjugat von Asterrinsäure korrelierte mit der Retentionszeit des Phenyl-Glutathion-Konjugates von Fluorodifen (3.3.1 Fluorodifen, Abbildung 3-13 A).



**Abbildung 3-28: Chromatogramm vom GS-Konjugation von Asterrinsäure**

Für die Bestimmung der Retentionszeit des Asterrinsäure Glutathion-Konjugat wurden die AtGSTU8-exprimierende Hefe und die Leervektorkontrolle angezogen und mit Asterrinsäure belastet (2.5.8.1 und 2.5.8.2). Anschließend wurde die Metabolite extrahiert und mittels HPLC analysiert (2.5.8.3, 2.5.8.4 und 2.7.2). Dargestellt ist ein repräsentatives Chromatogramm.

Die Belastung von unterschiedlichen AtGST-Hefestämme mit Asterrinsäure und die anschließende analytische Bestimmung der Konjugatmenge ergab eine hohe Aktivität für die AtGSTU8 (Abbildung 3-29). Neben der AtGSTU8 zeigte auch die AtGSTU5 eine Aktivität. Die weiteren getesteten AtGSTs wiesen kaum bis keine Aktivität gegenüber Asterrinsäure auf. Die AtGSTU8 war für die Diphenylether-Herbizide inaktiv, während die AtGSTU5 nur wenig Aktivität gegenüber den Diphenylether-Herbiziden zeigte. Die Herbizide unterscheiden sich strukturell stark von der Asterrinsäure in den Substituenten der beiden Phenylringer. Daher war ein verändertes AtGST-Aktivitätsprofil nicht unerwartet.



**Abbildung 3-29: Glutathion-Konjugat von Asterrinsäure durch AtGSTs**

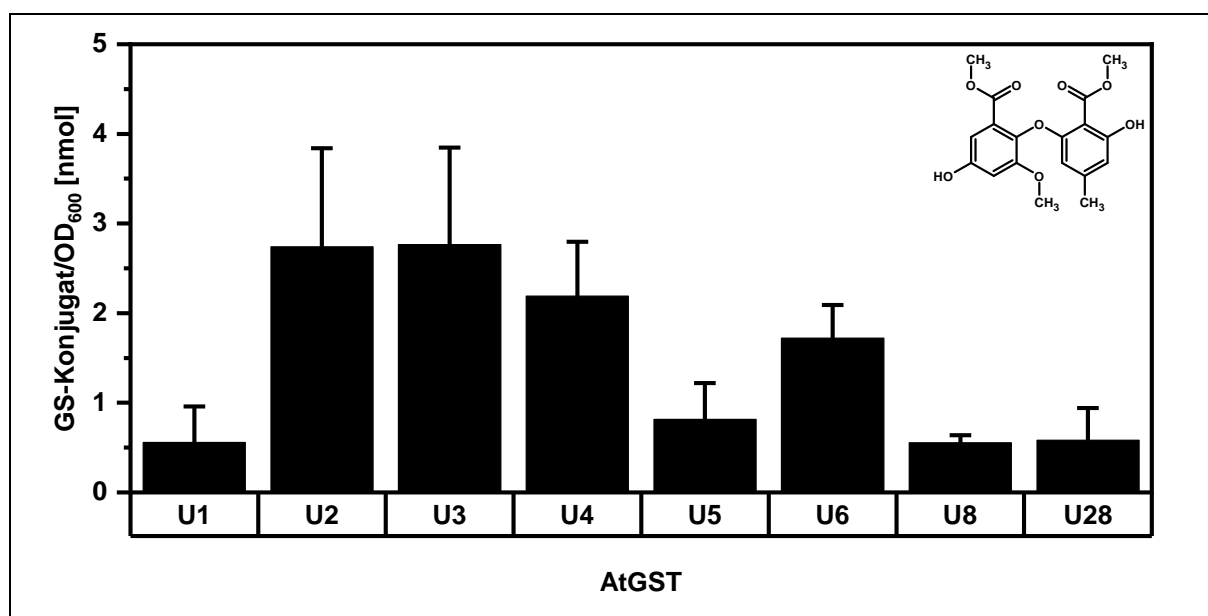
Die Konjugationsanalyse von Asterrinsäure durch die AtGST-exprimierenden Hefen erfolgte wie für Fluorodifen (Abbildung 3-15). Dargestellt sind der Mittelwert und der Standardfehler von je drei unabhängigen Belastungen.

Die carboxylierten natürlichen Diphenylether weisen zu einander nur einzelne strukturelle Unterschiede auf, wie beispielsweise Methylierung, Chlorierung oder unterschiedliche Position von Substituenten. Diese Unterschiede könnten eine Möglichkeit bieten ein Verständnis zu erhalten, welche molekularen Charakteristika von Substraten die AtGST-Aktivität beeinflussen.

## 3.6.2 Asterrinsäuremethylester

Der Asterrinsäuremethylester ist das methylierte Derivat der Asterrinsäure, bei dem die Carboxy-Gruppe mit einer Methyl-Gruppe verestert ist. Durch die Veresterung wird die elektrochemische Struktur des Asterrinsäuremethylester im Vergleich zur Asterrinsäure verändert, da eine polare Gruppe verloren geht.

Die strukturelle Änderung zeigte bei der Konjugation durch die AtGSTs ein verändertes Aktivitätsprofil (Abbildung 3-30). Während Asterrinsäure durch die AtGSTU2 nicht umgesetzt wurde, war diese AtGST eine der zwei aktivsten getesteten AtGSTs für das Asterrinsäuremethylester. Die Konjugation durch die AtGSTU2 ergab eine GS-Konjugatmenge von  $2,7 \pm 1,1$  nmol und für die AtGSTU3 eine Menge von  $2,8 \pm 1,1$  nmol. Auch die AtGSTU4 und AtGSTU6 zeigten eine Konjugationsaktivität für das Asterrinsäuremethylester mit einer GS-Konjugatmenge von  $2,2 \pm 0,6$  nmol bzw.  $1,7 \pm 0,4$  nmol.

**Abbildung 3-30: Glutathion-Konjugat von Asterrinsäuremethylester durch AtGSTs**

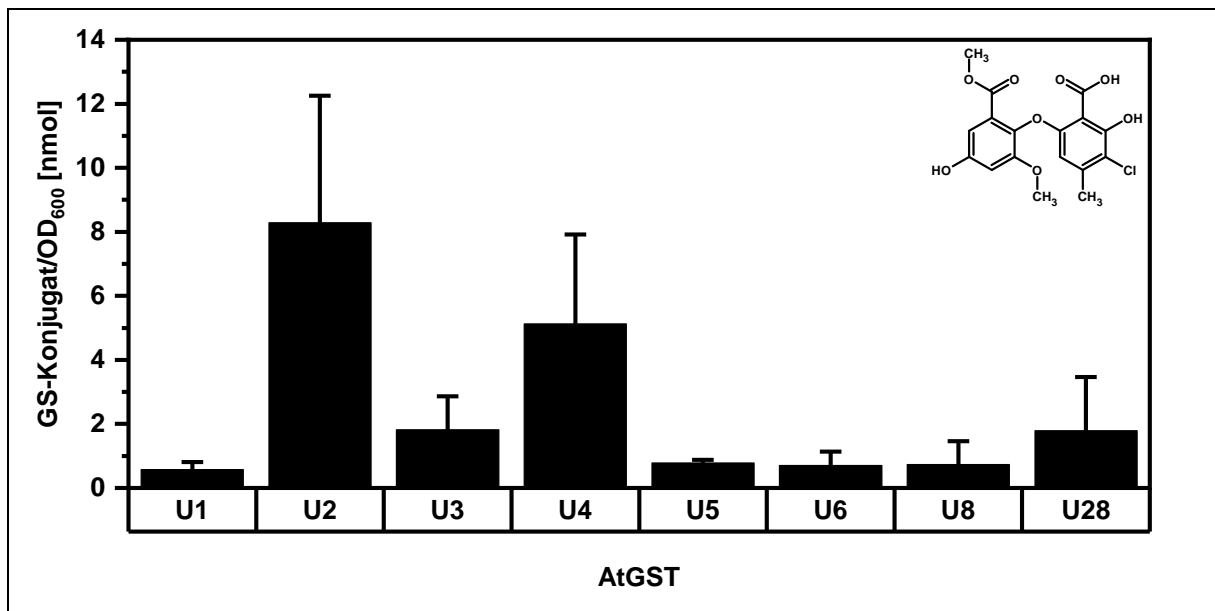
Anstelle von Asterrinsäure wurden die AtGST-exprimierenden Hefen (Abbildung 3-29) mit dem Methylester-Derivat Asterrinsäuremethylester belastet. Wie Abbildung 3-29 sind der Mittelwert und der Standardfehler von je drei unabhängigen Belastungen dargestellt.

Asterrinsäure und Asterrinsäuremethylester wurden stets, neben anderen Derivaten, aus dem gleichen Pilz isoliert (Hargreaves et al. 2002; Chomcheon et al. 2009; Fang et al. 2012; Wen et al. 2020).

Somit könnten sie mit weiteren natürlichen Diphenylethern einen toxischen Cocktail bilden. Neben Asterrinsäure und Asterrinsäuremethylester finden sich chlorierte Verbindungen wie die 6'-Chloroasterrinsäure in solchen Extrakten aus Pilzen (Hargreaves et al. 2002; Wen et al. 2020).

### 3.6.3 Chloroasterrinsäure

Die 6'-Chloroasterrinsäure, im Folgenden als Chloroasterrinsäure bezeichnet, wurde durch die beiden AtGSTU2 und AtGSTU4 konjugiert (Abbildung 3-31). Strukturell unterscheidet sich Chloroasterrinsäure von der Asterrinsäure durch den Chlor-Substituenten an der 6'-Position des zweiten Phenylrings. Im Gegensatz zu Asterrinsäure wurde Chloroasterrinsäure kaum durch die AtGSTU8 umgesetzt. Hauptsächlich wurde die Chloroasterrinsäure durch die AtGSTU2 und AtGSTU4 unter den getesteten AtGSTs mit Glutathion konjugiert. Neben diesen beiden zeigten auch die AtGSTU3 und AtGSTU28 geringe Aktivitäten. Generell wurde Isochloroasterrinsäure im Vergleich zu den vorherigen natürlichen Diphenylethern durch die getesteten AtGSTs nur in geringen Mengen umgesetzt.



**Abbildung 3-31: GS-Konjugat von Chloroasterrinsäure durch AtGSTs**

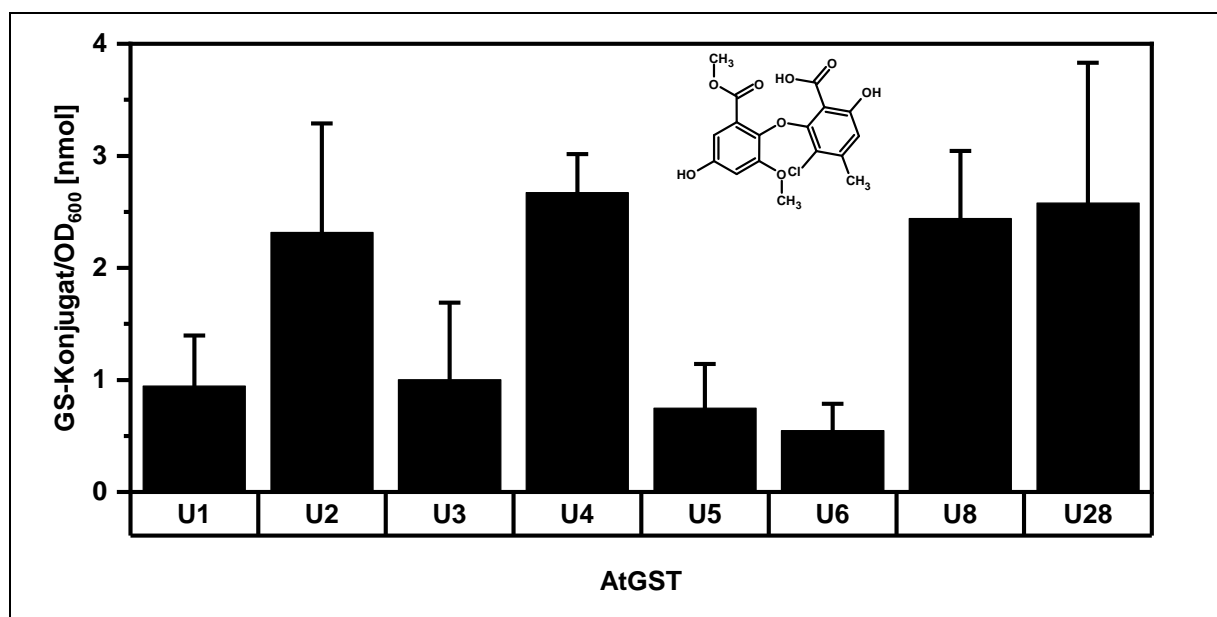
Die Glutathion-Konjugation der Chloroasterrinsäure, eins der monochlorierten Asterrinsäure-Derivate, durch die AtGST-exprimierenden Hefe wurde wie für die Asterrinsäure durchgeführt (Abbildung 3-29). Zu sehen sind je AtGST der Mittelwert und der Standardfehler von drei unabhängigen Belastungen.

Wie Asterrinsäure und der Asterrinsäuremethylester wurde Chloroasterrinsäure aus einigen *Aspergillus* Spezies isoliert (Wang et al. 2016). Aus diesen *Aspergillus* Spezies wurden auch weitere Asterrinsäure-Derivate isoliert, darunter der Chloroasterrinsäuremethylester. Dieser konnte in dieser Arbeit nicht untersucht werden, da dieser nicht zur Verfügung stand. Chloroasterrinsäuremethylester ist die methylierte Form der Chloroasterrinsäure und somit strukturell auch ähnlich zu dem Asterrinsäuremethylester. Neben der Chloroasterrinsäure und dem Chloroasterrinsäuremethylester finden sich weiter monochlorierte natürliche Diphenylether in *Aspergillus* und *Penicillium* Spezies (1.4

Natürliche Diphenylether). Unter diesen Verbindungen ist auch die Isochloroasterrinsäure. Sie besitzt die gleiche Summenformel wie die Chloroasterrinsäure und ist strukturell ähnlich zu der Chloroasterrinsäure.

### 3.6.4 Isochloroasterrinsäure

Die Position des Chlor-Substituenten der 3'-Chloroasterrinsäure unterscheidet sich von der Position in der Chloroasterrinsäure, daher sind beide Verbindungen Isomere zu einander. In dieser Arbeit wird die 3'-Chloroasterrinsäure im weiteren als Isochloroasterrinsäure bezeichnet. Wie für die Chloroasterrinsäure zeigten unter den getesteten AtGSTs, die AtGSTU2 und AtGSTU4 mit unter die höchsten Aktivitäten.



**Abbildung 3-32: GS-Konjugat von Isochloroasterrinsäure durch AtGST**

Für die zu Chloroasterrinsäure isomere Isochloroasterrinsäure wurde die Konjugationsanalyse analog zur Analyse der Asterrinsäure durchgeführt (Abbildung 3-29). Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert und den Standardfehler von drei unabhängigen Belastungen.

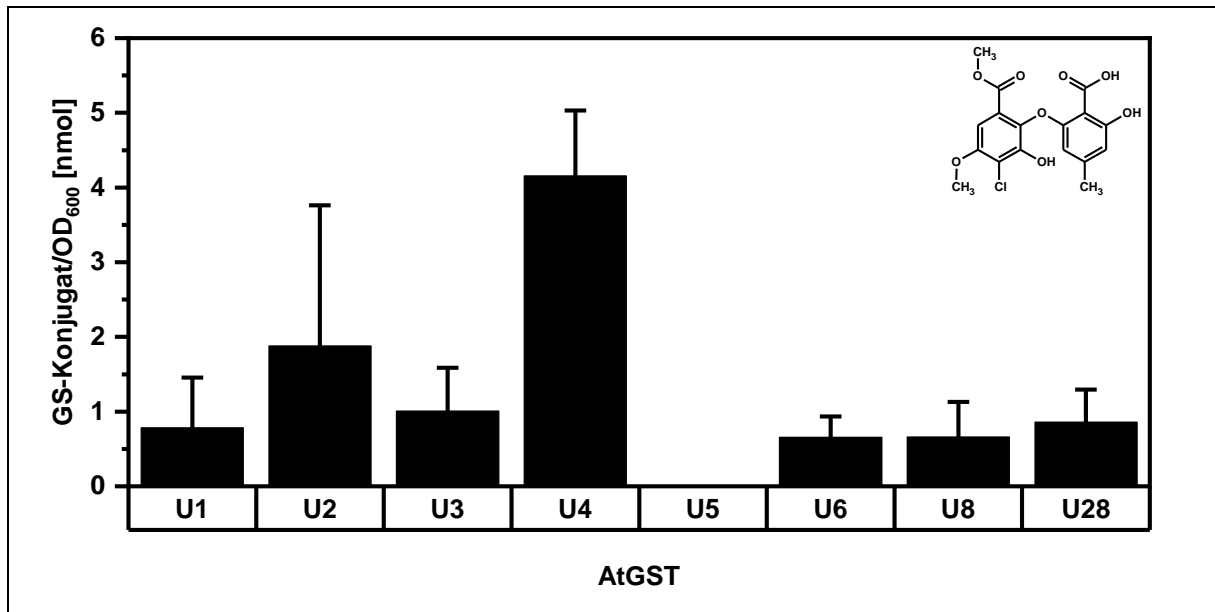
Sowohl Chloroasterrinsäure als auch Isochloroasterrinsäure wurden aus *Aspergillus* Spezies isoliert, während die Asterrinsäure nicht nur von *Aspergillus*, sondern auch von *Penicillium* Spezies synthetisiert wird (1.4 Natürliche Diphenylether). Ebenfalls in Isolaten von Vertretern beider Gattungen wurde die monochlorierte Pesteinsäure identifiziert.

### 3.6.5 Pestheinsäure

Die Pestheinsäure leitet sich strukturell nicht von der Asterrinsäure ab, sondern von dem Dechlorodihydromaldoxin. Strukturell unterscheiden sich Dechlorodihydromaldoxin und Asterrinsäure sich in der Position der Methoxy- und Hydroxy-Gruppe des ersten Phenylrings (1.4 Natürliche Diphenylether). Die Pestheinsäure ist zudem im Gegensatz zur Chloro- und Isochloroasterrinsäure nicht am zweiten, sondern am ersten Phenylring chloriert. Durch diesen strukturellen Unterschied wird



die Pestheinsäure weniger stark durch die AtGSTU2 mit Glutathion konjugiert (Abbildung 3-33), während die AtGSTU4 mit  $4,2 \pm 0,9$  nmol die auch für Pestheinsäure die aktivste unter den getesteten AtGST war.



**Abbildung 3-33: GS-Konjugat von Pestheinsäure durch AtGST**

Die Belastung der AtGST-exprimierenden Hefen erfolgte, wie in Abbildung 3-29 beschrieben. Dargestellt sind der Mittelwert und der Standardfehler von drei unabhängigen Belastungen.

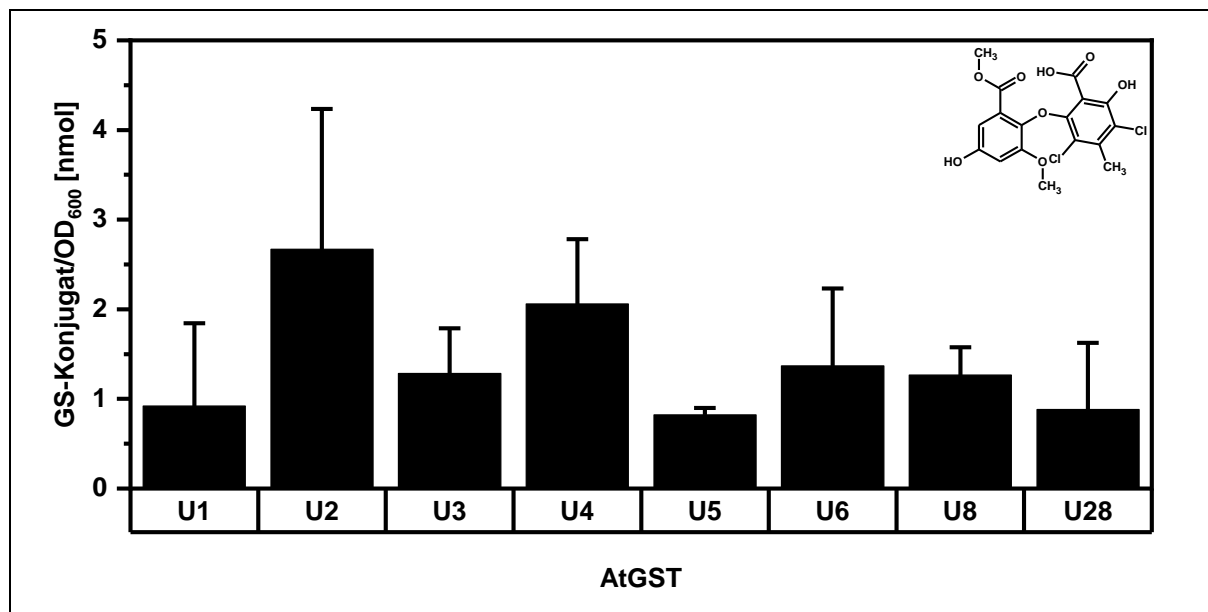
Im Gegensatz zu der Konjugationsanalysen der nicht-chlorierten natürlichen Diphenylethern konnte für die monochlorierten Diphenylether eine Spezifität der AtGSTU2 und vielmehr noch für die AtGSTU4 festgestellt werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass die AtGSTU8 und AtGSTU28 die getesteten monochlorierten Diphenylether abhängig von der Position des Chlorsubstituenten konjugierten. Neben den monochlorierten natürlichen Diphenylethern, lassen sich auch dichlorierte und polychlorierte natürliche Diphenylether aus Pilzen isolieren (Hargreaves et al. 2002; Millot et al. 2009; Zhang et al. 2016; Niu et al. 2016; Qin et al. 2019). In dieser Arbeit wurden die AtGST-Aktivität gegenüber drei dichlorierten natürlichen Diphenylether untersucht, die sich von der Asterrinsäure ableiten.

### 3.6.6 Geodihydrat

Geodihydrat kann als Prototyp der in dieser Arbeit untersuchten dichlorierten natürlichen Diphenylether angesehen werden. Es ist das dichlorierte Asterrinsäure-Derivat. Es ist wie die Chloroasterrinsäure an der 6'-Position und wie die Isochloroasterrinsäure an der 3'-Position chloriert.

Wie für die monochlorierten natürlichen Diphenylether waren gegenüber Geodihydrat auch die AtGSTU2 und AtGSTU4 die beiden aktivsten Enzyme (Abbildung 3-34). Die AtGSTU8 und AtGSTU28 zeigten dagegen nur wenig Aktivität. Da beide AtGSTs die Isochloroasterrinsäure konjugierten, nicht

aber die Chloroasterrinsäure und Geodinhydrat, dürfte die Substratspezifität der AtGSTU8 und AtGSTU28 im Fall der natürlichen Diphenylether durch die 6'-Chlorogruppe beeinflusst werden.



**Abbildung 3-34: GS-Konjugat von Geodinhydrat durch AtGST**

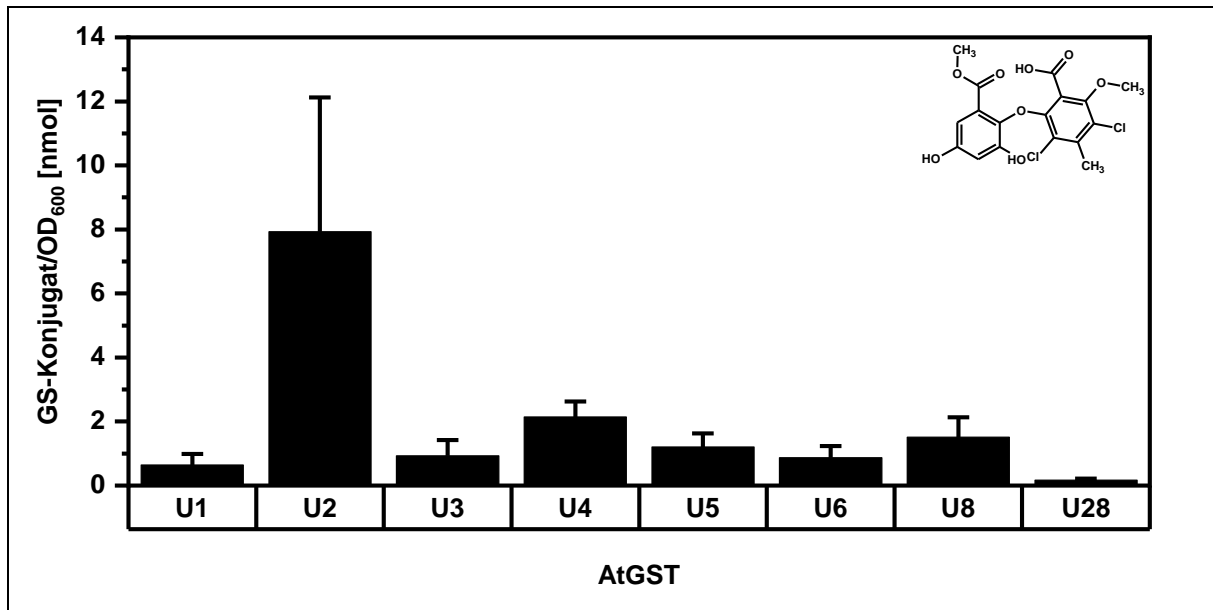
Die Konjugationsanalyse von Geodinhydrat durch die AtGST-exprimierenden Hefen erfolgte analog zu der Analyse von Asterrinsäure (Abbildung 3-29). Dargestellt sind der Mittelwert und der Standardfehler von drei unabhängigen Belastungen.

Bis auf die Pestheinsäure leiten sich alle vorherigen natürlichen Diphenylether von ihrer Grundstruktur von der Asterrinsäure ab. Isomere Strukturen, deren Grundstruktur Unterschiede zur Asterrinsäure zeigen, sollten zeigen, ob es eine Spezifität der AtGSTs für diese Grundstruktur gibt. Hierfür wurde das Isogeodinhydrat verwendet.

### 3.6.7 Isogeodinhydrat

Isogeodinhydrat besitzt die gleiche Summenformel wie Geodinhydrat. Es unterscheidet sich in der Position der Methoxy-Gruppe von Geodinhydrat. Während Geodinhydrat an der 5-Position des ersten Rings die Methoxy-Gruppe trägt, befindet sich diese bei Isogeodinhydrat an der 2'-Position des zweiten Rings. Durch diesen Unterschied dürften die elektrochemischen Eigenschaften und dreidimensionale Struktur beeinflusst werden.

Das AtGST-Aktivitätsprofil für die getesteten AtGSTs gegenüber Isogeodinhydrat zeigt Differenzen im Vergleich zu den anderen natürlichen Diphenylethern auf (Abbildung 3-35). Während Isogeodinhydrat auch durch die AtGSTU2 thiolitisch mit Glutathion konjugiert wurde, war die AtGSTU4 vergleichsweise inaktiv. Auch die übrigen getesteten AtGSTs zeigten kaum Aktivität gegenüber Isogeodinhydrat.



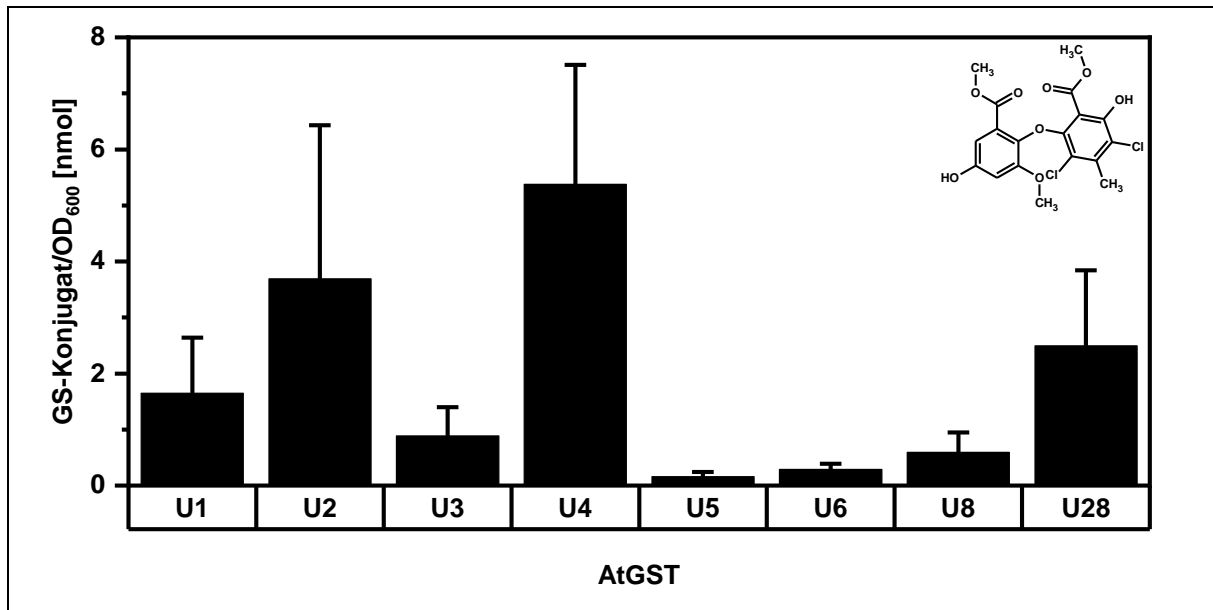
**Abbildung 3-35: GS-Konjugat von Isogeodinhydrat durch AtGST**

Für das Isogeodinhydrat wurde die Konjugationsanalyse durch die AtGSTs wie für Asterrinsäure durchgeführt (Abbildung 3-29). Gezeigt wird der Mittelwert und der Standardfehler der Konjugatmenge je AtGST von drei unabhängigen Belastungen.

Anhand der Konjugation von Isogeodinhydrat durch die AtGSTs sowie den vorherigen Daten für den Asterrinsäuremethylester konnte zusammenfassend festgestellt werden, dass sowohl Veresterung als auch Veretherung einen Einfluss auf die spezifische AtGST-Aktivität haben kann. Um den Einfluss der Veresterung genauer zu untersuchen, wurde die Konjugation des Dichloroasterrinsäuremethylester durch die AtGSTs analysiert. Dichloroasterrinsäuremethylester ist das dichlorierte Derivat des Asterrinsäuremethylesters bzw. der Methylether des Geodinhydrats. Wie alle Asterrinsäure wurde auch der Dichloroasterrinsäuremethylester aus *Aspergillus* und *Penicillium* Spezies isoliert (1.4 Natürliche Diphenylether; Hargreaves et al. 2002; Rukachaisirikul et al. 2014; Qin et al. 2019).

### 3.6.8 Dichloroasterrinsäuremethylester

Wie für die anderen Asterrinsäure-Derivate zeigten auch für den Dichloroasterrinsäuremethylester sowohl die AtGST2 als auch die AtGSTU4 mit  $3,7 \pm 2,7$  nmol bzw.  $5,4 \pm 2,1$  nmol die höchsten Konjugatmengen (Abbildung 3-36). Während bei Geodinhydrat die AtGSTU2 die aktivere der beiden AtGSTs war, war es im Fall des Dichloroasterrinsäuremethylester die AtGSTU4. Dies könnte an der Veresterung der zweiten Carboxylgruppe liegen. Neben diesen beiden AtGSTs konjugierte auch die AtGSTU28 den Ester. Die restlichen getesteten AtGSTs zeigten nur sehr geringe Aktivitäten gegenüber dem Dichloroasterrinsäuremethylester.



**Abbildung 3-36: GS-Konjugat von Dichloroasterrinsäuremethylester**

Wie für Asterrinsäure beschrieben (Abbildung 3-29), erfolgte Konjugationsanalyse von Dichloroasterrinsäuremethylester durch die AtGST-exprimierenden Hefen. Dargestellt werden der Mittelwert und der Standardfehler von drei unabhängigen Belastungen.

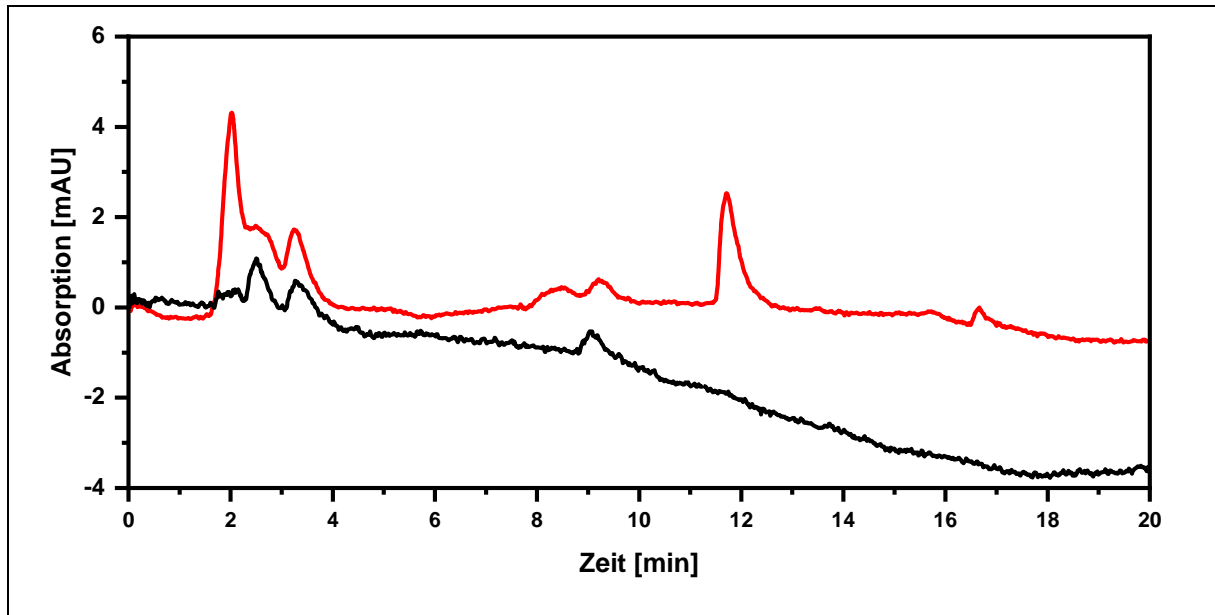
Für die drei dichlorierten natürlichen Diphenylether kann zusammenfassend festgestellt werden, dass sie durch die AtGSTU2 konjugiert wurden, während die AtGSTU4 eindeutig zwischen den drei Verbindungen diskriminierte. Die AtGSTU4 konjugierte nicht das Isogeodinydrat, während die AtGSTU4 die zweit aktivste AtGST für das Isomer Geodinydrat war und für den Dichloroasterrinsäuremethylester die aktivste. Durch die unterschiedliche Methylierung von Hydroxy- bzw. Carboxylgruppen unterscheiden sich die drei Verbindungen in ihren elektrochemischen Charakteristika. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Spezifität.

Neben den carboxylierten natürlichen Diphenylethern, kommen auch Diphenylether in Pilzen vor, die keine Carboxy-Gruppe tragen. Diese Hydroxy-/Methoxy-Diphenylether werde ebenfalls, aber nicht ausschließlich, in einigen *Aspergillus* und *Penicillium* Spezies synthetisiert. Vor allem der natürliche Diphenylether Cyperin konnte aus mehreren Phytopathogenen isoliert werden (Venkatasubbaiah et al. 1992; Dayan et al. 2008).

### 3.6.9 Cyperin

Cyperin wurde ausschließlich aus Pflanzen assoziierten Pilzen isoliert und zeigte auch physiologische Effekte auf Pflanzen (1.4 Natürliche Diphenylether; Dayan et al. 2008). Somit stellte es in dieser Arbeit eine Kandidatenverbindung dar, für die Klärung von möglichen evolutionären Adaptionen der pflanzlichen GSTs gegenüber phytotoxischen Diphenylethern. Wie für Fluorodifen und auch für die Asterrinsäure wurde zunächst geklärt, ob das Glutathion-Konjugat der hydroxylierten natürlichen

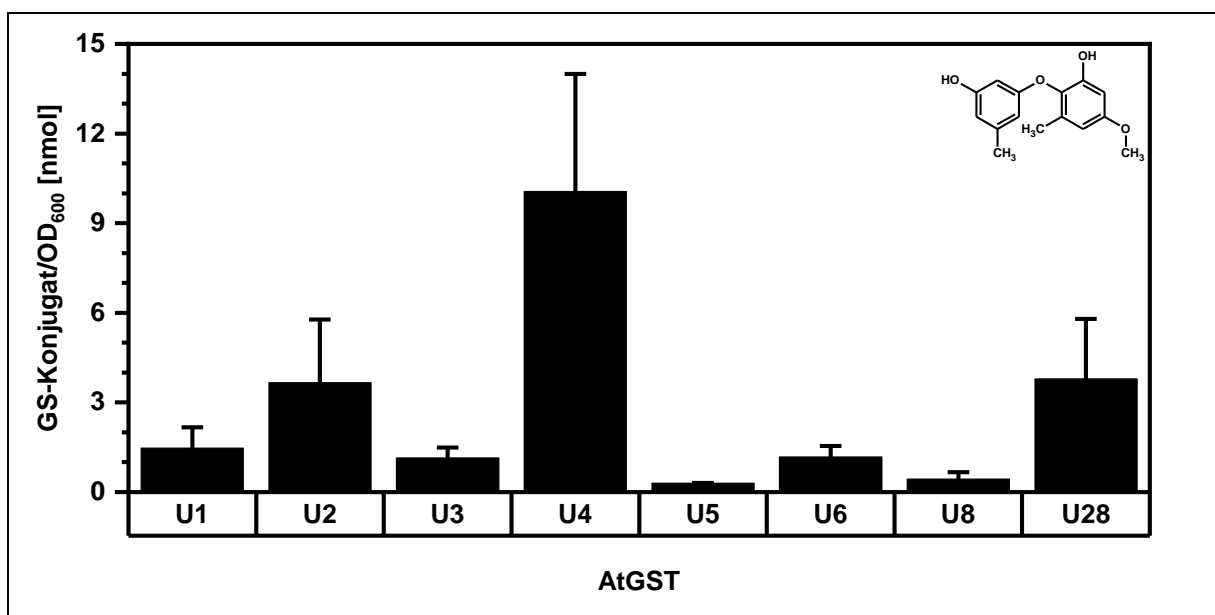
Diphenylether ebenfalls zu der etablierten Retentionszeit detektierbar war. Das Glutathion-Konjugat konnte bei einer Retentionszeit von 12 min detektiert werden (Abbildung 3-37).



**Abbildung 3-37: Chromatogramm Cyperin-GS-Konjugation**

Für die Bestimmung der Retentionszeit des Cyperin Glutathion-Konjugat wurden die AtGSTU4-Hefe und die eV-Kontrolle angezogen und mit Cyperin belastet (2.5.8.1 und 2.5.8.2). Anschließend wurde die Metabolite extrahiert und mittels HPLC analysiert (2.5.8.3, 2.5.8.4 und 2.7.2). Dargestellt ist ein repräsentatives Chromatogramm für die AtGSTU4 (rot) und die eV-Kontrolle (schwarz).

Auf Grundlage der chromatographischen Daten konnte die Aktivität der AtGSTs gegenüber Cyperin untersucht werden. Unter den getesteten AtGSTs zeigte die AtGSTU4 mit  $10 \pm 3,9$  nmol die höchste Aktivität (Abbildung 3-38). Neben der AtGSTU4 konjugierten auch die AtGSTU2 mit  $3,7 \pm 2,1$  nmol und die AtGSTU28 mit  $3,8 \pm 2,0$  nmol Cyperin.

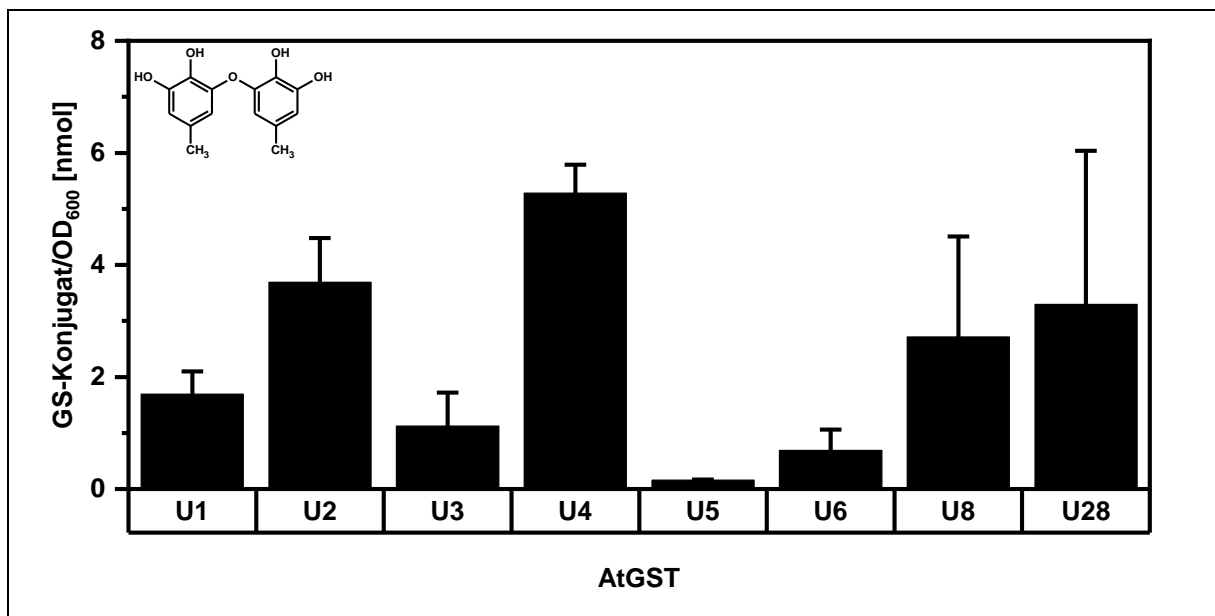


**Abbildung 3-38: GS-Konjugat von Cyperin durch AtGST**

Die Konjugationsanalyse für Cyperin durch die AtGST-exprimierenden Hefen erfolgte analog zu der Analyse von Asterrinsäure (Abbildung 3-29). Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung der Konjugat-Menge von drei unabhängigen Belastungen.

## 3.6.10 Violaceol I

Neben Cyperin wurden in dieser Arbeit auch die AtGST-Aktivität gegenüber den beiden Violaceolen getestet. Die beiden Violaceole sind Isomere zu einander. Für das Violaceol I war die AtGSTU4, wie bereits für Cyperin, die aktivste getestete AtGST (Abbildung 3-39). Auch die Aktivität der AtGSTU2 und der AtGSTU28 waren im Vergleich zu den anderen getesteten AtGSTs erhöht.

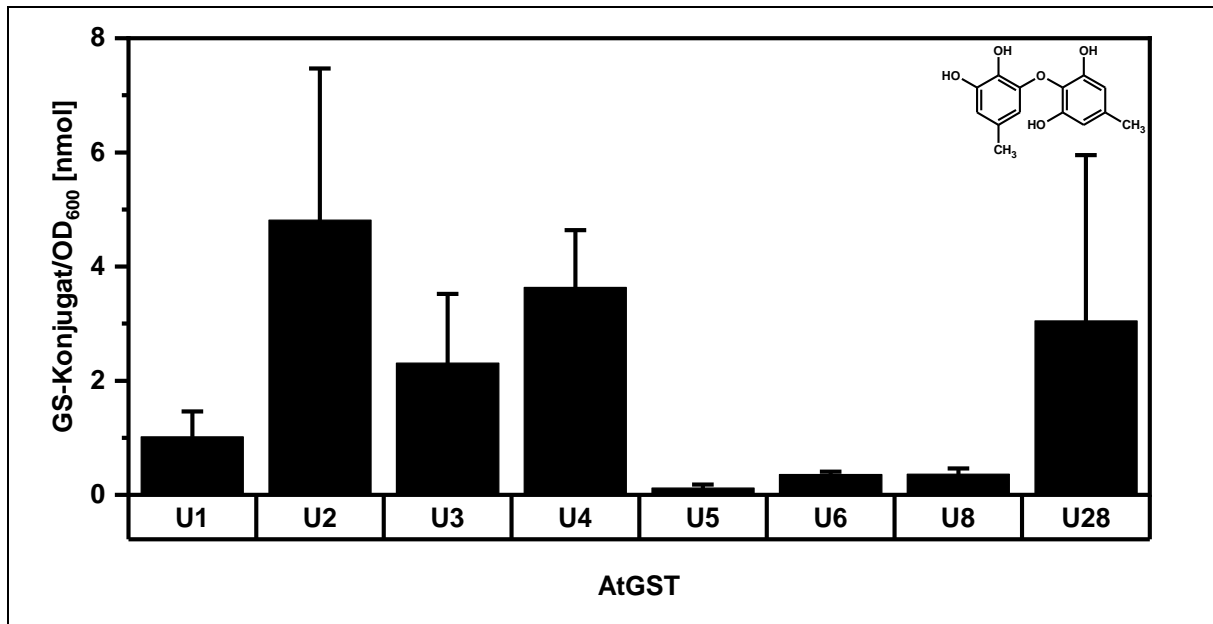
**Abbildung 3-39: GS-Konjugat von Violaceol I durch AtGST**

AtGST-exprimierende Hefen wurden, wie in Abbildung 3-29 beschrieben, angezogen und mit Violaceol I belastet. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung für drei unabhängige Belastungen.

Im Gegensatz zu Cyperin zeigte für Violaceol I ebenfalls die AtGSTU8 Aktivität. Strukturell unterscheidet sich Cyperin von Violaceol I und auch Violaceol II. Dieser Strukturunterschied könnte die unterschiedliche Aktivität erklären. Aber auch Violaceol I und Violaceol II zeigen Unterschiede in der Position der Ringsubstituenten auf. Durch diese kommt es zu unterschiedlichen Struktureigenschaften.

## 3.6.11 Violaceol II

Violaceol II ist ein Isomer von Violaceol I. Im Gegensatz zu Violaceol I wurde Violaceol II bevorzugt durch die AtGSTU2 konjugiert (Abbildung 3-40). Aber auch die AtGSTU4 und die AtGSTU28 zeigten Aktivität gegenüber Violaceol II. Neben diesen konjugierte auch die AtGSTU3 Violaceol II mit Glutathion.



**Abbildung 3-40: GS-Konjugat von Violaceol II durch AtGST**

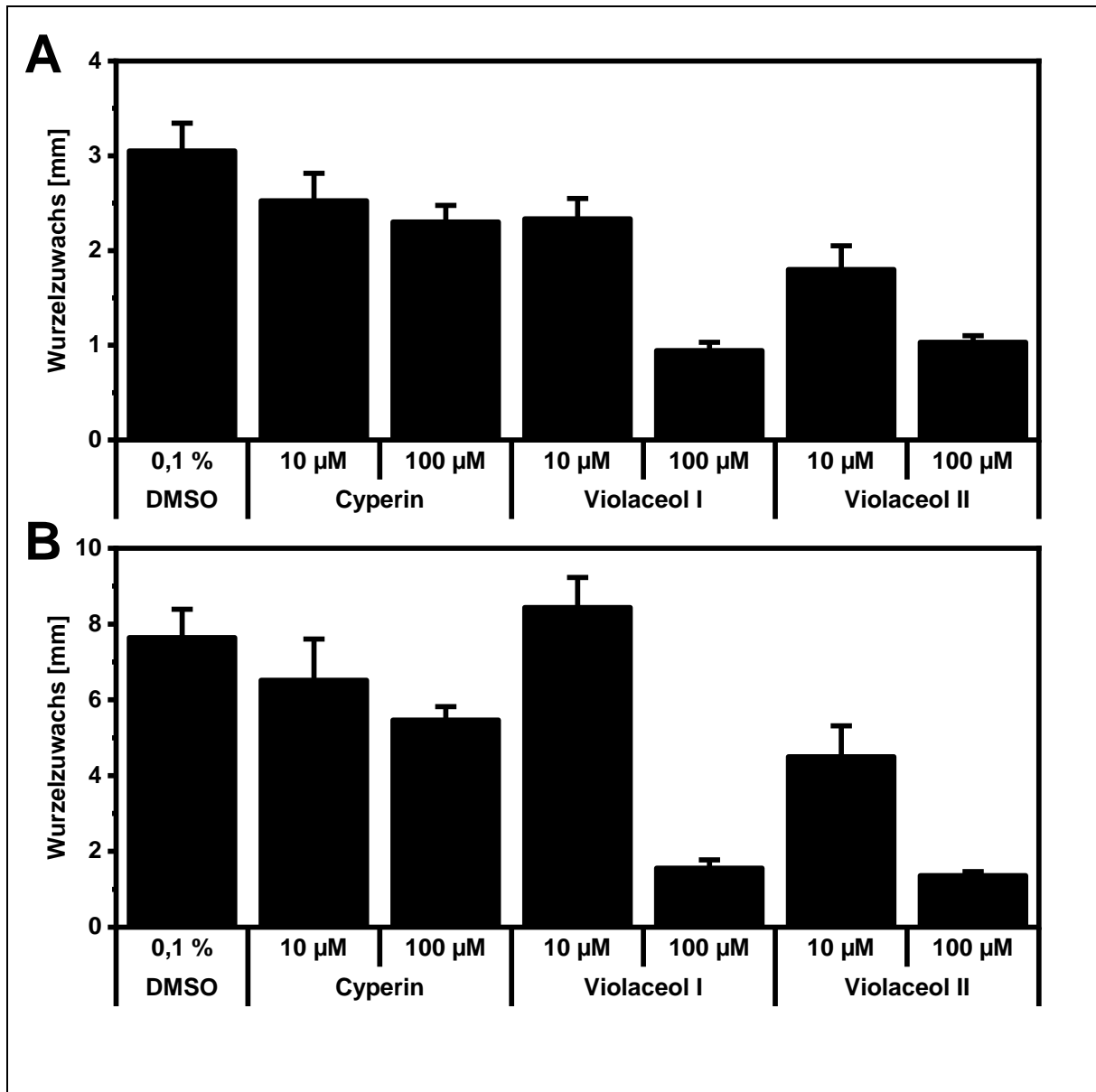
Analog zur Belastung mit Asterrinsäure wurden AtGST-exprimierende Hefen mit Violaceol II belastet (Abbildung 3-29). Dargestellt sind die Einzelergebnisse dieser Belastung.

Violaceol I und Violaceol II sind nicht nur Isomere, sondern werden stets zusammen aus Pilzen isoliert. Einige dieser Pilze sind mit Pflanzen assoziiert (Nuankeaw et al. 2020). Beide Verbindungen zeigen eine antimikrobielle Wirkung (Li et al. 2015; Nuankeaw et al. 2020). Eine Wirkung auf Pflanzen und im speziellen auf Wirtspflanzen ist bisher nicht beschrieben. Jedoch ist anzunehmen, dass die Entgiftung von natürlichen Diphenylethern auf eine evolutionäre Adaption zurückzuführen ist.

Die physiologische Wirkung aller natürlichen Diphenylether auf Pflanzen ist bisher nur in wenigen Fällen bekannt (4.1 Detoxifizierende Rolle der GSTs; Venkatasubbaiah et al. 1992; Hargreaves et al. 2002; Dayan et al. 2008). Vor allem die Wirkung von Cyperin auf Pflanzen wurde mehrfach untersucht (Venkatasubbaiah et al. 1992; Dayan et al. 2008). Um die Wirkung einiger natürlichen Diphenylether zu testen, wurden *A. thaliana* Keimlinge mit diesen belastet und anschließend der Wurzelzuwachs bestimmt.

### 3.6.12 Wirkung der natürlichen Diphenylether auf *Arabidopsis thaliana*

Für die Wirkung der natürlichen Diphenylether wurden Samen auf MS-Platten und anschließend auf MS-Platten mit der entsprechenden Konzentration an natürlichen Diphenylethern umgesetzt. Nach vier und elf Tagen wurde jeweils der Wurzelzuwachs bestimmt. Für Cyperin ist bereits eine inhibierende Wirkung auf das Wurzelwachstum von *A. thaliana* bekannt (Dayan et al. 2008). Neben der Wirkung von Cyperin wurden ebenfalls die Wirkung der beiden Verbindungen Violaceol I und Violaceol II getestet. Nach einem und nach vier Tagen wurde jeweils der Wurzelzuwachs bestimmt (Abbildung 3-41).



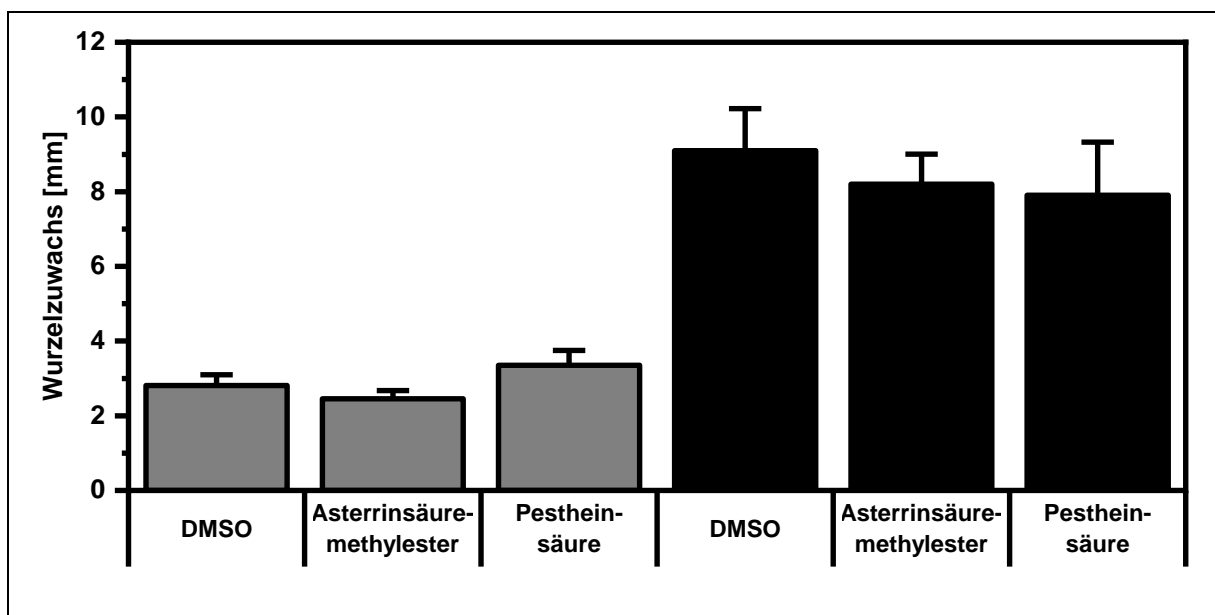
**Abbildung 3-41: Wirkung von Cyperin, Violaceol I und Violaceol II auf das Wurzelzuwachs von *A. thaliana***

Auf MS-Platten wurden *Arabidopsis thaliana* Samen, wie unter 2.6.1 beschrieben, ausgebracht. Anschließend wurden die Keimlinge auf Platten mit Cyperin, Violaceol I oder Violaceol II sowie DMSO umgesetzt (2.6.2) und deren Wurzelwachstum bestimmt (2.6.3). Dargestellt ist der Mittelwert des Wurzelzuwachses von 12 bis 15 Keimlingen und der Standardfehler des Mittelwerts nach (A) einem bzw. (B) vier Tagen.

Zwar zeigte Cyperin eine Wirkung auf das Wurzelwachstum, jedoch war dies im Vergleich zu den publizierten Daten weniger stark (Dayan et al. 2008). In der Literatur wird ein  $IC_{50}$  von  $38,4 \pm 3,8$  nmol nach zwölf Tagen angegeben. Das Wurzelwachstum war in dieser Arbeit um  $28,5 \pm 4,7$  % im Vergleich zur Kontrolle bei 100 µM Cyperin am vierten Tag reduziert (Abbildung 3-41, B). Jedoch war der Effekt sowohl von Violaceol I als auch von Violaceol II deutlich stärker. Am ersten Tag nach der Belastung sank das Wurzelwachstum auf  $30,9 \pm 2,9$  % bzw.  $33,8 \pm 0,23$  % die 100 µM Violaceol I bzw. Violaceol II. Nach vier Tagen wurde bei einer Konzentration von 100 µM ein Wurzelzuwachs von  $20,3 \pm 2,9$  % für Violaceol I und von  $17,9 \pm 1,4$  % für Violaceol II bestimmt (Abbildung 3-41, B).



Die Wirkung der carboxylierten natürlichen Diphenylether auf das Wurzelwachstum wurde exemplarisch anhand des Asterrinsäuremethylester und der Pestheinsäure durchgeführt. Während Asterrinsäuremethylester keine Wirkung auf die Keimung von Kresse hatte (Hargreaves et al. 2002), konnte bereits für Pestheinsäure gezeigt werden, dass dieser Diphenylether das Wurzelwachstum von Salat- und Reiskeimlingen steigern kann (Shimada et al. 2001). Pestheinsäure führte nach einem Tag zu einem um  $1,19 \pm 0,14$ -fachen Anstieg des Wurzelwachstums (Abbildung 3-42). Jedoch sank das Wurzelwachstum nach vier Tagen auf  $86,85 \pm 15,64$  % ab. Die Belastung mit  $100 \mu\text{M}$  Asterrinsäure führte zu einer Abnahme des Wurzelwachstums. Am ersten Tag betrug der Wurzelzuwachs  $87,4 \pm 12,6$  % und am vierten Tag  $90,2 \pm 8,9$  %. Somit konnte für alle fünf getesteten natürlichen Diphenylether gezeigt werden, dass sie eine physiologische Wirkung auf den Wurzelzuwachs haben.



**Abbildung 3-42: Wirkung von Asterrinsäuremethylester und Pestheinsäure auf den Wurzelzuwachs von *A. thaliana***

Wie in Abbildung 3-41 wurden *A. thaliana* Keimlinge auf MS-Platten ausgebracht und anschließend auf MS-Platten mit  $100 \mu\text{M}$  Asterrinsäuremethylester oder  $100 \mu\text{M}$  Pestheinsäure umgesetzt. Nach einem Tag (grau) bzw. vier Tagen (schwarz) wurde jeweils der Wurzelzuwachs bestimmt. Gezeigt werden der Mittelwert und der Standardfehler von 12 bis 15 Keimlingen.

### 3.7 Natürliche Variation des GSTU5 Gens

Neben der GST-Aktivität gegenüber Diphenylether-Herbizide wurden in dieser Arbeit, aufbauend auf vorherigen Arbeiten (Kowalski 2016), ebenfalls die Aktivität gegenüber Triazin-Herbizide untersucht. Bisher konnte gezeigt werden, dass die *AtGSTU5* die aktivste *AtGST* war. Zudem waren die *AtGSTU18* und die *AtGSTU22* für die Triazin-Herbizide aktiv (Kowalski 2016). Auf Grundlage dieser Spezifität sind die Triazine eine interessante Stoffklasse für die Untersuchung der Substratspezifität der pflanzlichen GSTs.

Während für die Diphenylether neben den anthropogenen auch natürliche Verbindungen bekannt sind (1.4 Natürliche Diphenylether und 3.6 GS-Konjugation von natürlichen Diphenylethern), konnten für die Triazine keine natürlichen Verbindungen gefunden werden. Hierfür wurde einerseits die PubChem-Datenbank (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>; Kim et al. 2019), andererseits der *Natural Products Atlas* (<https://www.npatlas.org/>; van Santen et al. 2022) verwendet. Während die PubChem-Datenbank sowohl anthropogene als auch natürliche Verbindungen enthält, umfasst der *Natural Products Atlas* ausschließlich natürliche Verbindungen aus Mikroorganismen. Eine Struktursuche mit dem 1,3,5-Tirazin als Substruktur ergab keine Triazin-Herbizid-ähnlichen natürlichen Verbindungen.

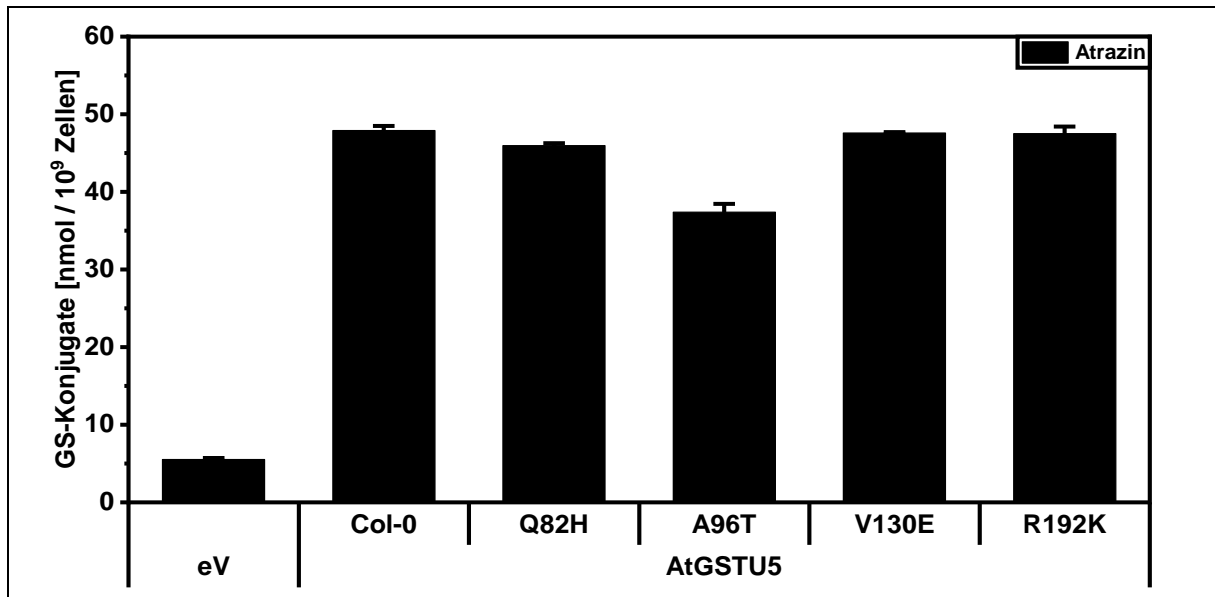
Ein weiterer Aspekt der Untersuchung von der Substratspezifität der GSTs ist das Auftreten von natürlich auftretenden Polymorphismen in der Speziespopulation. Sogenannten Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP: *single nucleotide polymorphism*) treten in unterschiedliche Akzessionen von Organismen auf und können entweder eine stille Mutation oder ein Aminosäureaustausch darstellen (Weigel und Mott 2009; Atwell et al. 2010). Stille Mutation werden als synonyme SNPs bezeichnet, während ein Aminosäureaustausch als nicht-synonymer SNP bezeichnet wird. Solche nicht-synonyme SNPs stellen eine evolutionäre Anpassung an die Umgebung dar und können zu veränderten Resistenzen gegenüber biotischen und abiotischen Stressfaktoren führen. Für das *AtGSTU5*-Gen gibt es beispielsweise vier nicht-synonyme SNPs gegenüber der Col-0 Akzession (Tabelle 3-1). Dabei bildet die Variante V130E mit 865 Akzessionen die Majorität, während der Col-0-Typ die Minorität darstellt.

**Tabelle 3-1 Nicht-synonyme SNPs der AtGSTU5**

Dargestellt sind die nicht-synonyme SNPs der AtGSTU5, die Anzahl der Akzessionen in denen dieser SNP vorkommt, sowie deren geografische Lage. Zu sehen ist, dass die Variante V130E die am häufigsten auftretende Form ist und weltweit gefunden werden kann.

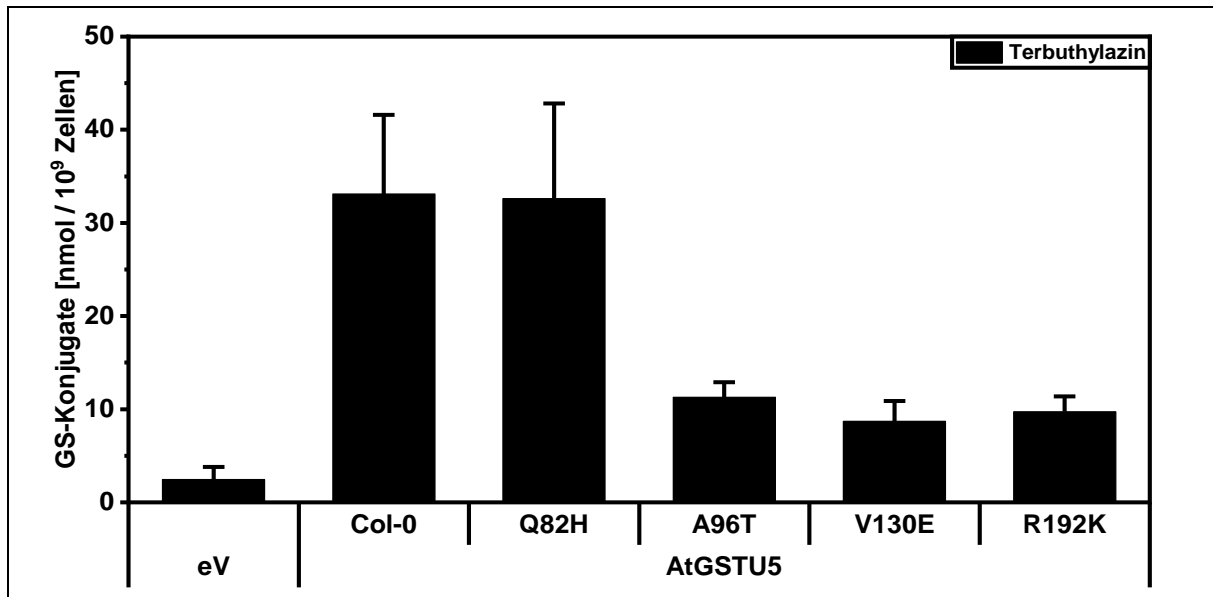
AtGSTU5 SNP	Anzahl der Akzessionen	Geografische Lage
Q82H	36	BUL, CZE, ESP, GER, POR, ROU, RUS, SRB, SVK, UK, USA, SWE
A96T	94	AUT, CZE, ESP, EST, FRA, GER, ITA, NED, NOR, POR, SWE, UK, USA
V130E	865	AFG, ARM, AUT, AZE, BEL, BUL, CAN, CHN, CPV, CRO, CZE, DEN, ESP, EST, FIN, FRA, GEO, GRC, IND, IRN, ITA, JPN, KAZ, KGZ, LBN, LTU, MAR, NED, NOR, POL, POR, ROU, RUS, SRB, SUI, SVK, SWE, TJE, TUR, UK, UKR, USA, UZB
R192K	39	AUT, BUL, CPV, CZE, ESP, FRAU, GEO, GER, ITA, ROU, SVK, SWE, UK

Da es sich bei SNPs um Adaptionen an die Umgebung handeln kann, könnten sich die SNPs der AtGSTU5 in ihrer Aktivität gegenüber einzelnen Herbiziden unterscheiden. Für die AtGSTU5 aus Col-0 konnte gezeigt werden, dass diese die Triazin-Herbizide konjugiert (Kowalski 2016). Um zu überprüfen, ob die natürlich auftretenden nicht-synonymen SNPs der AtGSTU5 sich von der Aktivität der Col-0 Variante gegenüber den Triazin-Herbiziden unterscheidet, wurden diese nicht-synonymen SNPs wie bereits die Col-0 Varianten in die siebenfach Hefe-Mutante transformiert (Krajewski et al. 2013). Es konnte gezeigt werden, dass alle getesteten AtGSTU5-SNPs das Triazin-Herbizid Atrazin konjugieren konnten (Abbildung 3-43). Die GSTU5 A96T zeigte eine verringerte Konjugationmenge im Vergleich zu den anderen getesteten SNPs.



**Abbildung 3-43: Atrazin-Glutathion-Konjugation durch AtGSTU5 SNPS heterolog exprimiert in Hefe**  
Mittels SDM (site directed mutagenesis; 2.5.2) wurden die nsSNPs in der kodierenden Sequenz der AtGSTU5 im pSH62-Vektor kloniert und in Hefe transformiert (2.5.7.4). Für je drei unabhängige Transformationen angezogen (2.5.8.1) und jeweils drei unabhängige Belastungen mit Atrazin durchgeführt (2.5.8.2). Anschließend wurden die Hefen geerntet und analysiert (2.5.8.3, 2.5.8.4 und 2.7.2). Dargestellt ist der Mittelwert aller Proben und der Standardfehler.

Das Triazin-Herbizid Atrazin kommt in Europa auf dem Feld nicht mehr zum Einsatz, während es weltweit jedoch noch verwendet wird. In Europa wurde Atrazin durch das Herbizid Terbuthylazin ersetzt. Auch Terbuthylazin, wie alle andern Triazin-Herbizide, wird hauptsächlich durch die AtGSTU5 aus Col-0 mit Glutathion konjugiert (Kowalski 2016). Die Analyse der Konjugation von Terbuthylazin durch die nicht-synonymen SNP-Varianten der AtGSTU5 ergab, dass wie bei Atrazin die Col-0 Variante und die AtGSTU5 Q82H annähernd gleichen Umsatz zeigten (Abbildung 3-44). Zudem zeigte sich, dass die AtGSTU5 A96T eine geringe Aktivität gegenüber Terbuthylazin hatte als die AtGSTU5-Variante aus Col-0. Dies konnte ebenfalls für Atrazin in geringem Maß beobachtet werden. Im Gegensatz zu Atrazin zeigten die AtGSTU5 V130E und AtGSTU5 R192K, wie die AtGSTU5 A96T, verringerte Konjugatmengen für Terbuthylazin.



**Abbildung 3-44. Terbutylazin-Glutathion-Konjugation durch AtGSTU5 SNPs heterolog exprimiert in Hefe**  
Anstelle von Atrazin wurden die AtGST-exprimierenden Hefen, die in Abbildung 3-43 beschrieben sind, wie in Abbildung 3-43 mit Terbutylazin belastet. Dargestellt ist der Mittelwert von drei unabhängigen Belastungen von drei unabhängigen Transformation und der Standardfehler.

Neben den natürlich auftretenden nicht-synonymen SNPs können sich auch die orthologen Gene von verwandten Spezies in ihrer Aktivität unterscheiden. Der nächste Verwandte von *Arabidopsis thaliana* ist *Arabidopsis lyrata* (Koch und Matschinger 2007; Hu et al. 2011). Auf Proteinebene weisen die GSTU5 von *A. thaliana* und *A. lyrata* einige Unterschiede auf (Abbildung 3-45). Zwei der nicht-synonymen SNPs die in *A. thaliana* Akzessionen auftreten, treten auch im AtGSTU5 -Protein auf (Q82H und R192K). Die unterschiedliche Aminosäure an Position 56 betrifft die G-Site des GSTU5-Proteins. Hier befindet sich in der *A. lyrata* Variante ein Isoleucin anstelle von Valin. Zudem betrifft der Unterschied an Position 113 die H-Site. In der AtGSTU5 wird hier eine Valin kodiert während bei der *A. lyrata* eine Isoleucin vorhanden ist. Zudem tritt die in einigen Akzessionen auftretende Mutation an Position 192 ebenfalls in der AtGSTU5 auf (Abbildung 3-45). Die Mutation der H-Site könnte die Substratspezifität beeinflussen. Zudem zeigte der nicht-synonyme SNPs mit der R192K-Mutation verringerte Aktivität gegenüber Terbutylazin.

```

AtGSTU5      MAEKEEVKLLGIWASPFSSRRVEMALKLKGIPYEYVEEIL
AtGSTU5Q82H  MAEKEEVKLLGIWASPFSSRRVEMALKLKGIPYEYVEEIL
AtGSTU5A96T  MAEKEEVKLLGIWASPFSSRRVEMALKLKGIPYEYVEEIL
AtGSTU5V130E MAEKEEVKLLGIWASPFSSRRVEMALKLKGIPYEYVEEIL
AtGSTU5R192K MAEKEEVKLLGIWASPFSSRRVEMALKLKGIPYEYVEEIL
AlGSTU5      MAEKDQVKLLGIWASPFSSRRVEMALKLKGIPYEYVEEIL
              **** : *****

AtGSTU5      ENKSPLLLALNPIHKKVPVLVHNGKTILESHVILEYIDE
AtGSTU5Q82H  ENKSPLLLALNPIHKKVPVLVHNGKTILESHVILEYIDE
AtGSTU5A96T  ENKSPLLLALNPIHKKVPVLVHNGKTILESHVILEYIDE
AtGSTU5V130E ENKSPLLLALNPIHKKVPVLVHNGKTILESHVILEYIDE
AtGSTU5R192K ENKSPLLLALNPIHKKVPVLVHNGKTILESHVILEYIDE
AlGSTU5      ENKSPLLLALNPIHKKIPVLVHNGKTILESHVILEYIDE
              ***** : *****

AtGSTU5      TWPQNPILPQDPYERSKARFFAKLVDEQIMNVGFISMAR
AtGSTU5Q82H  TWPHNPILPQDPYERSKARFFAKLVDEQIMNVGFISMAR
AtGSTU5A96T  TWPQNPILPQDPYERSKTRF FAKLVDEQIMNVGFISMAR
AtGSTU5V130E TWPQNPILPQDPYERSKARFFAKLVDEQIMNVGFISMAR
AtGSTU5R192K TWPQNPILPQDPYERSKARFFAKLVDEQIMNVGFISMAR
AlGSTU5      TWPHNPILPQDPYERSKARFFAKLVDEQIMNVGFVSMAR
              *** : ***** : ****

AtGSTU5      ADEKGREVLAEQVRELIMYLEKELVGKDYFGGKTVGFLD
AtGSTU5Q82H  ADEKGREVLAEQVRELIMYLEKELVGKDYFGGKTVGFLD
AtGSTU5A96T  ADEKGREVLAEQVRELIMYLEKELVGKDYFGGKTVGFLD
AtGSTU5V130E ADEKGREVLAEQERELIMYLEKELVGKDYFGGKTVGFLD
AtGSTU5R192K ADEKGREVLAEQVRELIMYLEKELVGKDYFGGKTVGFLD
AlGSTU5      ADEKGREVLAEQARELIMYLEKELVGKDYFGGKTVGFLD
              ***** . *****

AtGSTU5      FVAGSLIPFLCLERGWEGIGLEVITEEKFPFKRWVRNLE
AtGSTU5Q82H  FVAGSLIPFLCLERGWEGIGLEVITEEKFPFKRWVRNLE
AtGSTU5A96T  FVAGSLIPFLCLERGWEGIGLEVITEEKFPFKRWVRNLE
AtGSTU5V130E FVAGSLIPFLCLERGWEGIGLEVITEEKFPFKRWVRNLE
AtGSTU5R192K FVAGSLIPFLCLERGWEGIGLEVITEEKFPFKRWVKNLE
AlGSTU5      FVAGSLIPFLCLERGWEGIGLEVITEEKFPFKRWVKNLE
              ***** : ***

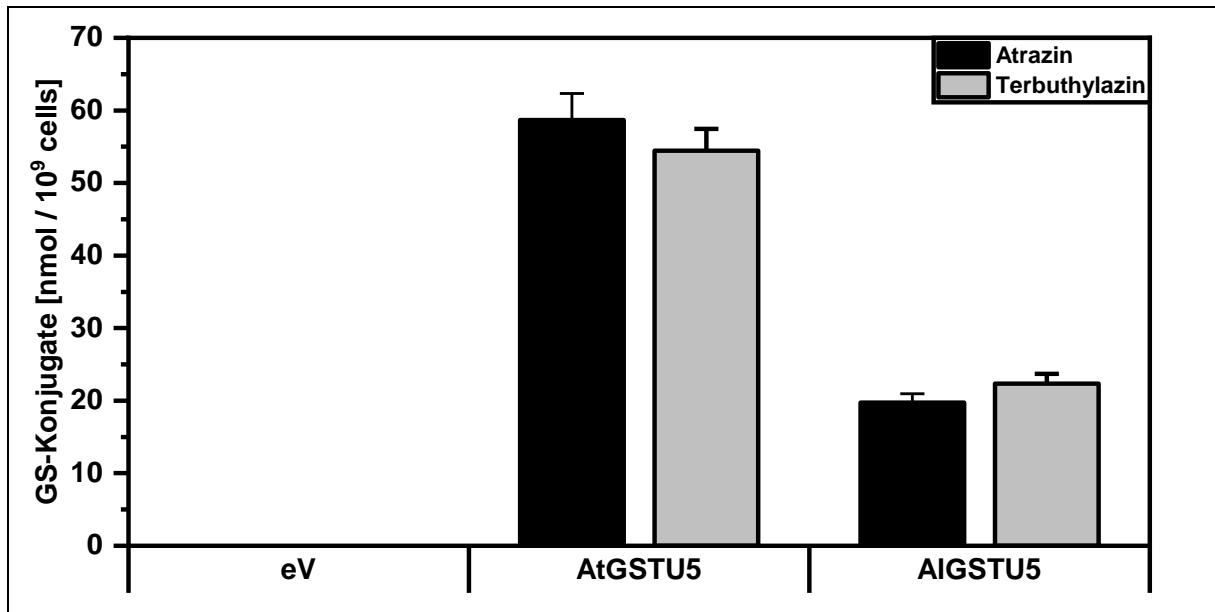
AtGSTU5      KVEIVKDCVPPREEHVEHMNYMAERVRSS
AtGSTU5Q82H  KVEIVKDCVPPREEHVEHMNYMAERVRSS
AtGSTU5A96T  KVEIVKDCVPPREEHVEHMNYMAERVRSS
AtGSTU5V130E KVEIVKDCVPPREEHVEHMNYMAERVRSS
AtGSTU5R192K KVEIVKDCVPPREEHVEHMNYMAERVRSS
AlGSTU5      KVEIVKDCVPPREKHVEHMNYMAERVRSS
              ***** : *****

```

**Abbildung 3-45: Sequenzvergleich von AtGSTU5 nsSNPs und AIGSTU5**

Das GSTU5-Protein aus *A. thaliana* (AtGSTU5) und *A. lyrata* (AIGSTU5) unterschieden sich durch acht Aminosäuren. Die Unterschiede sind grün hervorgehoben. In violett sind die jeweiligen Aminosäureaustausche, hervorgerufen durch die nsSNPs, markiert.

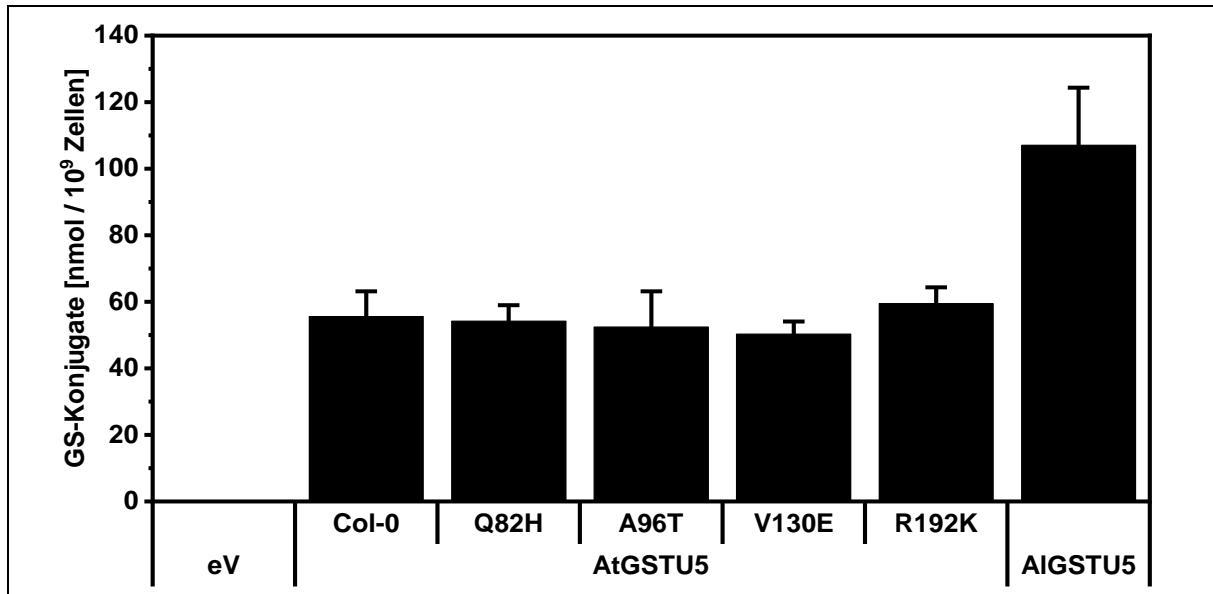
Die AIGSTU5 zeigte für Atrazin eine Reduktion der Aktivität von  $66,3 \pm 2,1$  % und für Terbutylazin eine Aktivitätsreduktion von  $58,9 \pm 2,4$  % im Vergleich zur AtGSTU5 (Abbildung 3-46). Das wiederum könnte bedeuten, dass es in der evolutionären Entwicklung die AtGSTU5 Anpassungen eventuell an Umweltfaktoren gab.

**Abbildung 3-46: Atrazin- und Terbutylazin-Glutathion-Konjugation durch AIGSTU5 heterolog exprimiert in Hefe**

Von *Arabidopsis lyrata* wurde RNA isoliert (2.5.1.4) und diese in cDNA umgeschrieben (2.5.1.5). Die kodierende Sequenz der AIGSTU5 wurde anschließend amplifiziert und in den entsprechenden Hefe-Vektor kloniert. Nach der Hefe-Transformation wurden jeweils für die AtGSTU5- als auch die AIGSTU5-exprimierenden Hefe drei Transformationen angezogen (2.5.8.1). Je Kolonie wurden drei Belastungen mit Atrazin oder Terbutylazin durchgeführt (2.5.8.2). Dargestellt ist der Mittelwert der Konjugat-Menge bezogen auf die Zellzahl der neun Belastungen mit dem Standardfehler.

Um ausschließen zu können, dass die Unterschiede in der Menge an Atrazin- und Terbutylazin-GS-Konjugaten nicht auf unterschiedlich starke Expression oder Translation der Gene zurückzuführen wären, wurden die Hefe-Stämme mit CDNB belastet. CDNB ist ein Marker-Substrat für GSTs (Petřivalský et al. 1997) und wird durch die meisten AtGSTs konjugiert (3.3 GS-Konjugation von Herbiziden durch AtGSTs in Hefe; Krajewski et al. 2013). Es konnte gezeigt werden, dass alle AtGSTU5-Varianten die gleiche Menge an GS-DNB-Konjugat produzierten (Abbildung 3-47). Einzig die AIGSTU5 produzierte im Vergleich zu allen AtGSTU5-Varianten im Mittel zweimal mehr Konjugat. Für die Expression oder Translation der GSTU5-Varianten bedeutet dies, dass die Proteinmenge für alle AtGSTU5-Varianten in den Hefen gleich sein sollten. Dass die Menge an GS-DNB-Konjugat für die AIGSTU5 sich unterscheidet, spricht nicht zwingend für eine höhere Proteinmenge. Auch könnte die

*A/GSTU5* das Marker-Substrat besser konjugieren. Vor allem da diese GST wenige Konjugat für die beiden Triazin-Herbizide Atrazin und Terbutylazin produzierte.

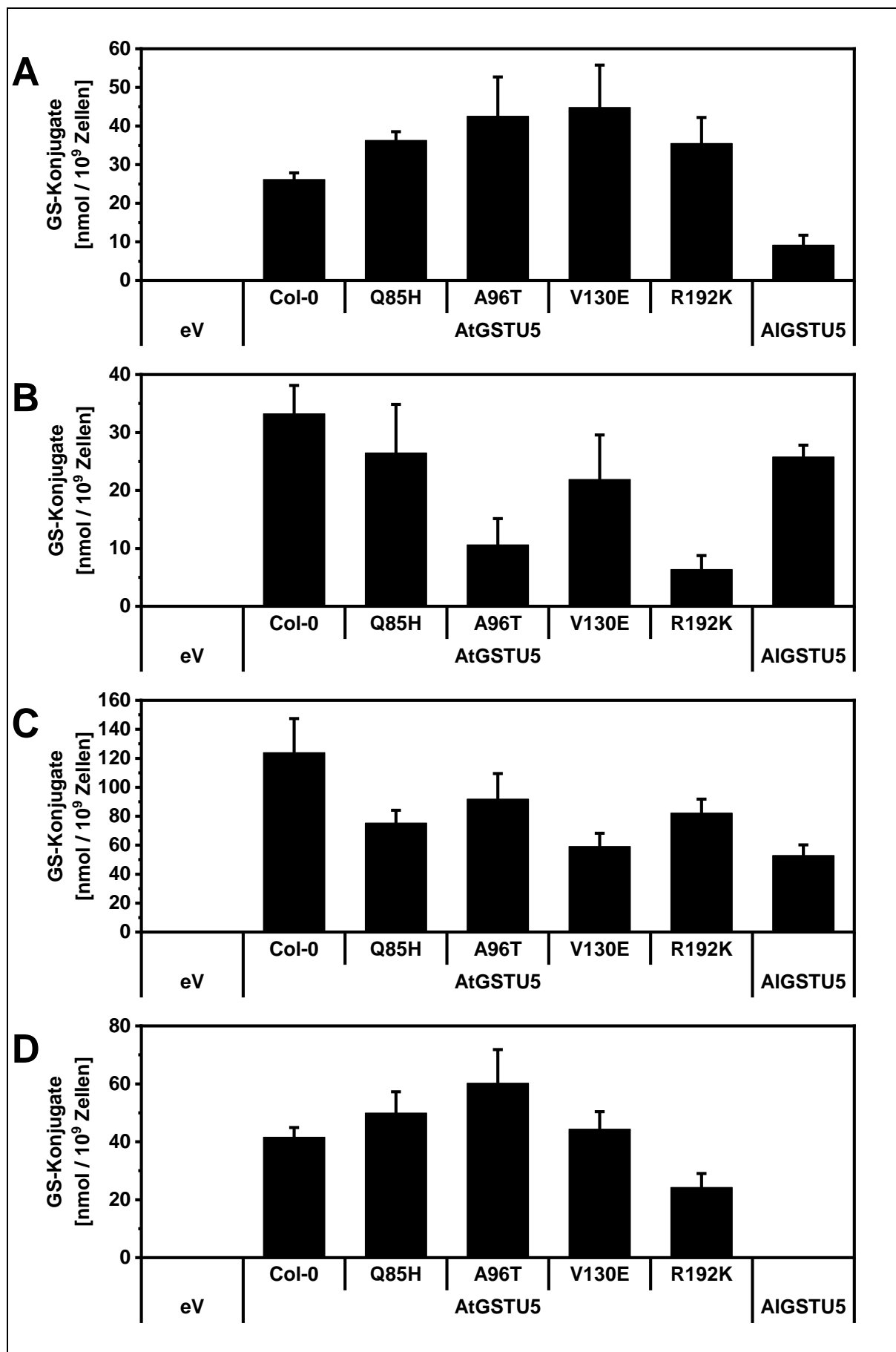


**Abbildung 3-47: CDNB-Glutathion-Konjugation durch die *AtGSTU5* SNPs und *A/GSTU5* heterolog exprimiert in Hefe**

Die in Abbildung 3-43 und Abbildung 3-46 beschriebenen Hefe-Stämme wurden mit CDNB belastet. Es wurden je zwei unabhängige Transformationen in einer Vorkultur angezogen. Anschließend wurden je Vorkultur drei Kulturen mit CDNB belastet und nach 24 h geerntet. Dargestellt ist der Mittelwert der sechs Belastungen sowie der Standardfehler bezogen auf die Zellzahl.

Neben Atrazin und Terbutylazin umfasst die Klasse der Triazin-Herbizide noch Simazin, Propazin, Sebuthylazin und Cyanazin. Für diese wurde in vorherigen Arbeiten gezeigt, dass diese durch die *AtGSTU5* konjugiert werden (Kowalski 2016). Wie für Atrazin und Terbutylazin zeigten die *AtGSTU5* Varianten und auch die *A/GSTU5* unterschiedliche Aktivität gegenüber den weiteren Triazin-Herbiziden (Abbildung 3-48). Sowohl Simazin als auch Cyanazin wurden durch die *A/GSTU5* nur wenig oder nicht mit Glutathion konjugiert, während die *AtGSTU5* SNPs mehr Konjugat bildeten als die Col-0 Variante, mit Ausnahme der *AtGSTU5* R192K gegenüber Cyanazin (Abbildung 3-48 A und D). Die höchste Konjugatmenge für Simazin wies die *AtGSTU5* V130 mit dem  $1,7 \pm 0,4$ -fachen Konjugatmenge als die Col-0 Variante auf. Mit der  $1,4 \pm 0,3$ -fachen Konjugatmenge war für Cyanazin die *AtGSTU5* A96T die aktivste Variante. Die Konjugatmenge von Cyanazin, durch die *AtGSTU5* R192K katalysiert, betrug  $58,2 \pm 11,7$  %.





**Abbildung 3-48: Triazin-Glutathion-Konjugation durch die AtGSTU5 SNPs und AIGSTU5 heterolog exprimiert in Hefe**

Die AtGSTU5 Varianten und AIGSTU5 exprimierenden Hefen wurden in einer Vorkultur über Nacht angezogen. Anschließend wurden die Kulturen für die Gen-Expression für fünf Stunden in  $SD_{Gal}$  Medium angezogen und mit  $10 \mu M$  der Triazin-Herbiziden **A) Simazin**, **B) Propazin**, **C) Sebuthylazin** und **D) Cyanazin** belastet. Die Konjugatmenge wurde analytisch mittels HPLC bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert von jeweils drei Kulturen von je zwei unabhängigen Kolonien je GSTU5-Variante und der Standardfehler.

Auch die beiden anderen Triazin-Herbizide Propazin und Sebuthylazin wurden durch die AIGSTU5 in geringeren Mengen konjugiert. Die AIGSTU5 bildete  $77,6 \pm 6,2$  % der Konjugatmenge für Propazin im Vergleich zur Col-0 Variante und  $42,7 \pm 5,9$  % der Konjugatmenge für Sebuthylazin (Abbildung 3-48 B und C). Jedoch zeigten auch einige der AtGSTU5 SNPS für Propazin und Sebuthylazin eine Reduktion der GS-Konjugatmenge (Abbildung 3-48 B und C). Im Speziellen war die Propazin-Glutathion-Konjugatmenge der AtGSTU5 A96T um  $68,1 \pm 13,6$  % und der AtGSTU5 R192K um  $80,9 \pm 7,3$  % reduziert. Für Sebuthylazin zeigten alle AtGSTU5 Varianten eine Reduktion der Konjugation gegenüber der Col-0 Variante (Abbildung 3-48 D).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Triazin-Herbizide nicht nur durch die AtGSTU5 aus Col-0 sondern auch durch AtGSTU5-Varianten aus anderen Akzessionen konjugiert werden können, auch wenn das mögliche Auftreten von mehreren nicht-synonymen SNPs in einer Akzession vorerst außer Acht gelassen wurde. Jedoch war die durch die AtGSTU5-Varianten gebildete Menge an Glutathion-Konjugat der Herbizide in den meisten Fällen im Vergleich zur der Col-0 reduziert, während alle Varianten für CDNB die gleiche Menge konjugierten. Die AIGSTU5 konjugierte die Herbizide in deutlich geringerer Menge als die AtGSTU5. Dies legt nahe, dass es evolutionäre Veränderungen gab, die eine Substratspezifität generierten.

### 3.8 CRISPR/Cas

*In planta* weisen die GSTs vermutlich eine hohe funktionelle Redundanz auf (Dixon et al. 2009; Chen et al. 2012; Krajewski et al. 2013). Möglicherweise gibt es aus diesem Grund nur wenig beschriebene Phänotypen für die Verlustmutanten einzelner GSTs (Luhua et al. 2013; Renard et al. 2020). So weisen beispielsweise alle Einzel-Knock-Out-Linien der GSTs aus dem Gen-Cluster *AtGSTU1* bis *AtGSTU7*, mit Ausnahme der *GSTU4* (Santamaría et al. 2018), keinen bekannten Phänotypen auf. Jedoch ist zu vermuten, dass Knock-Outs von mehreren redundanten GSTs zu einem Phänotyp führten. Eine solche Redundanz wird für homologe GSTs erwartet (Dixon et al. 2009). In *A. thaliana* liegen einige GSTs in Gen-Clustern vor, die durch Genduplikation entstanden sind. Daher weisen Gene eines solchen Clusters hohe Homologien zu einander auf. Einer dieser Gen-Cluster ist der bereits genannte Cluster bestehend aus *AtGSTU1*, *AtGSTU2*, *AtGSTU3*, *AtGSTU4*, *AtGSTU5*, *AtGSTU6* und *AtGSTU7*. Dieser bildet den größten GST-Gen-Cluster in *A. thaliana*.

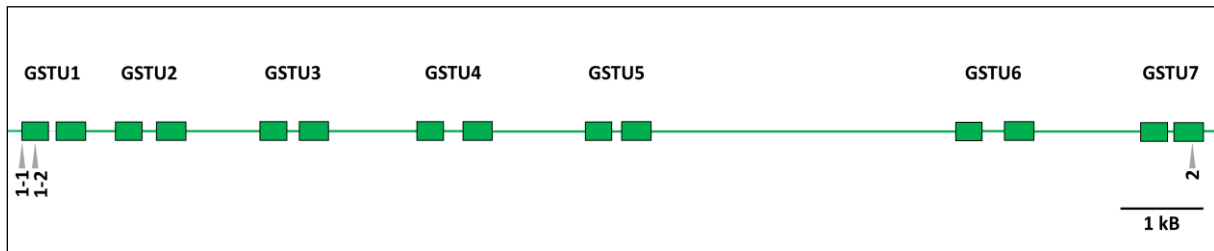
Multiple Knock-Outs von Genen aus solchen Clustern lassen sich, falls überhaupt, nur mit viel Aufwand durch Kreuzung von Einzel-Knock-Outs generieren. Das CRISPR/Cas9-System bietet eine Möglichkeit, um Multi-Knock-Out-Linien zu generieren. Im Folgenden wurden mit Fokus auf den *AtGSTU1* bis *AtGSTU7* Gen-Cluster und den Gen-Cluster *AtGSTU19* bis *AtGSTU23* mittels CRISPR/Cas9-Systeme eine Deletion dieser Gen-Cluster angestrebt. Diese Cluster sind interessant, da die Proteine dieser Gene hohe Sequenzähnlichkeiten aufweisen (6 Anhang, Tabelle 6-8 und Tabelle 6-9) und eine mögliche Redundanz der homologen Proteine existiert. Die Proteine des *AtGSTU1* bis *AtGSTU7* Gen-Clusters haben eine minimale Sequenzhomologie von 75 % (6 Anhang, Tabelle 6-8) und für die Proteine des *AtGSTU19* bis *AtGSTU23* beträgt die minimale Sequenzhomologie 76 % (6 Anhang, Tabelle 6-9).

#### 3.8.1 pDGE-System

Zur Generierung von CRISPR-Mutanten wurde das von Ordon und Kollegen entwickelte Cas9-System verwendet (Ordon et al. 2017). Bei diesem System wurde die Cas9, aus *Streptococcus pyogenes* Bakterien stammend (*SpCas9*), exprimiert. Unterschiedliche Promotoren zur Expression der *SpCas9* standen zur Verfügung. Der 35S-Promotor aus dem Blumenkohlmosaikvirus wies in der Arbeit von Ordon und Kollegen die höchste Wirksamkeit auf. Daher wurden entsprechende 35S-Vektoren zur Klonierung der Konstrukte zur Generierung der Clusterdeletion verwendet (Ordon et al. 2017).

Mit diesem CRISPR/Cas9-System sollten die beiden oben genannten Gen-Cluster deletiert werden. Hierfür wurde für beide Cluster entsprechende sgRNAs bestimmt und unterschiedliche Konstrukt-Varianten mit der *SpCas9* unter dem *CaMV 35S-Promotor* kloniert. Dabei wurde für das erste Gen des jeweiligen Gen-Clusters zwei unterschiedliche sgRNAs und für das letzte Gen eine sgRNA verwendet (Abbildung 3-49 und 6 Anhang, Abbildung 6-6). Die entsprechenden Sequenzen der Oligomere für

diese sgRNAs und für weitere in dieser Arbeit verwendeten sgRNA sind in Tabelle 6-2 zusammengefasst (6 Anhang). Durch die Kombination der drei sgRNAs war es möglich, unterschiedliche Konstrukt-Varianten zu generieren. Diese konnten anschließend auf ihre unterschiedliche Effizienz hin geprüft werden. Es wurden jeweils eine sgRNA des ersten Gens und die des letzten Gens in entsprechende Vektoren kloniert. Von diesen Vektoren ausgehend wurden die beiden sgRNAs in den entsprechenden Vektor mit der *SpCas9* integriert. Dieses Konstrukt wurde mittels Agrobakterien-vermittelter Transformation in *Arabidopsis thaliana* gebracht.



**Abbildung 3-49: AtGSTU1 bis AtGSTU7 Gen-Cluster**

Der Gen-Cluster GSTU1-GSTU7 bestehend aus den GSTU1, U2, U3, U4, U5, U6 und U7 befindet sich auf dem Chromosom 2. Jede dieser Tau GSTs besteht aus zwei Exons. Der Gen-Cluster erstreckt sich über einen Bereich von 14,6 kb. Für die Deletion des Gen-Clusters mittels CRISPR/Cas9 wurden zwei sgRNA die in der GSTU1-Gensequenz (1-1 und 1-2) binden, und eine, die in der Gensequenz der GSTU7 (2) bindet, verwendet.

Für beide Konstrukte, sgRNA U1-1 in Kombination mit sgRNA U7 und sgRNA U1-2 zusammen mit sgRNA U7, wurden jeweils zwei unabhängige Agrobakterien-vermittelte Transformationen durchgeführt. Das Saatgut aller Transformationen wurde mittels Basta-Screens auf die Primärtransformanten hin überprüft. In Summe wurden für diesen GST-Gen-Cluster 72 Primärtransformanten auf die Deletion des entsprechenden Gen-Clusters mittels PCR überprüft. Bei dieser Analyse konnten fünf Linien identifiziert werden, bei denen es zu einer Deletion des Gen-Clusters kam (6 Anhang, Tabelle 6-10). Hierdurch konnte gezeigt werden, dass das CRISPR/Cas9-System funktionell ist. Die entsprechenden Pflanzen-Linien wurden in der segregierenden Generation auf die Vererbung der Mutation hin überprüft (6 Anhang, Tabelle 6-10). Dabei war keine Vererbung der Mutation feststellbar. Dies konnte auf somatische Deletionen des entsprechenden Gen-Clusters in den Primärtransformanten zurückgeführt werden. Es stellte sich heraus, dass der verwendete *CaMV 35S-Promotor* vorzugsweise zu somatischen und zu nicht-vererbaren Mutationen führt, da dieser Promotor nur geringe Aktivität in den Gameten oder der Zygote besitzt (Wang et al. 2015).

Um flexibler in der Wahl der Promotoren sowie von unterschiedlicher Cas9-Orthologa zu sein, wurde im Zuge dieser Arbeit das CRISPR/Cas-System adaptiert. Hierzu wurden unterschiedliche Promotoren und Cas9-Orthologa in das *Multi-Kingdom Golden-Gate-System* (im Weiteren als GG-System bezeichnet; Binder et al. 2014; Chiasson et al. 2019) integriert.

### 3.8.2 Multi-Kingdom Golden-Gate basiertes Cas9-System

#### 3.8.2.1 Klonierung

Für die *in planta* Expression der Cas9-Orthologa aus *Streptococcus pyogenes* und *Staphylococcus aureus* (*SaCas9*) standen mehrere Vektor-Systeme zur Verfügung. Um ein einheitliches System zu entwickeln, in dem sowohl unterschiedliche Promotor- als auch Tag-Varianten möglich waren, wurden beide Cas9-Varianten in das GG-System integriert. Hierzu wurde die *SpCas9* aus dem pDGE-Vektorsystem des Stuttmann-Labors (Ordon et al. 2017) und die *SaCas9* aus dem pDe-Sa-Cas9-Vektor des Puchta-Labors (Wolter et al. 2018) amplifiziert und in den entsprechenden Vektor des GG-Systems kloniert.

Für das adaptierte CRISPR/Cas-System wurden folgende Level I Vektoren etabliert. Für die Expression der sgRNAs wurde der pAtU6-26 Promotor mit entsprechenden Restriktionsstellen und Überhängen verwendet (Tabelle 3-2). Bei dem pAtU6-26 handelt es sich um den Promotor für die U6 snRNA26 (*small nuclear RNA*). Die Transkription von snRNAs erfolgt durch die RNA Polymerase III. Es hat sich gezeigt, dass die Transkription von sgRNAs durch die RNA Polymerase III sehr hohe Effizienzen für CRISPR/Cas9-Systeme aufweisen (Wang et al. 2018a; Li et al. 2018a). Neben dem Promotor für die Transkription der sgRNA wurden die spezifischen tracrRNA für die *SpCas* aus dem pDGE-Vektor-System (Ordon et al. 2017) und für die *SaCas9* aus dem pEn-Sa-Chimera-Vektor (Wolter et al. 2018) mit den entsprechenden Restriktionsstellen und Überhängen eingebracht (Tabelle 3-2).

Für die Expression der beiden Cas9-Orthologa wurde aus dem pDGE-Vektor-System der eizellspezifische DD45-Promotor (Sprunck et al. 2012; Wang et al. 2015; Ordon et al. 2017) ebenfalls in einen Level I Vektor des GG-System integriert (Tabelle 3-2). Mit den bereits vorhandenen Promotoren entstand so eine große Variabilität des GG-basierten Cas9-Systems.

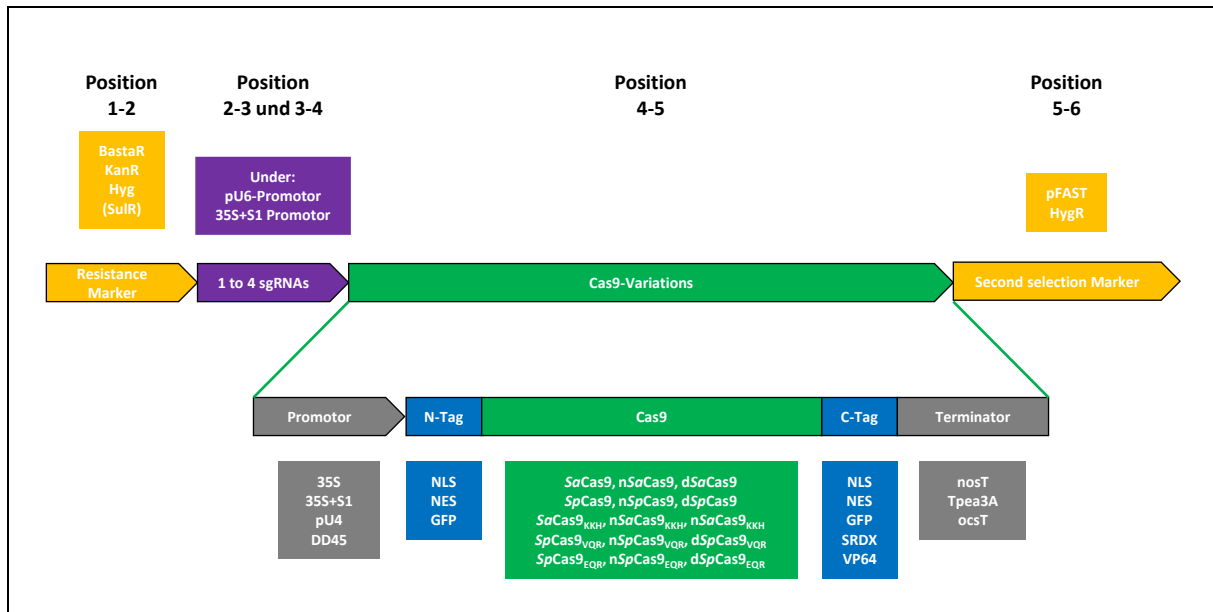
**Tabelle 3-2: Level I Elemente des CRISPR/Cas9-Systems**

In das GG-System wurden die Elemente für das CRISPR/Cas9-System in Level I Vektoren kloniert (Binder et al. 2014; Chiasson et al. 2019). Aufgeführt sind der Vektor-Backbone, das Element, bezeichnet als Insert, sowie das Restriktionsenzym und die Überhänge für die weitere Klonierung.

Vektor-Backbone	Insert	Restriktionsenzym	5'-Überhang	3'-Überhang
p641-Bpil	pAtU6-26	Bsal	GCGG	ATTG
p641-Bpil	tracrRNA SpCas9	Bsal	GTTT	TGTC
p641-Bpil	tracrRNA SaCas9	Bsal	GTTT	TGTC
p641-Bpil	DD45	Bsal	GCGG	TCTG
p641-Bpil	SpCas9	Bsal	CACC	AAGG
p641-Bpil	SaCas9	Bsal	CACC	AAGG

### 3.8.2.2 Klonierungsprotokoll

Für die Klonierung der Konstrukte wurden die Protokolle für die einzelnen CRISPR-Konstrukte etabliert. Grundlage dieser Protokolle bilden einerseits die Klonierungsstrategie des *multi-kingdom Golden-Gate* Systems, andererseits die Protokolle für das pDGE-Vektorsystem (Binder et al. 2014; Ordon et al. 2017; Chiasson et al. 2019).



**Abbildung 3-50: Allgemeiner, schematischer Aufbau der T-DNA des Cas9-Systems**

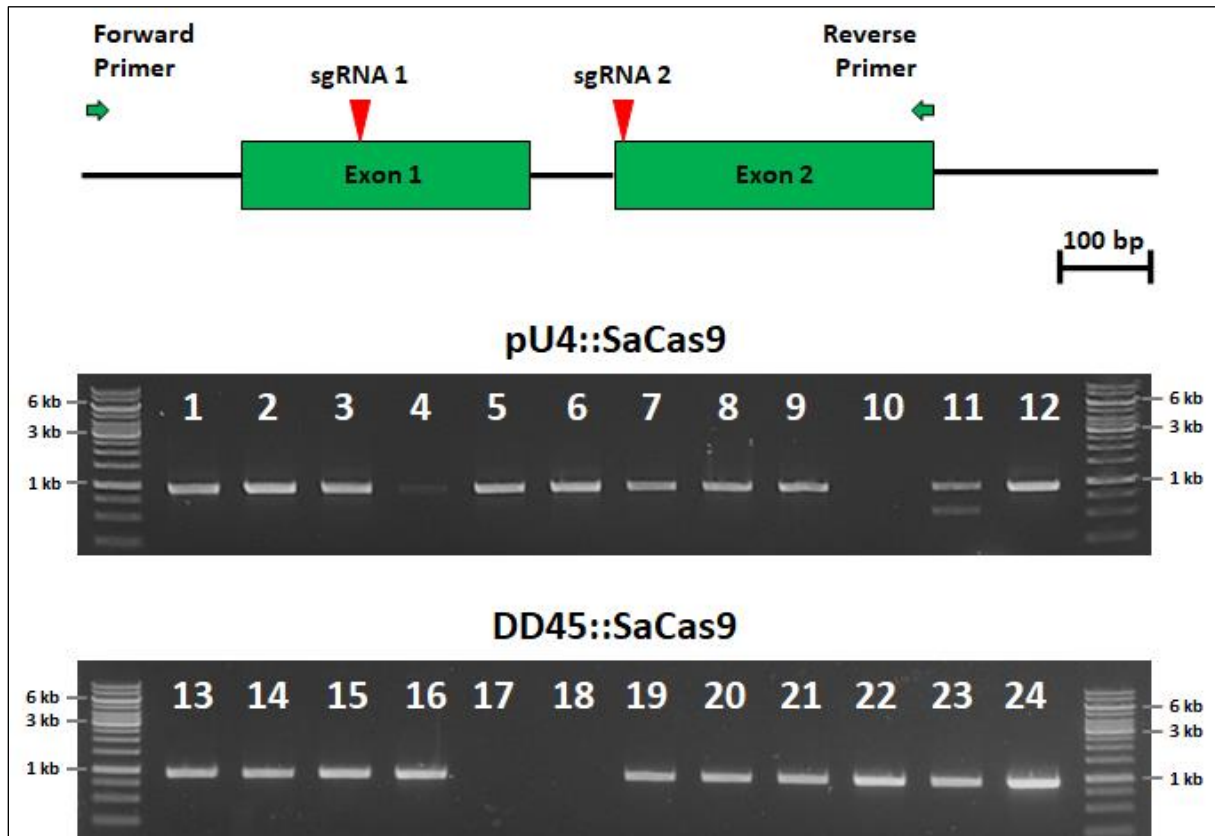
Gezeigt wird der allgemeine Aufbau der T-DNA zur Expression unterschiedlicher Cas9-Varianten inklusive der sgRNAs und Marker-Genen, die zur Überprüfung der Transformation dienen. Zudem ist die detaillierte Cas9-Expressionskassette mit den unterschiedlichen Promotoren sowie Terminatoren in grau, den Lokalisierungssignalen bzw. Fusionsproteinen in Blau und den Cas9-Varianten in Grün dargestellt. Desweiteren sind in Gelb die Marker-Gene, die zur Selektion der Transformanten dienen, sowie in Violett die sgRNA-Expressionskassette zu sehen.

Die Grundidee bestand darin, dass alle Cas9-Varianten mit unterschiedlichen Promotoren und Tags in einem Level II Vektor kloniert wurden. Generell wurde für diese unterschiedlichen Cas9-Expressionskassetten ein Level II Vektor verwendet, der anschließend in Level III die Position 4-5 einnimmt. Die sgRNA-Expressionskassetten nehmen in Level III die Positionen 2-3 und/oder 3-4 ein (Abbildung 3-50). Durch das GG-System war vorgegeben, dass auf den Positionen 1-2 und 5-6 die pflanzenspezifischen Selektionsmarker kloniert wurden.

### 3.8.2.3 Gen-Deletion

Mit dem in dieser Arbeit entwickeltem CRISPR/Cas-System wurden *in planta* unterschiedliche Promotor-Varianten und die *SaCas9* verwendet, um eine Vielzahl unterschiedlich großer Deletionen innerhalb des *AtGSTU1* bis *AtGSTU7* Gen-Clusters zu generieren. Es wurde sowohl der Ubiquitin 4 Promotor aus *Petroselinum crispum* (pU4-Promotor; Fauser et al. 2012) als auch der eizellspezifische DD45-Promotor (Sprunck et al. 2012) verwendet um die *SaCas9* zu exprimieren.

Es konnte exemplarisch gezeigt werden, dass die Deletion des *AtGSTU1*-Genes mit der unter dem pU4-Promotor exprimierten *SaCas9* möglich war (Abbildung 3-51). Insgesamt wurden 67 Pflanzen mit diesem Konstrukt analysiert. Vier dieser Pflanzen waren positiv für die Deletion des *AtGSTU1*-Genes. Für die unter dem DD45-Promotor exprimierte *SaCas9* wurden 54 Primärtransformanten mittels PCR getestet. Keine dieser Pflanzen zeigte eine Deletion des *AtGSTU1*-Genes. Weitere Analysen des PCR-Produkts mit dem T7 Endonuklease I Assay (2.5.4 T7-Endonuklease I Assay) und anschließender Sequenzierung ergaben, dass in drei Fällen eine Punktmutation vorlag (6 Anhang, Abbildung 6-7).



**Abbildung 3-51: Genotypisierung mittels PCR auf die Deletion des *AtGSTU1*-Genes**

Primärtransformanten für die CRISPR-Linien wurden selektiert (2.5.7.3). Anschließend wurden diese mittels PCR auf die Deletion hin überprüft (2.5.1.3 und 2.5.2). Die Genstruktur, die Position der sgRNA-Target-Sites und die Bindestellen der beiden Primer zeigen, dass durch die Deletion ein kleineres PCR-Produkt entsteht. Exemplarischen sind die PCR-Ergebnisse für Pflanzenlinien mit der pU4-exprimierten (Nummer 1 bis 12) und der eizellspezifisch (DD45-Promotor; Nummer 13 bis 24) exprimierten *SaCas9*. Für die elfte Probe der pU4:*SaCas9*-exprimierenden Pflanzen konnte eine Doppelbande und somit eine Deletion detektiert werden. Als Standard-Marker wurde der Thermo Scientific GeneRuler 1kb Ladder aufgetragen (2.5.3 Genotypisierung von Pflanzen).

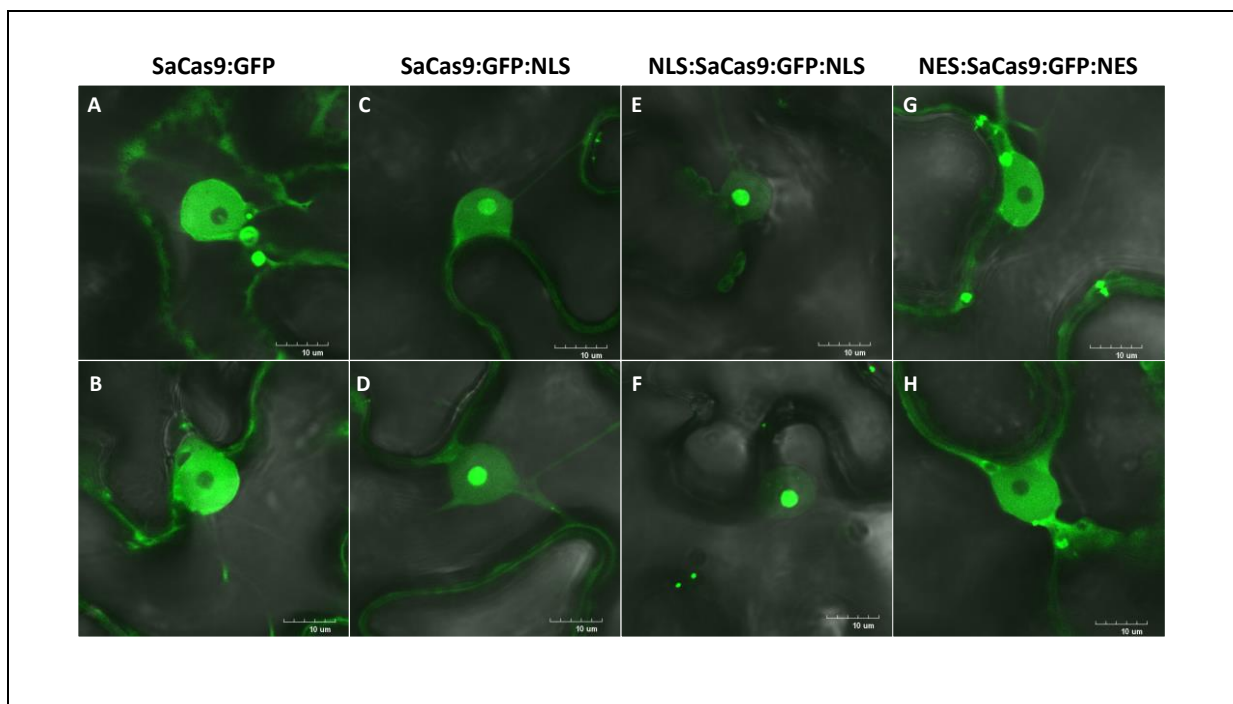
Es sollten möglichst viele Gene eines Gen-Clusters deletiert werden und nicht durch serielle Punktmutation einzelner Gene eine Mehrfachmutante generiert werden. Daher wurden unterschiedliche Kombinationen von sgRNAs für die unterschiedlichen GST-Gene sowohl mit der unter dem pU4-Promotor als auch dem DD45-Promotor exprimierten *SaCas9* getestet. Dabei sollten verschiedene Deletionen generieren werden. Nach entsprechender Analyse der Primärtransformanten konnten jedoch mit Ausnahme für das *AtGSTU1*-Gen, keine Deletionsmutanten

identifiziert werden, die durch die einzellspezifisch exprimierte SaCas9 generiert wurden (6 Anhang, Tabelle 6-11).

#### 3.8.2.4 Weiterentwicklung des Cas9-Systems

Die Integration der Cas9-Gene in das GG-System bot die Möglichkeit unterschiedliche Protein-Fusionen zu klonieren. Zudem konnten auch unterschiedlich Promotor-Varianten kloniert werden. Insofern wurde die Grundlage für die Gewebe-spezifische Expression der Cas9 und die Fusion mit Lokalisierungssignalen oder fluoreszierende Proteine geschaffen. Dies ist schematisch in Abbildung 3-50 dargestellt ist.

Damit die Cas9 *in planta* in den Zellkern gelangte, wo sich die genomische DNA befindet, wurde sie sowohl N- als auch C-Terminal mit Kernlokalisierungssignalen (NLS: *nuclear localization signal*) fusioniert (Le Cong et al. 2013). Als Cas9-Variante wurde die von *S. aureus* stammende Cas9 verwendet. Diese wurde für die Deletion von *A. thaliana* Gene durch den einzellspezifischen DD45-Promotor exprimiert.



**Abbildung 3-52: Transiente Expression von SaCas9 in Tabak**

Unterschiedliche Lokalisationsvarianten der SaCas9 mit einem GFP-Tag wurden transient in Tabak exprimiert. Hierzu wurden Tabakblätter mit Agrobakterien infiziert. Unter dem 35S-Promotor kam es zur Expression der unterschiedlichen SaCas9-Konstrukte. **A** und **B** zeigen die Lokalisation der SaCas9 ohne Lokalisationssignale. In **C** und **D** ist die Lokalisation der SaCas9 mit einem C-terminalen Kernlokalisierungssignal gezeigt, während bei **E** und **F** die SaCas9 sowohl N- als auch C-Terminal ein Kernlokalisierungssignal trägt. **E** und **F** zeigen die Lokalisation der SaCas9 mit N- und C-terminalen Kernexportersignalen.

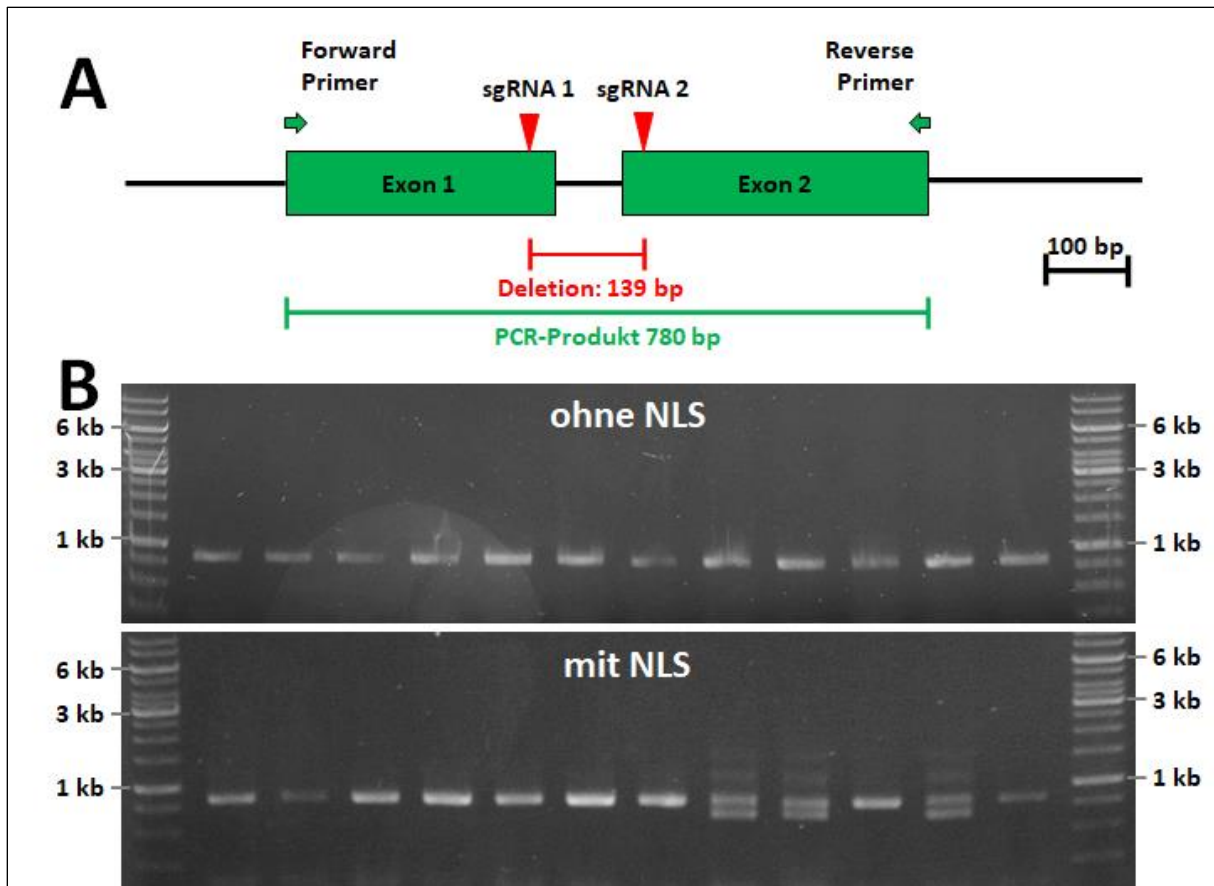
Zur Veranschaulichung der Kernlokalisierung wurde die SaCas9 C-Terminal mit einem grün fluoreszierenden Protein (GFP: *green fluorescent protein*) Tag versehen. Dieses SaCas9:GFP-Variante



wurde unter dem 35S-Promotor mit unterschiedlichen Lokalisationssignalen in Tabak transient exprimiert (Abbildung 3-52). Ohne Kernlokalisierungssignal wurde die *SaCas9* sowohl im Zellkern als auch im Zytosol exprimiert (Abbildung 3-52 A und B Le Cong et al. 2013). Mit einem einfachen C-terminalen Kernlokalisierungssignal wurde die *SaCas9* nicht nur im Nukleus, sondern auch im Nukleolus exprimiert (Abbildung 3-52 C und D). Dieser Effekt konnte durch ein doppeltes Kernlokalisierungssignal, mit je einem Signalpeptid am N- und am C-Terminus, verstärkt werden (Abbildung 3-52 E und F). Die Expression der *SaCas9* mit GFP-Tag und je einem Kernexportersignal am N- und C-Terminus führte zu einer ähnlichen Verteilung der *SaCas9*, wie diese bereits bei der nicht lokalisierten Variante auftrat (Abbildung 3-52 G und H).

### GSTU10 Einzel-Gen-Deletion

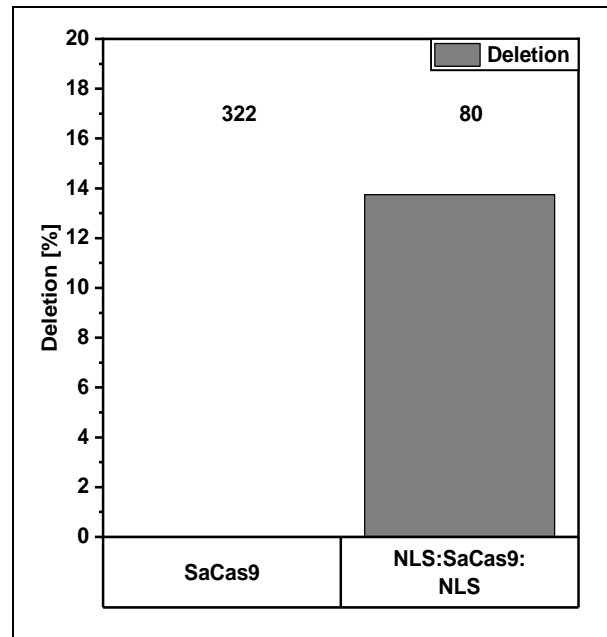
Zur Prüfung der Funktion und Effizienz der kernlokalisierten *SaCas9* unter dem eizellspezifischen Promotor wurde ein *AtGSTU*-Gen deletiert, das in keinem Gen-Cluster vorliegt. Als Target-Gen wurde das *AtGSTU10*-Gen verwendet, da das *AtGSTU10*-Protein mit den Proteinen des *AtGSTU1* bis *AtGSTU7* Gen-Cluster hohe Homologien aufweist. Mit diesem Konstrukt konnte das *AtGSTU10*-Gen erfolgreich deletiert werden. Durch die Expression der *SaCas9* und zwei sgRNAs, die zu einem Schnitt im Exon 1 und einem Schnitt im Exon 2 führten, entstand eine Deletion von ca. 140 bp. Zum Vergleich der Effektivität der kernlokalisierten *SaCas9* wurde eine nicht-lokalisierte *SaCas9 in planta* mit den sgRNAs transformiert. Mittels Basta-Screen wurde die Primärtransformanten identifiziert und diese anschließend mittels PCR genotypisiert. Exemplarisch ist die Genotypisierung von den Primärtransformaten in Abbildung 3-53 dargestellt.



**Abbildung 3-53: Deletion des AtGSTU10-Genes**

(A) Dargestellt ist schematische Struktur des AtGSTU10-Genes, sowie die entsprechende Position der sgRNAs für die Deletion. Mittels der beiden Primer wurden entsprechende Pflanzen auf die Deletion hin überprüft. Das Amplikon für das Wildtyp-Gen ist 780 bp groß, während das Amplikon für ein deletiertes Gen 641 bp groß ist. (B) Exemplarisch sind jeweils zwölf Proben von T1-Pflanzen mit der eizellspezifisch exprimierten SaCas9 Konstrukten für die Deletion von 140 bp im GSTU10-Gen ohne kernlokalisierter und mit kernlokalisierter SaCas9. Oben sind die Proben ohne Kernlokalisationsignal gezeigt. Alle Proben zeigen wildtypische Banden. Proben mit Kernlokalisationsignal sind unten gezeigt. Drei der zwölf Proben zeigten die zweite erwartete Band für die Deletion. Für die Analyse wurde genomische DNA aus den Blattmaterial der Pflanzen gewonnen (2.5.1.3) und mittels PCR genotypisiert (2.5.2). Als Standard-Marker wurde der Thermo Scientific GeneRuler 1kb Ladder verwendet (2.5.3 Genotypisierung von Pflanzen).

Für die Effizienzanalyse standen zwei unabhängige Transformationen mit der kernlokalisierten SaCas9 und drei unabhängige Transformationen mit SaCas9 ohne NLS zur Verfügung. Ohne Lokalisierungssignale konnten unter 322 Primärtransformante keine Pflanze mit einer Deletion des AtGSTU10-Genes identifiziert werden. Im Gegensatz dazu konnten in den 80 Primärtransformanten mit der kernlokalisierten SaCas9 elf Deletionsmutanten identifiziert werden. Dabei beträgt die Deletionsrate 13,75 %. In Abbildung 3-54 ist die relative Deletionsrate der getesteten Pflanzen dargestellt.

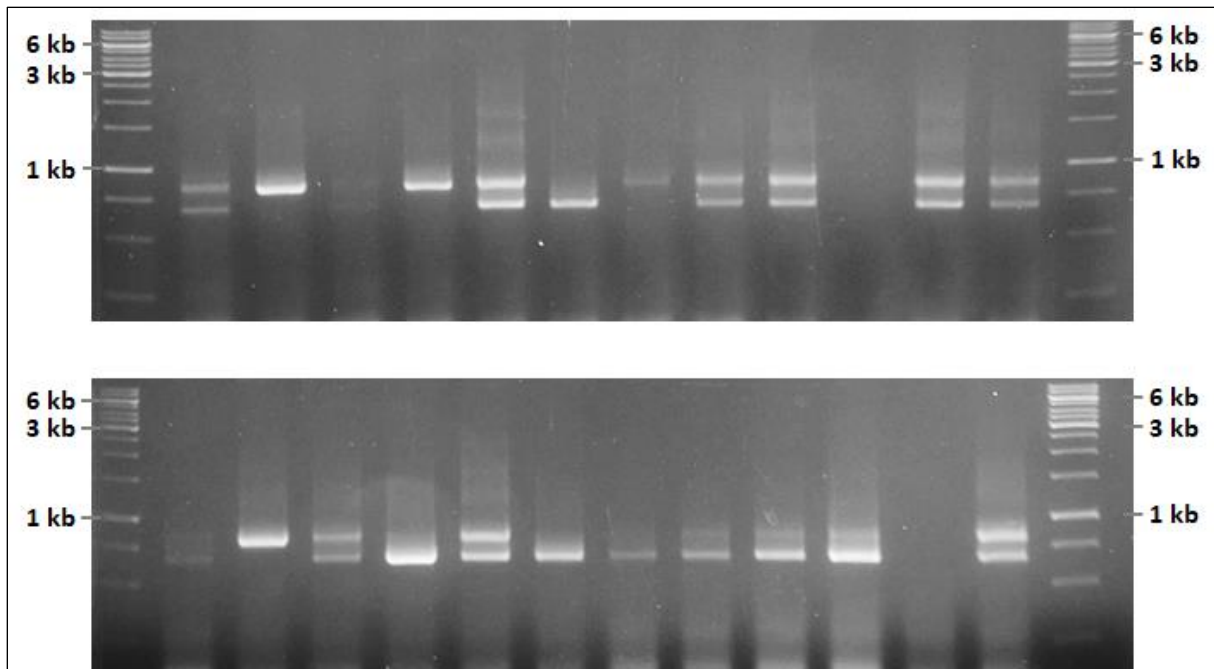


**Abbildung 3-54: Relative Deletionsrate des GSTU10-Genes mittels unterschiedlicher SaCas9-Varianten**

*Arabidopsis thaliana Col-0 Wildtyp-Pflanzen wurden mit unterschiedlichen Konstrukten transformiert. Diese unterschieden sich darin, dass die unter dem eizellspezifischen DD45-Promotor exprimierte SaCas9 einerseits sowohl am N- als auch am C-terminalen Ende mit einem Kernlokalisierungssignal versehen waren, andererseits kein NLS-Signal fusioniert war. Nach der Selektion der primär Transformanten wurden diese mittels PCR analysiert (2.5.1.3, 2.5.2). Dargestellt ist der prozentuelle Anteil an positiv getesteten Pflanzen, sowie die Summe aller getesteten Pflanzen je SaCas9-Version.*

Von den sieben Pflanzen, die positiv für die Deletion getestet wurden, wurden sechs Pflanzen in der segregierenden Generation mittels pFAST-Screening auf die T-DNA geprüft und nur solche, die nicht fluoreszierten, also keine T-DNA mit dem CRISPR-Konstrukt enthielten, selektiert. Die selektierten Samen wurden ausgebracht und die Keimlinge auf die Deletion des *AtGSTU10*-Genes mittels PCR überprüft. Dabei zeigte sich eine mendelsche Segregation der Gen-Deletion (Abbildung 3-55).

Sowohl Pflanzen, die die Gen-Deletion homozygot trugen als auch Pflanzen bei denen keine Deletion nachweisbar war, im Folgenden als Revertanten bezeichnet, wurden weiteramplifiziert. Im Kontext der Deletionsmutanten sind Revertanten all jene Pflanzen, die von einer heterozygoten Deletionsmutante abstammen, aber die Deletion nicht nachgewiesen werden kann, jedoch andere Mutationen nicht ausgeschlossen sind. Anschließend wurde das so amplifizierte Saatgut erneut sowohl auf den Verlust des CRISPR-Konstruktes als auch auf die Deletion überprüft, um das Ergebnis zu verifizieren. Der Verlust des CRISPR-Konstruktes wurde sowohl durch ein pFAST-Screening als auch durch ein Basta-Screening bestätigt. Für die Verifizierung des Genotyps wurde von je zwölf Keimlingen pro Linie die genomische DNA isoliert und mittels PCR überprüft. Dabei konnte der Genotyp der *GSTU10*-Deletionsmutanten für jeder Linie bestätigt werden.



**Abbildung 3-55: Genotypisierung der segregierenden CRISPR GSTU10-Linien**

Mittels pFAST-Screen wurden Samen der segregierenden CRISPR GSTU10-Linien selektiert, die Cas9-befreit waren. Diese wurden zur Keimung gebracht. Zur Genotypisierung wurde von den Keimlingen aus Blättern DNA isoliert und diese mittels PCR analysiert. Exemplarisch ist das Resultat der Genotypisierung für 24 segregierende Pflanzen dargestellt. Die Deletion des AtGSTU10-Genes segregierte nach Mendel. Die Größen der Amplikons des Wildtyp-Genes und des deletierten Genes entsprechen denen in Abbildung 3-53 gezeigten. Für den Größenvergleich wurde der Thermo Scientific GeneRuler 1 kb Ladder mit auf das Agarosegel aufgetragen (2.5.3 Genotypisierung von Pflanzen).

### Multiple Gen-Deletionen

Mit der kernlokalisierten SaCas9 unter dem eizellspezifischen Promotor wurden mehrere Konstrukte zur Generierung verschiedener Mutationskombination kloniert. Jedes Konstrukt sollte zwei GST-Gene innerhalb des GSTU1/U7-Gen-Clusters schneiden. Für jedes Zielgen wurden je zwei sgRNAs exprimiert, sodass in Summe bis zu vier Target-Sites geschnitten werden konnten. Somit ergaben sich in der Theorie mehrere Permutationen an Punktmutationen oder Deletionen. In jeder der vier Target-Sites konnte es zu Punktmutationen kommen. Zudem konnte es zu einer Deletion zwischen den beiden Target-Sites eines Genes kommen oder zu der Deletion des gesamten Gen-Clusters. Für die Gesamtdeletion des entsprechenden chromosomalen Abschnittes waren vier unterschiedlich großen Deletionen möglich.

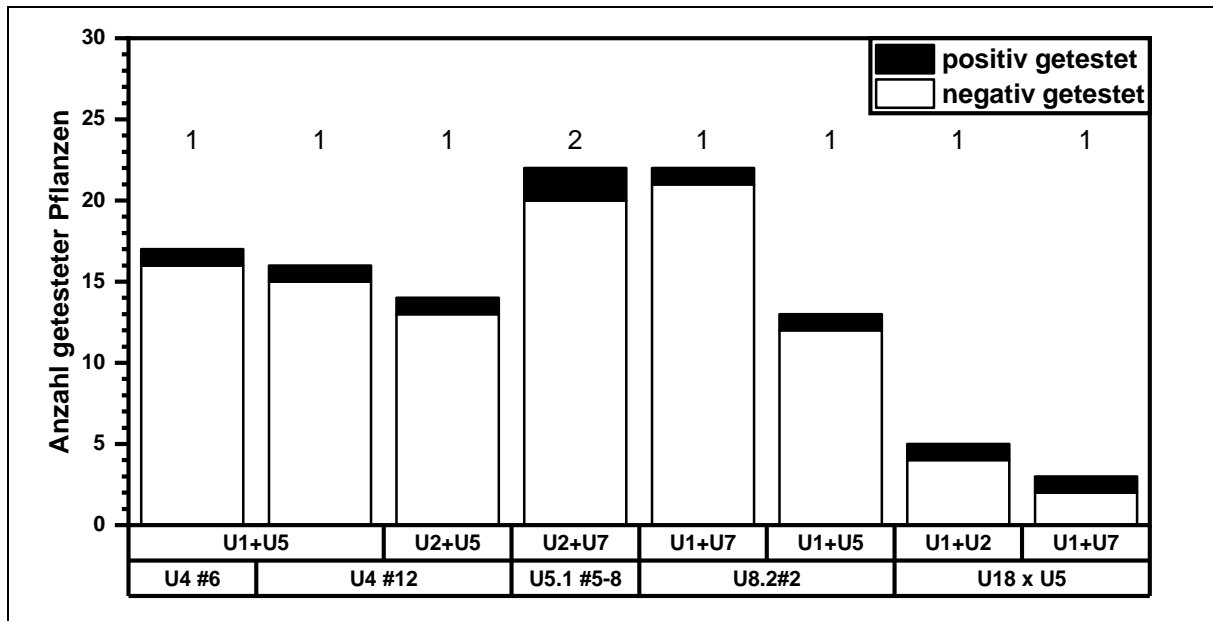
In Tabelle 3-3 sind die generierten Transformationen mit einem jeweiligen X gekennzeichnet. Die Angabe der Target-Sites gibt dabei lediglich die verwendeten sgRNAs an, nicht aber einen möglichen Genotyp, entsprechend der für diese Arbeit aufgestellten Nomenklatur für CRISPR-Linien (2.5.6.2 CRISPR/Cas – Nomenklatur von CRISPR-Linien).

**Tabelle 3-3: Generierte CRISPR-Linien mit T-DNA-Insertionslinien als genetischer Hintergrund**

Unterschiedliche T-DNA-Insertionslinien wurden mit CRISPR/SaCas9-Konstrukten transformiert, die sich in den Zielgenen unterscheiden. Aufgeführt sind die transformierten Kombinationen aus den entsprechenden genetischen Hintergründen und den CRISPR/SaCas9-Konstrukte für die jeweiligen Ziel-Gene. Die SaCas9 wurde unter dem eizellspezifischen Promotor exprimiert und trug sowohl N- als auch C-Terminal Kernlokalisierungssignale.

Genetischer Hintergrund T-DNA-Insertion	Transformierte SaCas9-Konstrukte mit Target-Sites					
	GSTU1 + GSTU2	GSTU1 + GSTU5	GSTU1 + GSTU7	GSTU2 + GSTU5	GSTU2 + GSTU7	GSTU5 + GSTU7
gstu2 #8		X	X			X
gstu2 #16		X	X			X
gstu4 #6	X	X	X	X	X	X
gstu4 #12	X	X	X	X	X	X
gstu5.1 #5-8	X		X		X	
gstu8.2 #2	X	X	X	X	X	X
gstu8.2 #3	X	X	X	X	X	X
gstu9.1 #4	X	X	X	X	X	X
gstu9.1 #5	X	X	X	X	X	X
gstu18 #5.6 x gstu5 #10.7	X		X		X	

Das Saatgut dieser Transformationen wurde mittels Basta-Screens auf das Transformationsevent getestet und die transgenen Pflanzen anschließend mittels PCR genotypisiert. Dabei wurden sowohl auf Deletionen innerhalb der einzelnen Gene als auch auf die Deletion des gesamten Clusterabschnittes geprüft. Es konnten mehrere Deletionsmutanten detektiert werden. In einigen Fällen befand sich die T-DNA-Insertion des genetischen Backgrounds innerhalb des deletierten Abschnittes. Die Deletionen der GST-Gene wurden anschließend durch Sequenzierung bestätigt.

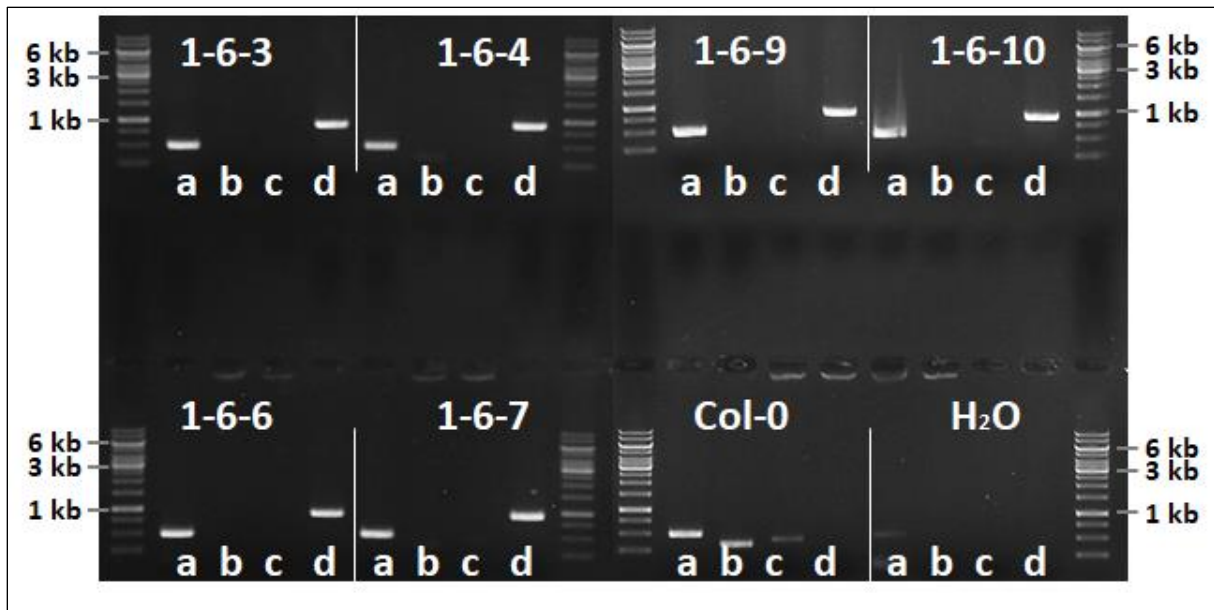


**Abbildung 3-56: Populationsanalyse der GST-Deletionen in T-DNA-Insertionslinien**

In unterschiedlichen T-DNA-Insertionslinien wurden Abschnitte des GSTU1/U7-Clusters deletiert. Dargestellt sind die positiv (schwarz) und negativ (weiß) getesteten Pflanzen für die entsprechenden Linien. Hierzu wurde das Saatgut auf Erde ausgebracht und nach der Keimung mit Basta behandelt. Basta-resistente Pflanzen wurden vereinzelt und von jeder Einzelpflanze wurde die genomische DNA aus einem Blatt isoliert. Mittels PCR-Analyse wurden die beiden Target-Gene, ein Kontrollgen und der Nachweis der möglichen Deletion amplifiziert. Die positiv getesteten Pflanzen zeigen alle ein kleineres Amplikon, welches für eine Deletion des gesamten Chromosomen-Abschnitts spricht. Keine der getesteten Pflanze zeigte eine Einzelgen-Deletion.

Die segregierenden Samen wurden nach der Ernte mittels pFAST-Screen auf das CRISPR-Konstrukt getestet. Nur Samen die nicht fluoreszierend waren, wurden, unter der Annahme, dass diese auch keine Cas9-Expressionskassette tragen, zur Keimung gebracht. Im Anschluss wurde von diesen Keimlingen die genomische DNA extrahiert und mittels PCR auf heterozygote oder homozygote Deletionen geprüft.

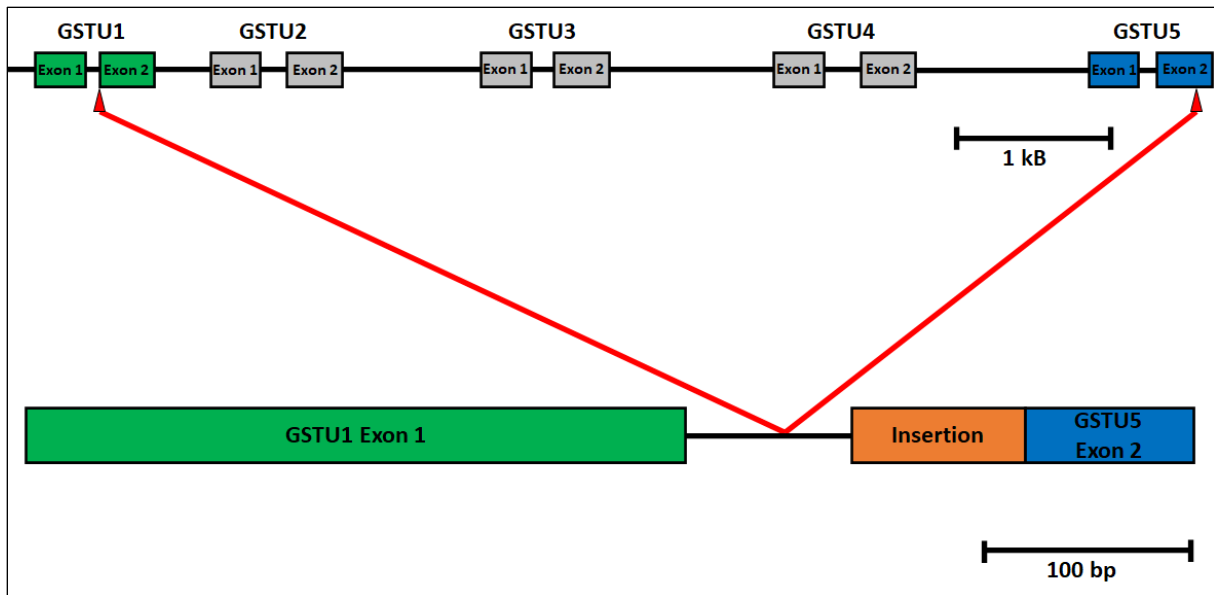
Für die Linie gstu4#12 CRISPR u1-u5 wurden Samen, die im pFAST-Screen keine Fluoreszenz zeigten, ausgewählt und angezogen. Fünfzehn dieser nicht-transgenen, segregierenden Pflanzen wurden mittels PCR-Analyse auf die Deletion des Clusterabschnitts zwischen der AtGSTU1 und der AtGSTU5 getestet. Bei sechs der fünfzehn segregierenden Pflanzen konnten eine Homozygotie für die Deletion des Gen-Clusters nachgewiesen werden (Abbildung 3-57). Unter den restlichen Pflanzen konnten keine wildtypischen Pflanzen identifiziert werden. Jedoch ist bei dieser zuvor mehrfach selektierten Stichprobe keine statistische Aussage möglich. Durch die Deletion des Gen-Clusters der AtGSTU1 bis AtGSTU5 wurde ebenfalls die T-DNA-Insertion der AtGSTU4 deletiert. Es handelte sich bei den homozygoten Pflanzen um Quintupel-GSTU Deletionsmutanten.



**Abbildung 3-57: Genotypisierung der *gstu4#12* CRISPR u1-u5**

Nicht fluoreszierende Samen der *gstu4#12* CRISPR u1-u5 positiven Linie wurden mittels pFAST-Screen ausgewählt. Diese wurden auf  $\frac{1}{4}$  MS-Platten zur Keimung gebracht und nach fünf Tagen in Erde pikiert. Nach zwei Wochen wurden von jeder der sechs Pflanzen der segregierenden Linie ein Blatt zur gDNA-Isolierung abgeschnitten. Die isolierte gDNA diente als Template für die PCR-Analyse. Jede Probe wurde mit Primern für das Exon 1 und Exon 2 der *GSTU1* (a und b) sowie für das Exon 2 der *GSTU5* (c) und die Deletion von *GSTU1* bis *GSTU5* (d) überprüft. Der Thermo Scientific GeneRuler 1 kb Ladder wurde als Größen-Marker verwendet (2.5.3 Genotypisierung von Pflanzen).

Die Sequenzierung der *gstu4#12* CRISPR u1-u5 Linie ergab eine Deletion des zweiten Exons der *AtGSTU1* bis zum zweiten Exon der *AtGSTU5*. Von diesem sind die letzten 82 bp erhalten geblieben. Zusätzlich wurden 210 bp in die Gen-Cluster-Deletion inseriert (Abbildung 3-58). Von diesen 210 bp konnten 124 bp mittels BLAST-Analyse dem Gen *At4g25150* zugeordnet werden. Dieses Gen kodiert für eine Saure Phosphatase aus der Superfamilie der Halogensäure-Dehydrogenasen. Ein Vergleich der verwendeten sgRNAs in dieser CRISPR-Linie zeigte, dass keine der vier sgRNAs weniger als fünf Mismatches gegenüber den Gen-Sequenz aufweisen. Mehr als drei Mismatches zwischen sgRNA und Gen-Sequenz führen dazu, dass Cas9-Proteine im Allgemeinen an dieser Stelle nicht schneiden. Somit dürfte es nicht zu einer unbeabsichtigten chromosomalen Translokation gekommen sein.

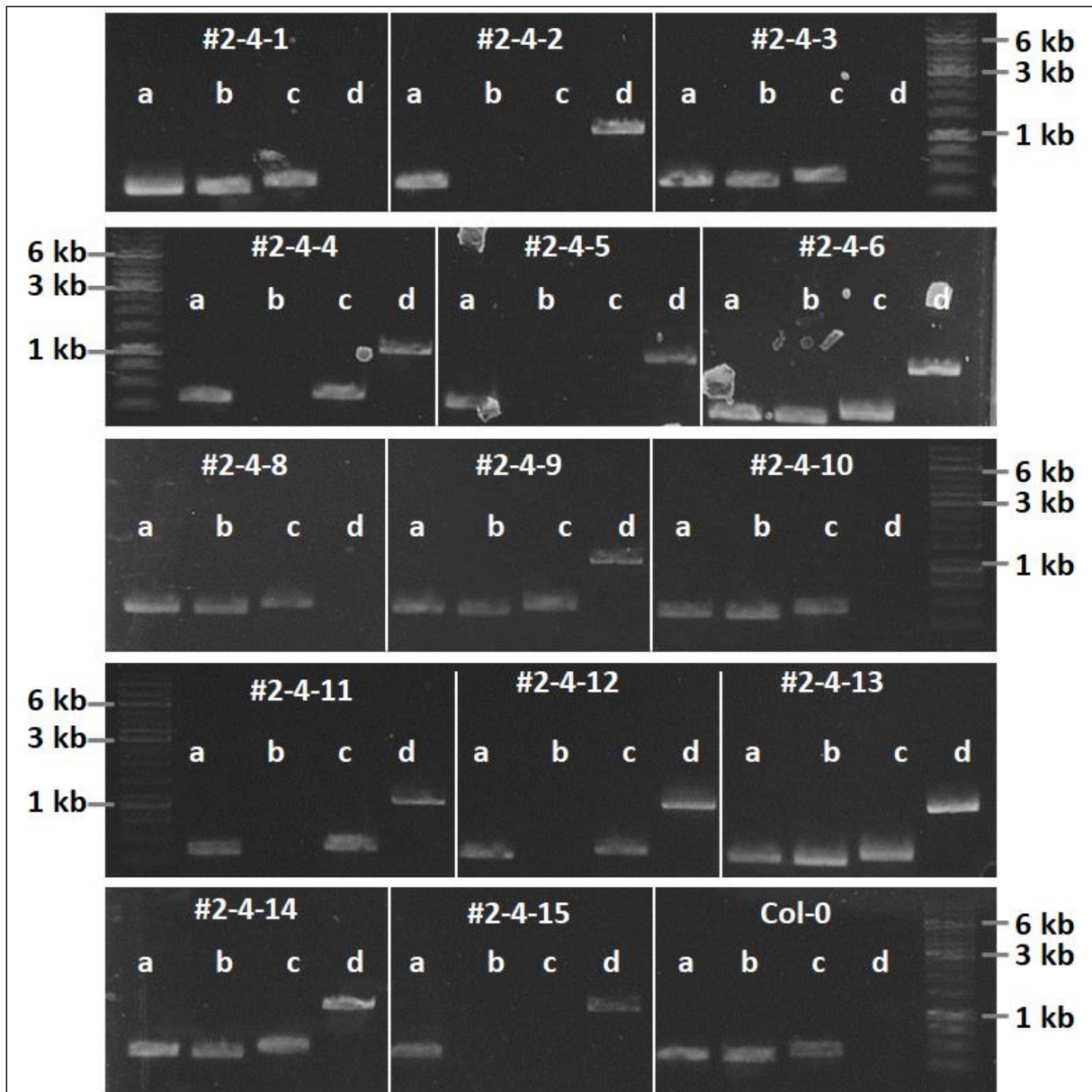


**Abbildung 3-58: Schematische Darstellung der Gencluster-Deletion der gstu4#12 CRISPR U1+U5 Linie**

Die Deletion des Genclusterabschnittes zwischen der GSTU1 und GSTU5 in der gstu4#12 Linie zeigt den Verlust des zweiten Exons der GSTU1, der Gene GSTU2, GSTU3 und GSTU4 sowie die GSTU5 bis auf die letzten 82 bp des zweiten Exons. Gezeigt wird oben die schematische Struktur des GSTU1-Genes und unten die Struktur des GSTU5-Genes. Im Vergleich ist mittig die schematische Struktur der Deletion dargestellt. In grün ist das erste Exon der GSTU1 zu sehen und in blau die letzte 82 bp des zweiten Exons der GSTU5. Zudem wurden 210 bp in die Deletion integriert, dargestellt in orange.

Wie für die gstu4#12 CRISPR u1-u5 Linie wurde auch für die gstu4#6 CRISPR u2-u5 die Samen der segregierenden Generation mittels pFAST-Screening ausselektiert. Insgesamt wurden 15 Samen zur Keimung gebracht. Von diesen wurden von 14 Keimlingen die genomische DNA isoliert und mittels PCR deren Genotyp bestimmt (Abbildung 3-59). Insgesamt konnten drei homozygote Deletionsmutanten und vier Deletionsrevertanten detektiert werden, während es sich bei den restlichen sieben Keimlingen um heterozygote Deletionsmutanten handelte. Sowohl von den Deletionsmutanten als auch die Deletionsrevertanten wurde das Saatgut amplifiziert. Zudem wurde der Genotyp der Deletionsmutanten mittels Sequenzierung und *in silico* Analysen überprüft (Abbildung 3-60).

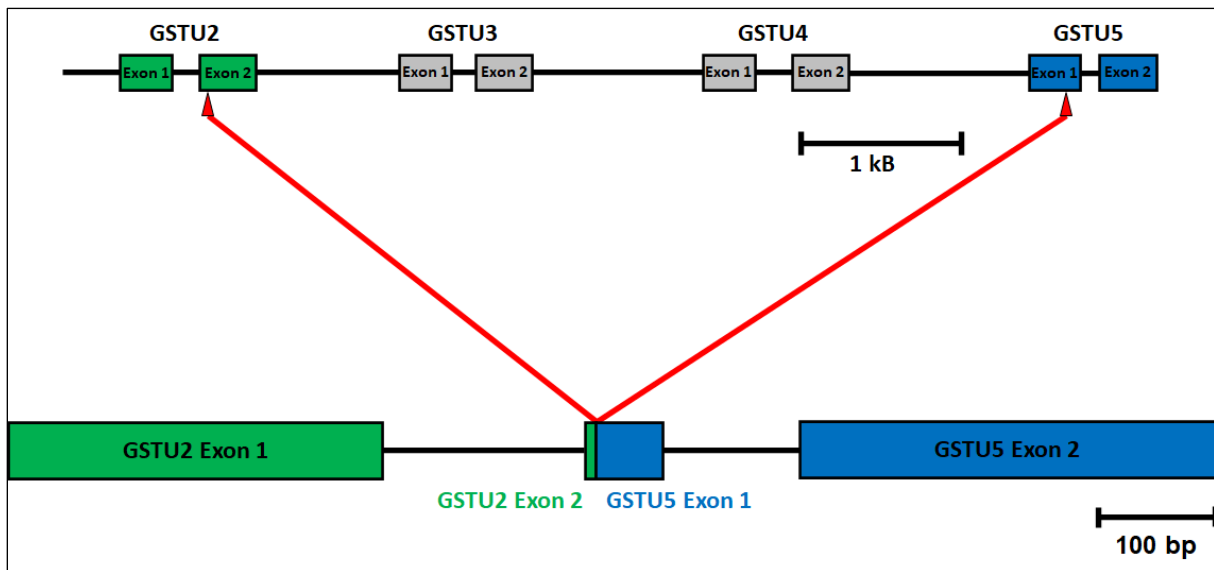




**Abbildung 3-59: Genotypisierung *gstu4#12* CRISPR U2+U5**

Von der Linie *gstu4#12* CRISPR U2+U5 wurden die Samen mittels pFAST-Screen selektiert, die keine Cas9-T-DNA tragen. Diese Samen wurden auf  $\frac{1}{4}$  MS-Platten ausgebracht und bei Dauerlicht zur Keimung gebracht. Nach fünf Tagen wurden die Keimlinge in Erde transferiert und ungefähr zwei Wochen wurde von den Pflanzen zur Isolierung von genomischer DNA ein Blatt abgeschnitten. Die isolierte genomische DNA wurde mittels PCR auf die Deletion des Genabschnittes hin überprüft. Dazu wurde das erste und zweite Exon der *GSTU2* (a und b), das zweite Exon der *GSTU5* (c) und mittels der Primer vom ersten Exon der *GSTU2* und vom zweiten Exon der *GSTU5* die Deletion (d) amplifiziert. Als Größen-Standard wurde der Thermo Scientific GeneRuler 1 kb Ladder verwendet (2.5.3 Genotypisierung von Pflanzen).

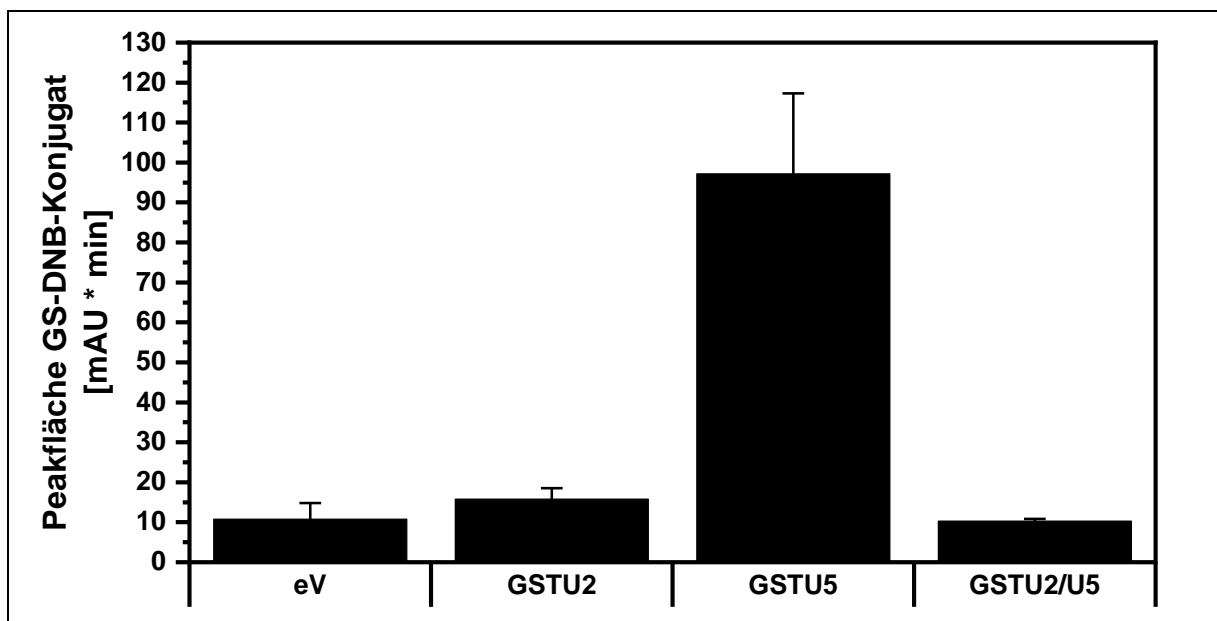
Die Deletion des Gen-Clusterabschnittes von der *GSTU2* bis zur *GSTU5* der *gstu4#12* CRISPR U2+U5 Linie (Abbildung 3-60) zeigte in der *in silico* Analyse, dass der fusionierte Bereich der beiden GSTs weiterhin *in frame* bleibt. Die PCR-Analyse der cDNA der Pflanzen Linie ergab, dass das fusionierte Gen transkribiert wird. Dabei werden das erste Exon der *GSTU2*, das Hybrid aus dem zweiten Exon der *GSTU2* und dem ersten Exon der *GSTU5* sowie das zweite Exon der *GSTU5* zusammen gespleißt. Dieses würde für ein GST-Hybrid kodieren, welches eine 22 Aminosäuren lange Insertion trägt.



**Abbildung 3-60: Schematische Struktur der Gencluster-Deletion der *gstu4#12* CRISPR *u2-u5***

Dargestellt ist die schematische Struktur der Deletion des Genclusterabschnittes von der GSTU2 bis zur GSTU5 im Vergleich zu den Wildtypgenen GSTU2 (oben) und GSTU5 (unten). Von der GSTU2, dargestellt in grün, ist das erste Exon komplett erhalten, während die SaCas9 am Anfang des zweiten Exons der GSTU2 geschnitten hat. Der zweite Schnitt erfolgt im ersten Exon der GSTU5, in blau dargestellt. Das zweite Exon der GSTU5 ist ebenfalls, wie das erste Exon der GSTU2, erhalten geblieben.

Um zu prüfen, ob das Protein mit der 22 Aminosäuren-Insertion funktionell war, wurde die cDNA in einen Hefvektor mit dem pGAL1-Promotor kloniert. Anschließend wurden die Hefen und die entsprechenden Kontrollen mit CDNB belastet und die Menge des entstandenen GS-DNB mittels HPLC bestimmt (Abbildung 3-61).

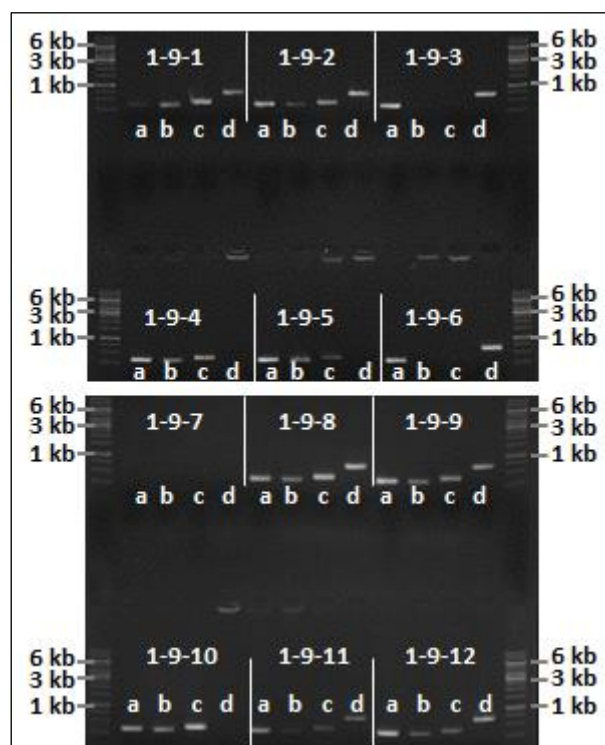


**Abbildung 3-61: GS-DNB-Konjugation des GSTU2/U5 Hybrid im Vergleich zu den Wildtyp-Genen**

Das potentielle Hybrid-Gen, das durch das CRISPR-Ereignis in der *gstu4#12* CRISPR U2+U5 Linie entstanden ist, wurde in Hefen exprimiert. Hierfür wurde aus cDNA der Mutante das entsprechende Gen in den Hefe-Vektor kloniert. Dieser und entsprechende Kontrollen wurden für 24 h mit CDNB belastet und anschließend mittels HPLC analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert und der Standardfehler der gemessenen Peakfläche des GS-DNB-Konjugates von drei unabhängigen Belastungen.

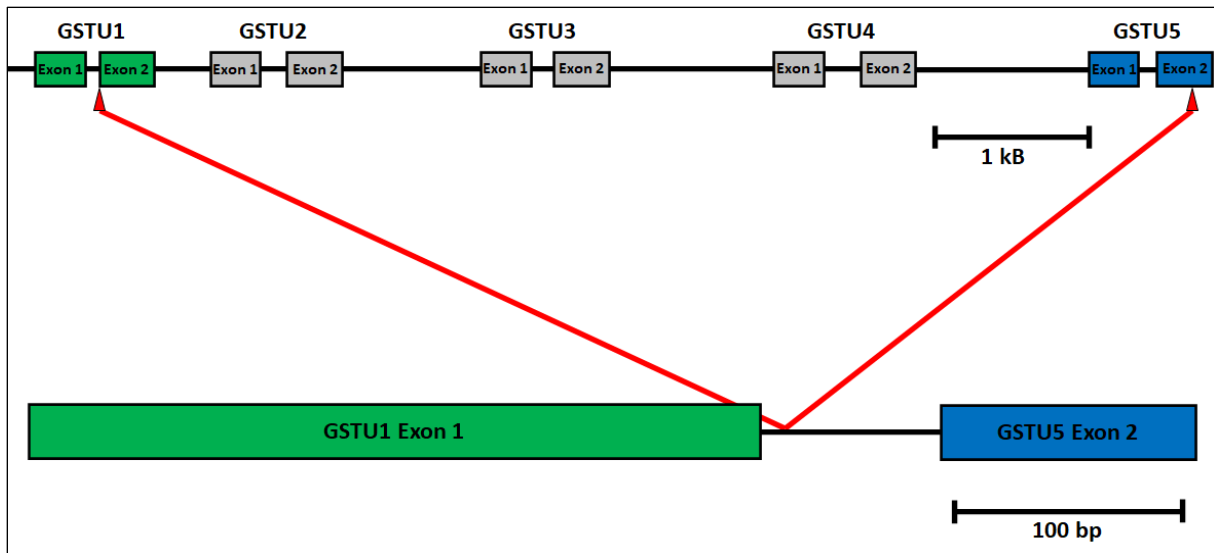
Wie in Abbildung 3-61 ersichtlich, zeigte das Hybrid-Protein keine Aktivität. Der GS-DNB-Gehalt war vergleichbar zur Kontrolle mit dem Leervektor. Im Vergleich zu dem GSTU5-Wildtypprotein und auch dem GSTU2-Wildtypprotein produziert das GSTU2/U5-Hybrid geringere Mengen des GS-DNB-Konjugates.

Auch das Saatgut der Linie *gstu8* CRISPR U1+U5 wurde mittels pFAST-Screen auf den Verlust des CRISPR-Konstruktes getestet. Elf Samen ohne Fluoreszenz wurden ausgebracht und die segregierenden Pflanzen wurden mit Hilfe von PCR-Analysen getestet. Von den elf getesteten Pflanzen waren, in Bezug auf die GST-Deletion, zwei homozygot (#1-9-3 und 1-9-6), sechs heterozygot und drei revertant (#1-9-4, #1-9-5 und #1-9-10; Abbildung 3-62). Die Segregation entsprach den mendelschen Regeln. Bei den homozygoten Pflanzen handelte es sich um Quintupel-Deletionsmutanten.

**Abbildung 3-62: Genotypisierung der *gstu8.2#2* CRISPR U1+U5**

Mittels pFAST-Screen wurden die Samen der *gstu8.2#2* CRISPR U1+U5 Linie überprüft und solche ohne Fluoreszenz auf einer ¼ MS-Platte ausgebracht. Fünf Tage nach der Keimung wurden die Pflanzen in Erde umgesetzt und weitere zwei Wochen später wurde aus den abgeschnittenen Blättern gDNA isoliert. Mittels PCR wurde für jede Probe der Genotyp bestimmt. Es wurden jeweils Primer verwendet die das Exon 1 und Exon 2 der GSTU2 (a und b) und das Exon 2 der GSTU5 (c) sowie die Deletion von GSTU1 bis GSTU5 (d) amplifizieren sollten. Der Thermo Scientific GeneRuler 1 kb Ladder wurde als Größen-Marker mit auf das Agarosegel aufgetragen (2.5.3 Genotypisierung von Pflanzen).

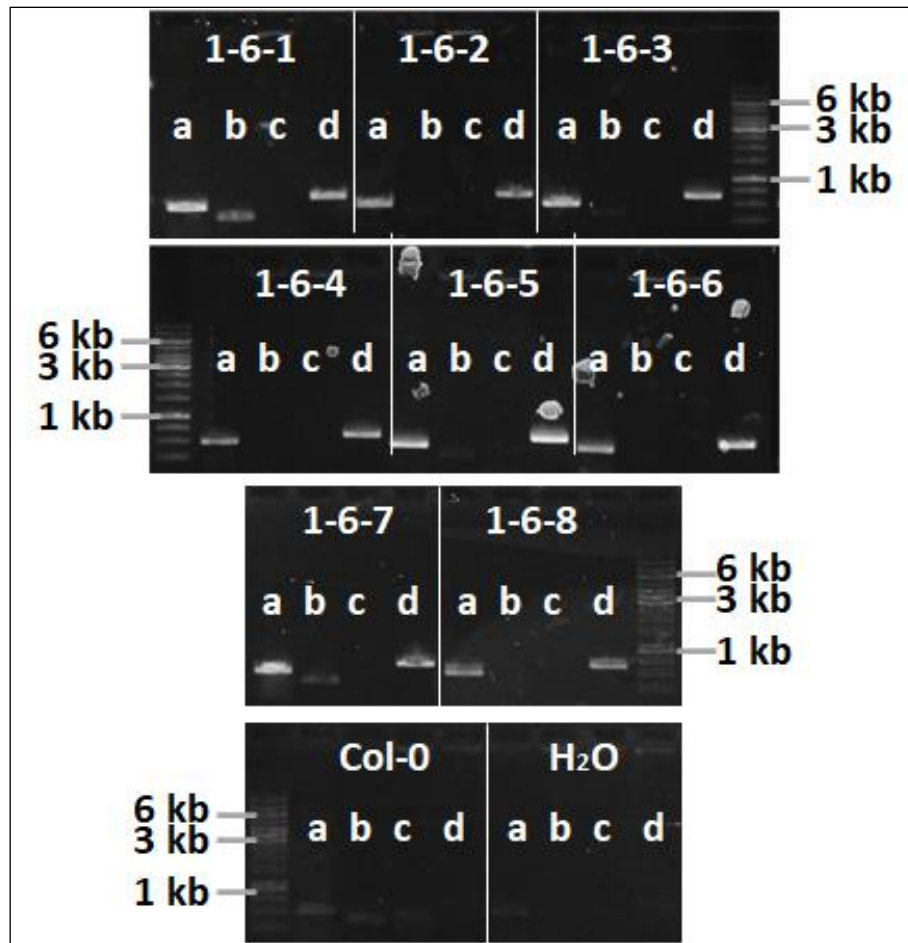
Die Sequenzierung der *gstu8* CRISPR u1-u5 Linie bestätigte die Deletion des Genabschnittes zwischen der *AtGSTU1* und der *AtGSTU5* (Abbildung 3-63). Ersichtlich wurde, dass das zweite Exon der *AtGSTU1* vollständig deletiert wurde. Zudem wurde das erste Exon der *AtGSTU5* vollständig und das zweite Exon teilweise deletiert. Somit war ein vollständiger Funktionsverlust aller Gene von *AtGSTU1* bis *AtGSTU5* gegeben.



**Abbildung 3-63: Schema der Deletion der *gstu8.2#2* CRISPR U1+U5 Linie**

Die Deletion des Gen-Clusterabschnittes zwischen der *GSTU1* und der *GSTU5* wurde mittels PCR und anschließender Sequenzierung verifiziert. Das Sequenzierungsergebnis ergab, dass das resultierende Gen-Clusterfragment aus dem ersten Exon der *GSTU1* und den letzten 84 bp des zweiten Exons der *GSTU5* besteht. Dargestellt sind in Grün die schematische Struktur der *GSTU1*, oben, und in blau die Struktur der *GSTU5*, unten. In der Mitte ist das Hybridgen dargestellt.

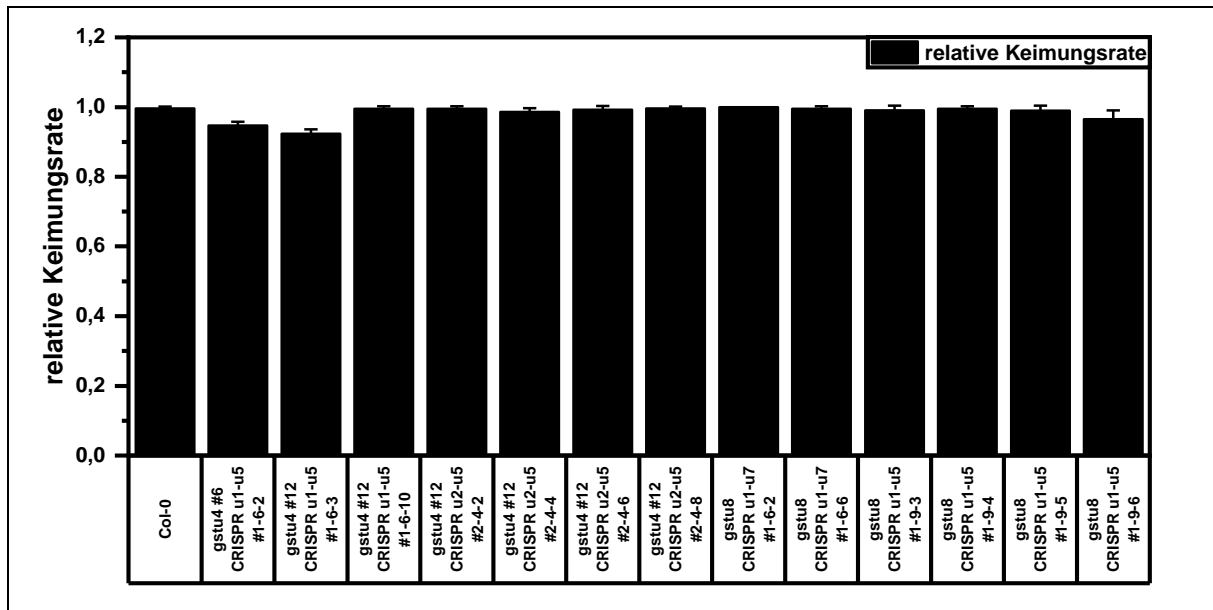
Im Background der *gstu8* T-DNA-Insertionslinie konnte durch die Deletion des Abschnittes zwischen der *GSTU1* und *GSTU7* eine Oktupel-Mutante generiert werden. In der Segregierenden Generation wurden sechs nicht-transgene Pflanzen untersucht. Mittels PCR-Analyse dieser sechs Pflanzen konnten zwei Pflanzen eindeutig als homozygot bestimmt werden (Abbildung 3-64).



**Abbildung 3-64: Genotypisierung der *gstu8.2#2* CRISPR U1+U7**

Die Samen *gstu8.2#2* CRISPR U1+U7 positiven Linie wurden auf den Verlust des CRISPR-Konstruktes mittels pFAST-Screen getestet. Nicht fluoreszente Samen wurden auf ¼ MS-Platten ausgebracht und zur Keimung gebracht. Die Keimlinge wurden nach fünf Tagen in Erde pikiert und nach weiteren zwei Wochen wurden für die Isolierung der genomischen DNA jeweils ein Blatt abgeschnitten. Nach der gDNA-Isolierung wurden die Proben mittels PCR auf ihren Genotyp getestet. Für jede Probe wurde eine PCR auf das erste und das zweite Exon der *GSTU1* (a und b), das zweite Exon der *GSTU5* (c) und die Deletion von *GSTU1* bis *GSTU7* (d) durchgeführt. Als Standard-Marker wurde der Thermo Scientific GeneRuler 1 kb Ladder von Thermo Fisher Scientific verwendet (2.5.3 Genotypisierung von Pflanzen).

Sowohl von den homozygoten Pflanzen als auch den Revertanten wurde das Saatgut amplifiziert. Anschließend wurden physiologische Versuche mit diesen durchgeführt. Als erstes wurde überprüft, ob die Deletion mehrerer *AtGSTs* einen Einfluss auf die Keimungsrate der Samen hatte. Bei allen Linien waren nahezu alle Samen am zweiten Tag, wie bei den Wildtyppflanzen, gekeimt (Abbildung 3-65).



**Abbildung 3-65: Keimungsrate der CRISPR-Deletionsmutanten**

Für die unterschiedlichen CRISPR-Linien wurde die Samen auf  $\frac{1}{4}$  MS-Platten ausgebracht (2.6.1). Anschließend wurden die Samen unter Dauerlicht zur Keimung gebracht. Nach zwei Tagen wurde die Anzahl der gekeimten Samen in Relation zur gesamten Anzahl der ausgebrachten Samen pro Platte bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert der relativen Keimung von drei Replikaten für die verwendeten CRISPR-Linien.

Im Zuge dieser Arbeit wurden weitere CRISPR/Cas-Linien generiert, mit denen jedoch keine weiteren Versuche durchgeführt wurden. Eine Aufstellung aller erfolgreich generierten CRISPR/Cas-Linien mit Mutationen findet sich in Tabelle 6-7 (6 Anhang).

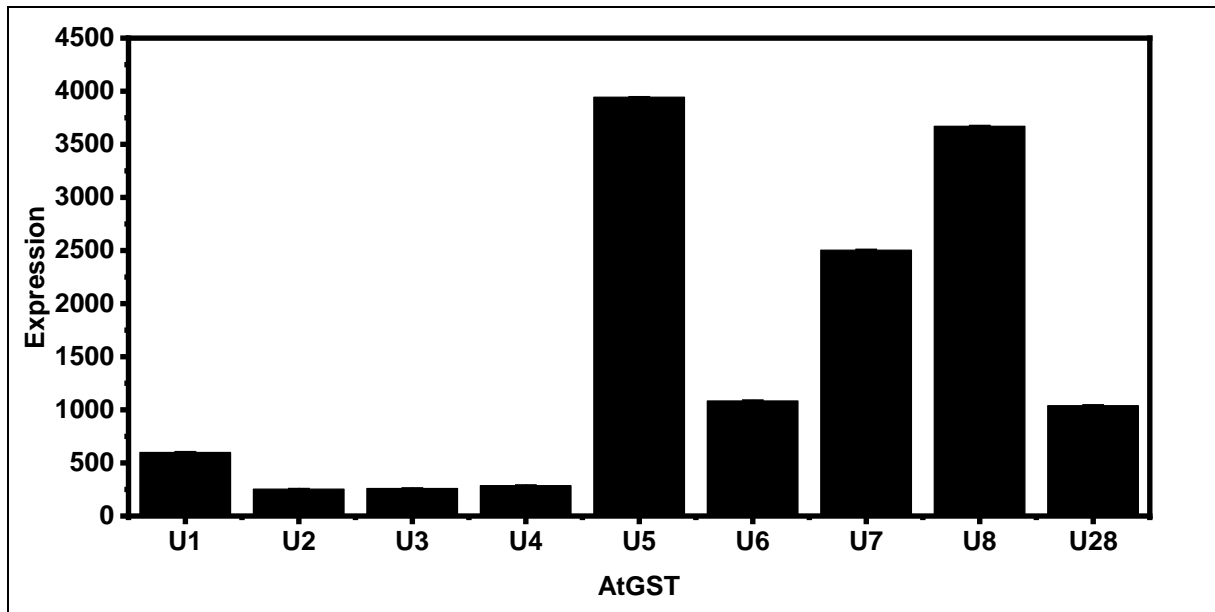
#### gstu8 CRISPR u1-u5

Die Auswirkung der unterschiedlichen Diphenylether-Herbizide auf die generierten CRISPR-Mehrfachmutanten mit der Genabschnittsdeletion zwischen der *AtGSTU1* und der *AtGSTU5* wurde mittels der Bestimmung der Pigmentkonzentrationen untersucht. Dazu wurden fünf Tage alte Keimlinge auf  $\frac{1}{4}$  MS-Platten mit entsprechenden Herbizid Konzentrationen transferiert und nach weiteren fünf Tagen analysiert.

Neben der *AtGSTU28* war bei der Konjugationsanalyse mittels *AtGST*-exprimierenden Hefen die *AtGSTU1* die zweit aktivste *AtGST* für Fluorodifen (3.3.1 Fluorodifen). Die deletierten Gene der CRISPR-Linie *gstu8 CRISPR u1-u5* zeigten bei der Konjugationsanalyse durch die *AtGST*-exprimierenden Hefen einen Umsatz von 20 % des Gesamtumsatzes (3.3.1 Fluorodifen, Abbildung 3-15). Auf Grundlage dieser Ergebnisse wäre eine erhöhte Sensitivität der CRISPR-Linie *gstu8 CRISPR u1-u5* gegenüber Fluorodifen möglich gewesen.

Neben der Aktivität der einzelnen *AtGSTs* für ein Substrat, spielt für die Ausbildung von Resistenzen auch deren Expression *in vivo* eine Rolle. Unter Nutzung von *in silico* Daten kann gezeigt werden, dass die *AtGSTs* aus dem Gencluster *AtGSTU1* bis *AtGSTU7* unterschiedlich stark *in vivo* exprimiert sind

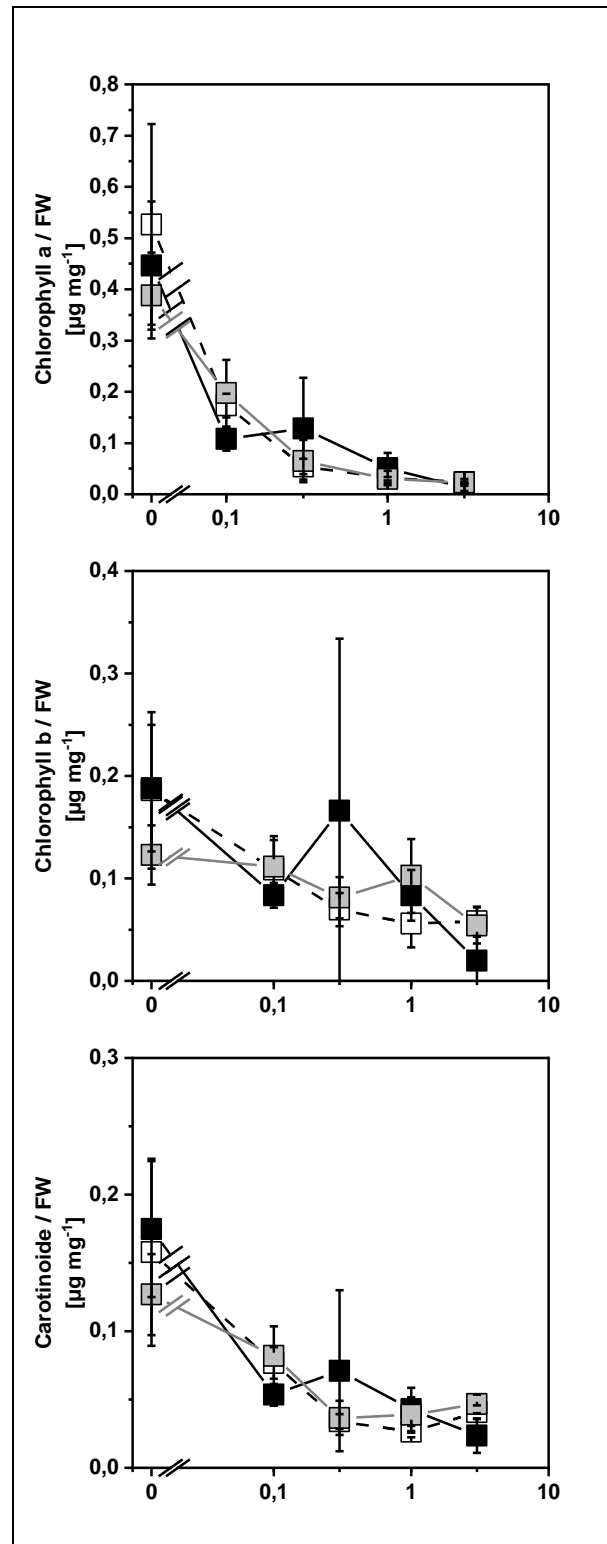
(Abbildung 3-66). Aus dem Gen-Cluster zeigte die *AtGSTU5* die höchste Expression. Die *AtGSTU8*, die nicht im Gen-Cluster vorliegt, ist ähnlich stark exprimiert. Für die CRISPR-Linie *gstu8* CRISPR u1-u5 bedeutet dies, dass zwei stark exprimierte GSTs nicht funktionell sind.



**Abbildung 3-66: Expression von *AtGSTUs* in *Arabidopsis thaliana* Keimlingen**

Dargestellt ist der Mittelwert der Expression von unterschiedlichen *AtGSTUs* in Keimlingen. Verwendet wurden die Expressionsdaten von Genevestigator® (AT-00113: mock treated seedlings; AT-00110; mock treated seedlings (3); AT-00185: untreated seedlings) für *Col-0* Keimlinge.

Wie in Abbildung 3-67 zu sehen ist, zeigten die getesteten CRISPR-Linien keinen signifikanten Unterschied in den Pigmentkonzentrationen bei den getesteten Fluorodifen-Konzentrationen im Vergleich zu der *Col-0* Wildtypkontrolle. Von der *gstu8* CRISPR u1+u5 Linie wurden die beiden Linien #1-9-3 und #1-9-4 getestet. Die Linie #1-9-3 wurde für die Deletion des Gen-Cluster-Abschnitts *AtGSTU1* bis *AtGSTU5* homozygot getestet (Abbildung 3-62). Für die Linie #1-9-4 konnte keine Deletion nachgewiesen werden. Beide Linien stammen von der gleichen Mutterpflanze ab. Bei der Linie #1-9-4 handelte es sich somit um eine Revertante. Sie entspricht daher dem genetischen Background.



**Abbildung 3-67: Pigmentkonzentration nach Fluorodifen Belastung**

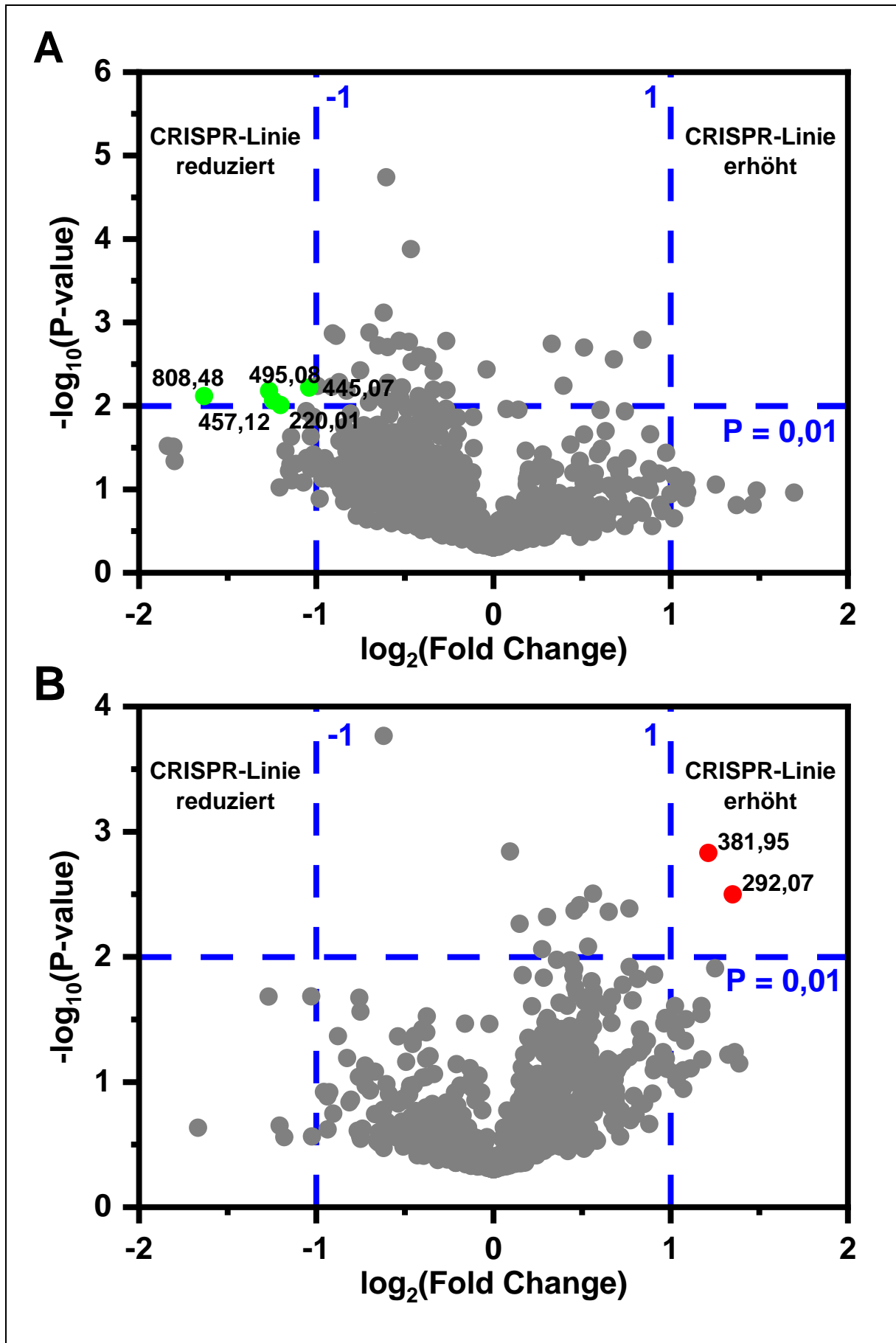
Fünf Tage alte Keimlinge wurden auf Fluorodifen-haltige MS-Platten transferiert und nach weiteren fünf Tagen deren Pigmentkonzentrationen bestimmt (2.6.1, 2.6.2 und 2.6.4). Dargestellt ist der Mittelwert von drei Proben à drei bis vier Keimlingen und der entsprechende Standardfehler. Analysiert wurden Col-0 Wildtyp Keimlinge ( ) sowie die homozygote Deletionsmutante *gstu8* CRISPR u1-u5 #1-9-3 (■) und die Deletionsrevertante *gstu8* CRISPR u1-u5 #1-9-4 (■).



Die *gstu8* CRISPR u1-u5 Linien wurde mit anderen Diphenylether-Herbiziden belastet (6 Anhang; Abbildung 6-8 und Abbildung 6-9). In der Konjugationsanalyse von Acifluorfen durch die *AtGST*-exprimierenden Hefen wurde Acifluorfen durch die *AtGSTU1*, *AtGSTU4* und *AtGSTU8* in geringen Mengen konjugiert (3.3.2 Acifluorfen und Abbildung 3-16). Die Belastung der getesteten Deletionslinie zeigte, wie bereits für Fluorodifen, keinen signifikanten Unterschied zwischen der Knock-Out-Linie und der Col-0 Wildtypkontrolle (6 Anhang; Abbildung 6-8).

Wie bei Acifluorfen und Fluorodifen ergab sich bei der Belastung mit Fomesafen kein signifikanter Unterschied zwischen der Wildtypkontrolle und den getesteten CRISPR-Linien (6 Anhang; Abbildung 6-8). Bei der Konjugation von Fomesafen mit Glutathion durch die einzelnen *AtGSTs* in Hefe, zeigte sich, dass die *AtGSTU5* die einzige *AtGSTs* aus dem deletierten Genabschnitt war, die Fomesafen konjugierte (3.3.3 Fomesafen und Abbildung 3-17). Auch für die Belastung mit Oxyfluorfen zeigten die CRISPR-Linie *gstu8* CRISPR u1-u5 im Vergleich zu dem Col-0 Wildtyp keinen signifikanten Unterschied (6 Anhang; Abbildung 6-8). Oxyfluorfen wurde in den *AtGST*-exprimierenden Hefe durch die *AtGSTs* U1 bis U5 nur in einem geringen Maß umgesetzt.

Neben der Entgiftung von Xenobiotika sind GST auch in Biosynthese- und zelluläre Transportprozesse involviert (Wagner et al. 2002; Dixon et al. 2011; Ahmad et al. 2017b; Piślewska-Bednarek et al. 2018). Jedoch ist die Erforschung diese Beteiligung der GSTs an endogenen Prozessen wenig fortgeschritten, da durch die Redundanz der GSTs vermutlich mehrere GSTs bei einem Prozess die Aufgaben übernehmen können. Die Mehrfach-Mutanten, die mittels CRISPR/Cas generiert wurden, können einen Einblick in die endogene Wirkungsweise von GSTs geben. Hierfür wurden Samen der entsprechenden Linien auf  $\frac{1}{4}$  MS angezogen und zur Keimung gebracht. Anschließend wurde die Metabolite der Keimlinge mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion isoliert. Der Extrakt der Linien wurde mittels Fourier-Transform Ionenzyklotronresonanz (FT-ICR) Massenspektrometrie analysiert. Verwendet wurde die homozygote Deletionsmutante *gstu8* CRISPR u1-u5 #1-9-3, der genetische Background *gstu8* und die Revertante *gstu8* CRISPR u1-u5 #1-9-4, die bei der Genotypisierung keine Deletion für den Genabschnitt zeigte. Die Intensität der gemessenen Massen der Deletionsmutante wurde in Verhältnis der Intensitäten des Backgrounds und der Revertante gesetzt (Abbildung 3-68). Dabei konnten Ab- und Anreicherungen für einige Massen detektiert werden.



**Abbildung 3-68: Volcano-Plot des Massen-Intensitätsunterschiedes der *gstu8* CRISPR u1-u5**

Auf ¼ MS-Platten wurden Keimlinge der *gstu8* CRISPR u1-u5 #1-9-3 Linie, des genetische Background *gstu8* sowie die Deletionsrevertante *gstu8* CRISPR u1-u5 #1-9-4 angezogen. Nach zehn Tagen bei Dauerlicht wurden die Keimlinge von den Platten genommen und gepoolt. Von vier Pools je Linie wurden die Keimlinge anschließend mit 100 % Methanol aufgeschlossen. Das Präzipitat wurde erneut mit 50 % Methanol aufgeschlossen und der vereinigte Aufschluss wurde abschließend eingedampft. Mittels FT-ICR-MS wurden die Massen der Metabolite bestimmt. Dargestellt ist die Korrelation von p-Value gegenüber der relativen Intensität jeder Masse zwischen (**A**) der homozygote Deletionsmutante und dem genetischen Background und (**B**) der homozygote Deletionsmutante und Deletionsrevertante. In grün sind die Massen dargestellt die runterreguliert und in Rot, die die hochreguliert wurde. Die Massen wurden im negativ Mode bestimmt, gezeigt sind die  $m/z$  [M-H].

Der Vergleich der Massenintensitäten und dem p-Wert im Volcano Plot der homozygoten Deletionsmutante *gstu8* CRISPR u1-u5 gegenüber dem genetischen Background zeigte eine Abreicherung von fünf Massen (Abbildung 3-68 A). Diese fünf Massen wurden mit den Daten aus vorherigen Arbeiten des Lehrstuhls zum Thema schwefelhaltiger *Arabidopsis thaliana* Metabolite verglichen (Gläser et al. 2014; Gläser-Wellmann 2016). Keine der detektierten Massen konnten unter der Annahme einer Toleranz von 100 ppm einem bekannten schwefelhaltigem *Arabidopsis thaliana* Metabolit zugeordnet werden. Es wurde vor allem auf schwefelhaltige Metabolite eingegangen, da GSTs bei Biosynthese-Prozesse Glutathion auf Intermediate überträgt, um eine Schwefel-Gruppe zu inkorporieren.

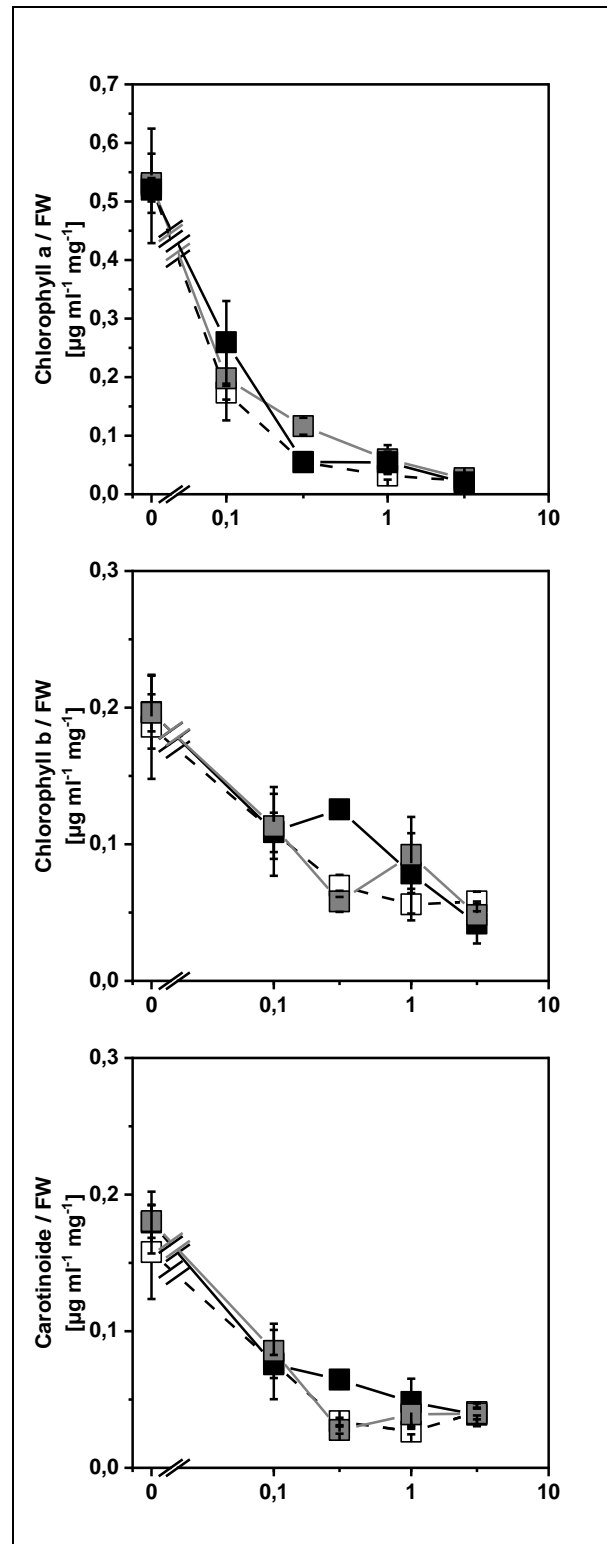
Unter Verwendung von online Datenbanken (2.8.8 Analyse von MS-Daten) konnten allgemeine Verbindung identifiziert werden, die mit einer Toleranz von 100 ppm entsprechende Massen besitzen. Bei dieser Analyse konnten für drei der fünf abgereicherten Massen in der Deletionsmutante im Vergleich zum genetischen Background (Abbildung 3-68 A) mehrere Flavonoid-Glykoside als mögliche Kandidaten identifiziert werden. So konnten für die gemessene Masse  $m/z$  [M-H]<sup>-</sup> = 445,07 zwölf Flavonoid-Glykoside mit der gleichen Summenformel mit einer Genauigkeit von 10 ppm bestimmen werden und 50 mit einer Genauigkeit von 92 ppm. Auch für die gemessene Masse  $m/z$  [M-H]<sup>-</sup> = 457,12 konnten mit unterschiedlicher Genauigkeit mehrere Flavonoid-Glykoside identifiziert werden. Vier Verbindungen hatte eine Genauigkeit von 12 ppm, eine von 66 ppm und weitere vier von 92 ppm. Für die letzte gemessene Masse  $m/z$  [M-H]<sup>-</sup> = 495,08 wurden je zwei Flavonoid-Glykoside mit einer Genauigkeit von 4 ppm und 77 ppm identifiziert. Es ist bekannt, dass GSTs Flavonoide und Flavonoid-Glykoside an den L-Sites binden können (Dixon et al. 2011; Ahmad et al. 2017b; Dixon und Edwards 2018). Es besteht daher die Möglichkeit, dass es in der Deletionsmutante zur Abreicherung der Glykoside kommen kann, da Transportprozesse inhibiert sind (4.2 Endogene Substrate der GSTs).

Der Vergleich der homozygoten Deletionsmutante und der Deletionsrevertante lieferte zwei Massen, die angereichert waren (Abbildung 3-68 B). Eine der Massen,  $m/z$  [M-H]<sup>-</sup> = 292,07, entspricht mit einer Genauigkeit von 13 ppm der Verbindung S-(Indolylmethylthiohydroxymoyl)-L-Cystein. Diese Verbindung konnte auch in der Datenbank der schwefelhaltigen Metabolite gefunden werden (Gläser-

Wellmann 2016). Es handelt sich bei dieser Verbindung um ein Intermediat der Camalexin-Biosynthese (4.2 Endogene Substrate der GSTs).

#### **gstu8 CRISPR u1-u7**

Wie für die *gstu8* CRISPR u1-u5 wurde auch die Auswirkung der Diphenylether-Herbizide auf die *gstu8* CRISPR u1-u7 Mehrfachdeletionsmutante getestet. In der *gstu8* CRISPR u1-u7 Mutante sind im Vergleich zur *gstu8* CRISPR u1-u5 Mutante weitere zwei *AtGSTs*, die *AtGSTU6* und die *AtGSTU7*, deletiert. Beide *AtGSTs* zeigten geringe Aktivität gegenüber Fluorodifen in der Konjugationsanalyse mittels der *AtGST*-exprimierenden Hefen (3.3.1 Fluorodifen). Im Vergleich zur *gstu8* CRISPR u1-u5 Linie wurde nur ein geringer Unterschied erwartet, jedoch sollte wie die *gstu8* CRISPR u1-u5 auch die *gstu8* CRISPR u1-u7 gegenüber der Wildtyp-Kontrolle möglicherweise eine erhöhte Sensitivität für Fluorodifen zeigen. Die Bestimmung der Pigmentkonzentrationen der *gstu8* CRISPR u1-u7 Linie im Vergleich zum genetischen Background und der Col-0 Wildtyp-Kontrolle zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Linien (Abbildung 3-69).

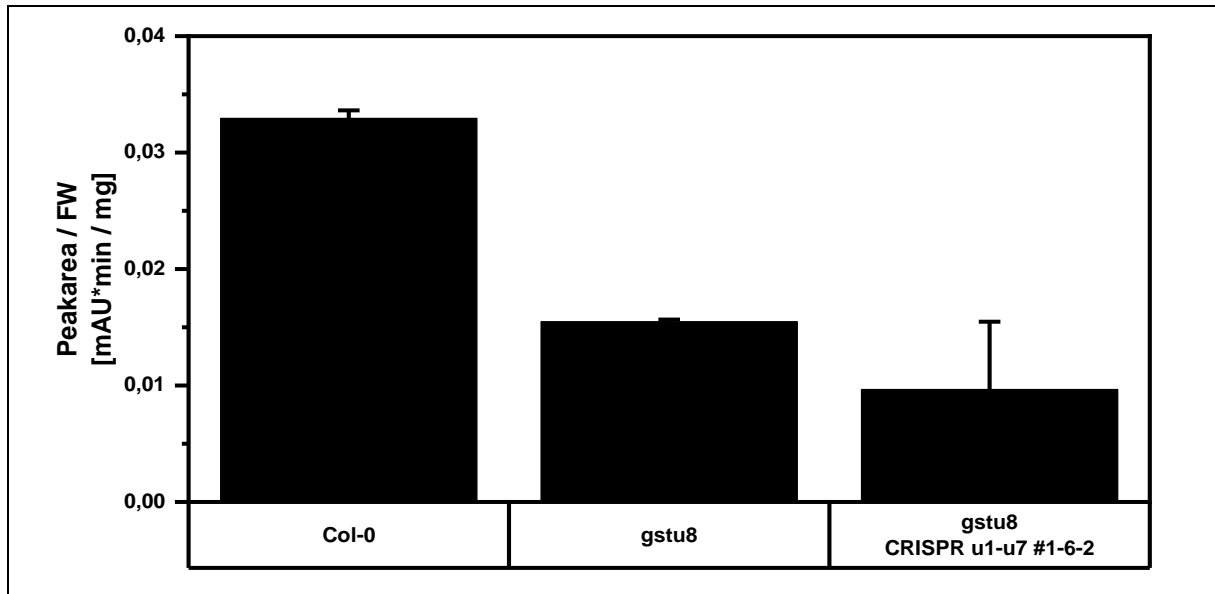


**Abbildung 3-69: Pigmentkonzentration nach Fluorodifen Belastung**

Die Pigmentkonzentration der CRISPR-Linien erfolgt, wie in Abbildung 3-67 beschrieben. Dargestellt ist der Mittelwert von drei Proben à drei bis vier Keimlingen und der entsprechende Standardfehler. Getestet wurden Col-0 (□) gstu8 (◻) und gstu8 CRISPR u1-u7 (■) Keimlinge.

Neben der Analyse auf physiologische Unterschiede zwischen der gstu8 CRISPR u1-u7 Linie, dem genetischen Background gstu8 und dem Col-0 Wildtyp, wurde auch überprüft, ob sich die Menge des gebildeten Phenyl-Glutathion-Konjugates zwischen den einzelnen Linien unterscheidet. Hierzu wurden

Keimlinge in Flüssigkulturen überführt und mit Fluorodifen belastet. Nach der Belastung wurden mittels HPLC die Konjugatmenge bestimmt (Abbildung 3-70). Dabei zeigte sich, dass die Einzel-Knock-Out *gstu8* gegenüber dem Wildtyp signifikant geringere Mengen des Phenyl-Glutathion-Konjugates aufwies. Für die *gstu8* konnten nur  $46,9 \pm 0,6\%$  der Konjugatmenge wie in Col-0 detektiert werden. Auch die achtfach Mutante *gstu8* CRISPR u1-u7 wies reduzierte Mengen des Phenyl-Glutathion-Konjugates auf. Auch in diesem Fall unterschied sich die Konjugatmenge signifikant von der Menge im Col-0 Wildtyp, jedoch nicht gegenüber dem genetischen Background *gstu8*.

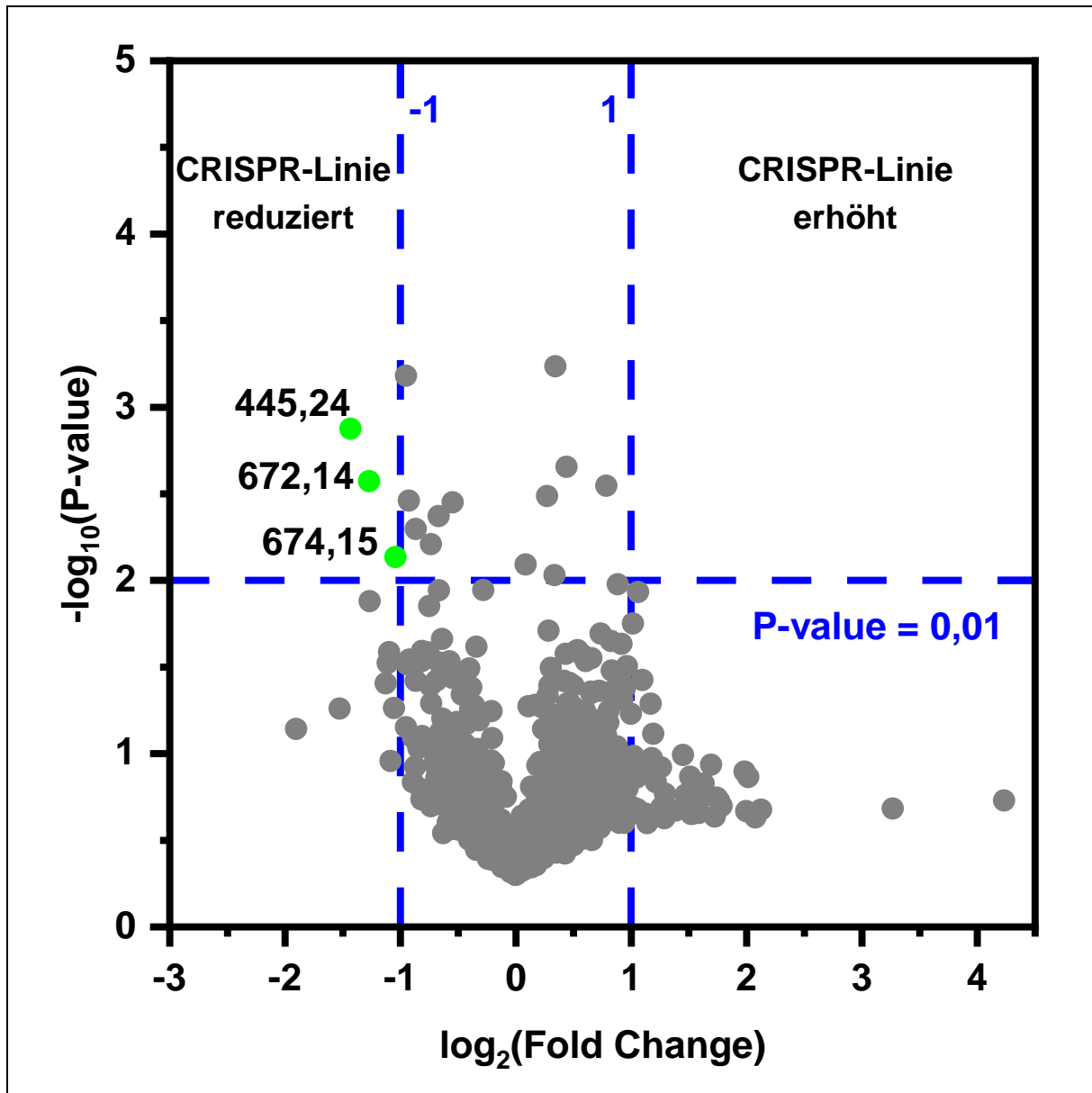


**Abbildung 3-70: Konjugation von Fluorodifen mit Glutathion in planta**

Zehn Tage alte Keimlinge wurden in Flüssigkulturen überführt und über Nacht weiter angezogen (2.6.1 und 2.6.5). Anschließend wurden die Kulturen mit  $100 \mu\text{M}$  Fluorodifen für 24 h belastet. Der Gehalt der GS-Fluorodifen Gehalt wurde in den Keimlingen mittels HPLC detektiert (2.7.2).

Neben der physiologischen Wirkung von Fluorodifen auf die *gstu8* CRISPR u1-u7 Linie wurde auch die Wirkung der anderen Diphenylether-Herbizide untersucht (6 Anhang, Abbildung 6-10 und Abbildung 6-11). Wie bei Fluorodifen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der CRISPR-Mutante, dem genetischen Background und der Wildtypkontrolle festgestellt werden. Der Vergleich mit der Konjugationsanalyse durch die *AtGST*-exprimierenden Hefen zeigte, dass die Diphenylether-Herbizide durch einige der deletierten *AtGSTs* der *gstu8* CRISPR u1-u7 Linie konjugiert wurden (3.3 GS-Konjugation von Herbiziden durch *AtGSTs* in Hefe).

Wie für die sechsfach Mutante *gstu8* CRISPR u1-u5 wurde auch für die achtfach Mutante analysiert, ob sich die Deletion der *AtGSTU1* bis *AtGSTU7* auf das gesamte Metabolom auswirkt. Hierfür wurden Samen auf  $\frac{1}{4}$  MS-Platten ausgebracht und zur Keimung gebracht. Die Keimlinge wurden von den Platten geerntet und nach Flüssig-Flüssig-Extraktion ebenfalls mittels FT-ICR-Massenspektroskopie untersucht. Im Vergleich zum genetischen Background konnten Massen detektiert werden, die abgereichert vorlagen (Abbildung 3-71).



**Abbildung 3-71: Volcano-Plot des Massen-Intensitätsunterschiedes der gstu8 CRISPR u1-u7 #1-6-2**

Auf ¼ MS-Platten wurden oberflächensterilisierte Samen ausgebracht und für zwei Tage bei 4 °C stratifiziert. Anschließend wurden diese für zehn Tage bei Dauerlicht angezogen. Die Keimlinge wurden von den Platten genommen und deren Frischgewicht bestimmt. Daraufhin wurden die Metabolite im ersten Schritt mit 100 % Methanol isoliert. Im zweiten Schritt wurde aus dem Präzipitat des ersten Schrittes nochmals mit 50 % Methanol Metabolite extrahiert. Die beiden Überstände wurden vereinigt und über Nacht wurde das Methanol und Wasser abgedampft. Die Proben wurden mittels FT-ICR-MS analysiert. Zu sehen ist die Korrelation des p-Value gegenüber dem relativen Intensitätsunterschied zwischen der gstu8 CRISPR u1+u7 und dem genetischen Background gstu8.

Ein Vergleich mit den schwefelhaltigen *Arabidopsis thaliana* Metabolit ergab für keine der gemessenen Massen ein Ergebnis unter der Annahme, dass im negativ Modus um eine [M-H]<sup>-</sup> Masse handelte. Unter Nutzung von online Datenbanken (2.8.8 Analyse von MS-Daten) konnte für die gemessene Masse 445,24 unterschiedliche Clavulon-Derivate als mögliche Kandidaten mit einer Genauigkeit von 28 ppm bestimmt werden. Bei den Clavulon-Derivaten handelt es sich um Eicosanoide. Für Eicosanoide konnte gezeigt werden, dass AtGSTs diese aus einem Pflanzen-Extrakt herausfischen können (Dixon und Edwards 2018).

### 3.9 Homologe Rekombination *in planta*

Die Genome-Editierung für die Generierung von speziellen Mutationen nutzt Nukleasen, wie beispielsweise die CRISPR/Cas-Nukleasen Cas9 und Cas12, Zink-Finger-Nukleasen oder TALE-Nukleasen, die genomische DNA schneidet (Fauser et al. 2012; Bortesi und Fischer 2015; Steinert et al. 2015; Malzahn et al. 2017; Schindele et al. 2018; Kumlehn et al. 2018; Zhang et al. 2019b). Nach dem Doppelstrangbruch kann dieser durch endogenen DNA-Reparaturmechanismen behoben werden. Diese Mechanismen zur Reparatur von DNA-Schäden sind in eukaryotischen Zellen hoch konserviert (1.5.1 DNA-Reparaturmechanismen; San Filippo et al. 2008; Lieber 2010). Jedoch unterscheiden sich Pflanzen signifikant von anderen eukaryotischen Organismen. Während in den meisten Organismen die Homologe Rekombination Anwendung für die DNA-Reparatur findet, wird in Pflanzen das *non-homologous end-joining* bevorzugt (Huang und Puchta 2019; Lin et al. 2020). Gerade die Homologe Rekombination bietet jedoch viele Möglichkeiten im Bereich der Genome-Editierung, wie beispielsweise die Generierung von Knock-Ins. Mit solchen Knock-Ins können nicht nur Pflanzen gentechnisch gezüchtet werden, die einen Funktionsverlust eines Gens aufweisen, sondern auch gezielte Modifikation von genomischen Abschnitten erzeugt werden (Huang und Puchta 2019; Lin et al. 2020). So können beispielsweise endogene Promotoren verändert oder ausgetauscht werden, sodass es zu einer veränderten Expression des Gens kommt. Weiterhin ist es hyperaktive Proteinvarianten zu erhalten oder Gene zu generieren, die ein Fluorophor-getaggtetes Protein kodieren. Hierfür würde die Gen-Sequenz für den Fluorophor unmittelbar vor das Stop-Codon der endogenen, genomischen Sequenz als Knock-In eingebracht werden.

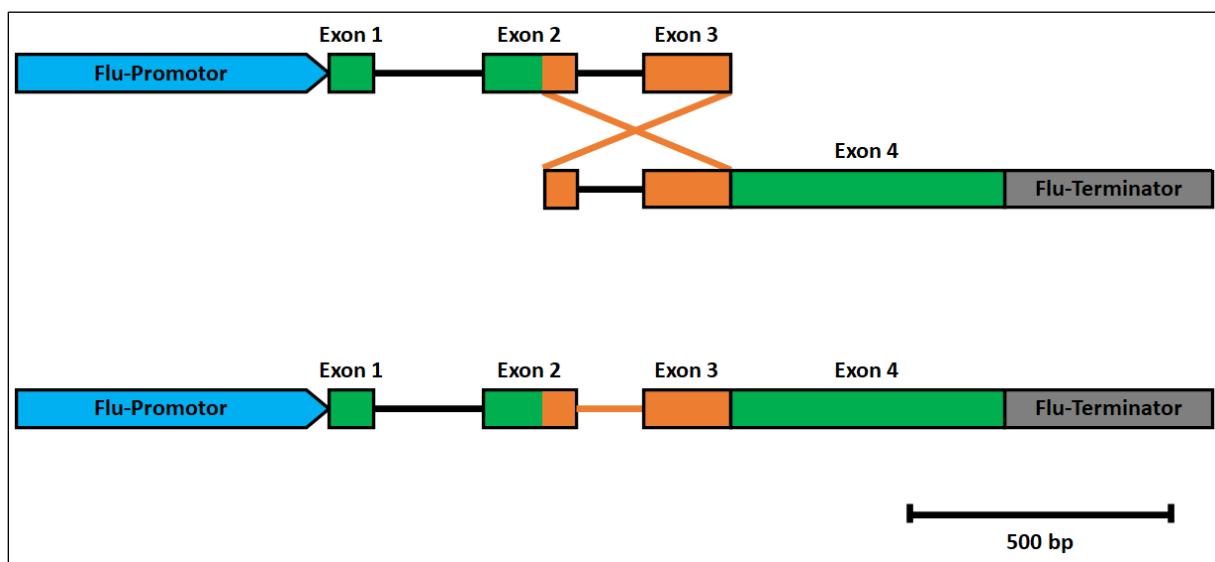
Im Fall der in dieser Arbeit im Fokus stehenden *AtGSTs* hätte ein System, das die *in planta* Generierung von homolog rekombinierten Genen ermöglicht, viele Anwendungsmöglichkeiten. Durch die Genom-Editierung der Promotorsequenz könnte die Expression von spezifischen *AtGSTs* erhöht werden, sodass es zu einer Resistenz gegenüber bestimmten Herbiziden kommt. Weiterhin könnte die Gewebespezifische Expression von *AtGSTs* moduliert werden. Vorteil der Knock-Ins gegenüber T-DNA-Insertionslinien ist, dass nach der Modifikation die T-DNA durch Selbstung oder Kreuzung ausselektiert werden kann. Bei Insertionslinien ist der Integrationslokus zufällig, sodass die Funktionalität von anderen Genen beeinträchtigt werden kann. Daher werden mehrere unabhängige Linien benötigt, um einen verlässlichen Phänotyp zu erhalten. Weiterhin wäre es möglich Domänen einzelner *AtGSTs* mit denen anderer *AtGSTs* auszutauschen oder zu modifizieren. Durch diese Veränderungen könnten hyperaktive Varianten gebildet werden. Auch das Einbringen spezifischer nicht-synonymer SNPs wäre möglich.

Pflanzen besitzen alle Gene, die für Proteine der Homologe Rekombination codieren. Daher muss es regulatorische Mechanismen, wie beispielsweise Checkpoint-Faktoren des Zellzyklus, geben, die die



DNA-Reparatur kontrollieren (Fritsch et al. 2004; Heitzberg et al. 2004). Teil dieser Arbeit war es mittels EMS-Mutagenese zufällige Mutationen in Samen einer *Arabidopsis thaliana* Reporterlinien zu generieren, die sich auf Proteine der Reparaturmechanismen auswirken. Ein Reporterkonstrukt wurde in die mutagenisierten Pflanzen transformiert, das nach erfolgreicher Homologen Rekombination, induziert durch einen Doppelstrangbruch, ein funktionelles Gen herstellte. Der DNA-Doppelstrangbruch sollte durch die Cas9 innerhalb des transformierten, nicht-funktionellen Gen generiert werden (Abbildung 3-72). Durch Homologe Rekombination sollte so die Funktionalität wiederhergestellt werden und der Phänotyp der verwendeten Ausgangslinie komplementiert werden.

Als Ausgangslinie diente die flu5C-Mutante. Diese weist eine Punktmutation im *AtFLU*-Gen (At3g14110; FLU: *Fluorescent in blue light*) auf, die zu einer Punktmutation im *AtFLU*-Protein führt. Bei dieser Punktmutation handelt es sich um die A262V-Mutation (Meskauskiene et al. 2001). Werden Keimlinge der flu5C-Mutante im Dunkeln angezogen, werden diese blau fluoreszierend. Weiterhin reagiert die Mutante sensitiv auf Lichtwechsel (Meskauskiene et al. 2001). Während den Dunkelphasen kommt es zu einer Akkumulation von Protoporphyrin IX, welches unter Lichtexposition radikale Sauerstoffspezies bildet. Dieser Phänotyp ähnelt der Wirkung der Diphenylether-Herbizide, wenn auch diese nicht zu einer Akkumulation von Protoporphyrin IX, sondern seiner Vorstufe Protoporphyrinogen IX führen (Meskauskiene et al. 2001). Beide Phänotypen der flu5C-Mutante sind rezessiv und können durch Transformation mit einem funktionellen Gen komplementiert werden.

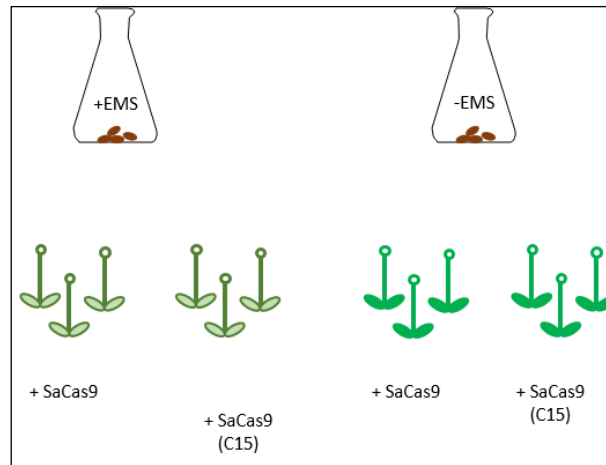


**Abbildung 3-72: cis-homologe Rekombination des künstlichen Flu-Genes**

Die SaCas9 führt zu einem DNA-Doppelstrangbruch auf der T-DNA am 5'-Ende ihrer eigenen codierenden Sequenz. Flankiert ist diese Sequenz durch zwei homologe Regionen. Durch die Homologe Rekombination dieser Regionen geht die Sequenz für die SaCas9 verloren und die Funktionalität des FLU-Genes auf der T-DNA wird hergestellt. Durch dieses können die transformierten flu5C-Keimlinge das Screening überleben.

Es wurden hunderttausend Samen der flu5C-Linie mittels Ethylmethansilfonat (EMS) mutagenisiert und anschließend auf Erde ausgebracht. Zusätzlich wurden 40.000 nicht mutagenisierte Samen auf

Erde ausgebracht. Diese Population an Pflanzen wurden anschließend mit unterschiedliche Reporter-Konstrukten transformiert. Diese Reporter exprimierten entweder die wildtypische SaCas9 oder einer Version, die ein vorzeitiges Stop-Codon trug (C15G). Abbildung 3-73 zeigt den schematischen Ablauf zur Generierung der HR-Population.

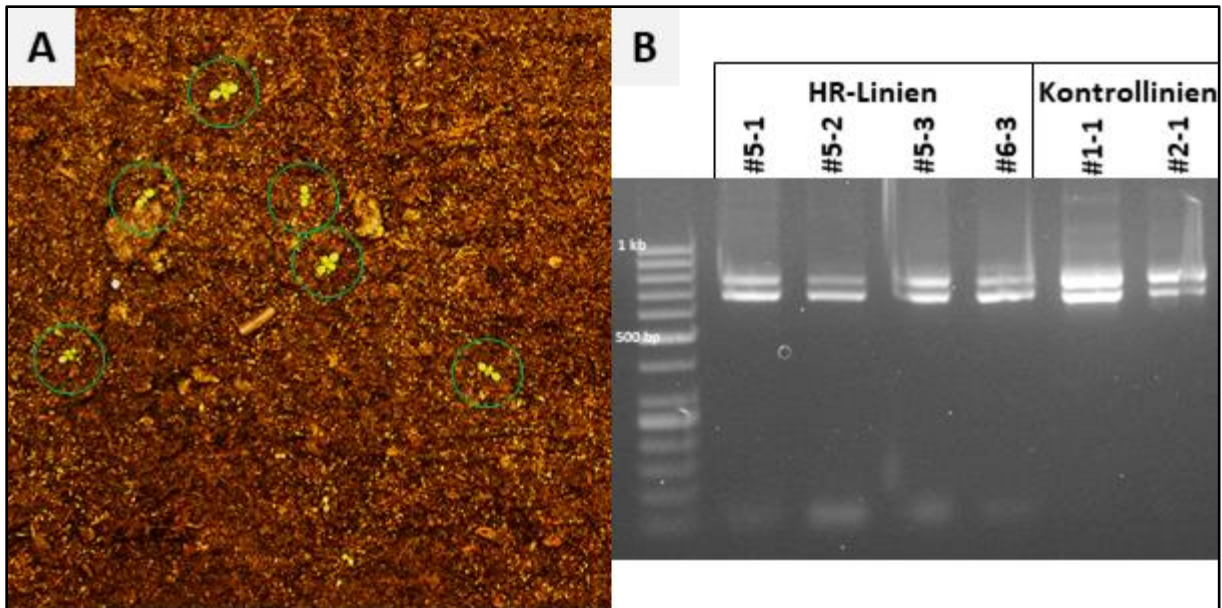


**Abbildung 3-73: Schematischer Aufbau der zu generierenden HR-Populationslinien**

Für die Generierung der HR-Population wurden Samen mittels EMS mutagenisiert. Nicht mutagenisiertes Saatgut wurde als Kontrolle verwendet. Anschließend wurden die Pflanzen entweder mit der SaCas9 oder einer nicht exprimierten Version SaCas9 (C15G) transformiert.

Auf den Konstrukten wurde neben der SaCas9 auch das wildtypische AtFLU-Gen kodiert. Jedoch befand sich die SaCas9-Expressionskassette innerhalb des Genes, weshalb kein vollständig aktives Gen exprimiert werden konnte. Flankiert wurde die SaCas9-Expressionskassette von zwei zueinander homologen Sequenzen des AtFLU-Genes. Die homologe Sequenz am 5'-Ende der Expressionskassette trug zusätzlich eine Target-Sequenz, sodass die SaCas9 an dieser Stelle einen Doppelstrangbruch generieren konnte. In der Theorie sollte es in einer HR-positiven Linie nach erfolgreichem Doppelstrangbruch zur Homologen Rekombination der beiden homologen Sequenz kommen, mit gleichzeitigem Verlust der SaCas9-Expressionskassette.

Durch diese *cis*-homolog rekombinierte T-DNA sollte der Phänotyp der flu5C-Mutante komplementiert werden. Hierzu wurde das aus der Mutagenese und Transformation gewonnene Saatgut auf Erde bei einem sechsständigen Wechsel von Licht und Dunkelheit angezogen. Keimlinge die den Lichtwechsel überlebten wurden anschließend mittels PCR auf die homolog rekombinierte Wildtypversion des AtFLU-Genes hin geprüft. Da dem homolog rekombinierten Gen ein Intron fehlte, konnte dies von dem endogenen AtFLU-Gen in der PCR unterschieden werden. Abbildung 3-74 zeigt positive Keimlinge nach dem Screening dargestellt. Zudem ist exemplarisch die Genotypisierungsanalyse von positiven Keimlingen dargestellt.



**Abbildung 3-74: Screening auf Homologe Rekombination des AtFLU-Genes**

In **A** sind exemplarisch Keimlinge nach 11 Tagen Screening mit einem 6 h Hell und 6 h Dunkel Rhythmus auf Erde dargestellt. Grün markiert sind positive Keimlinge die anschließend in Töpfe überführt wurden. Von diesen Keimlingen wurde genomische DNA isoliert und mittels PCR auf das AtFLU-Gen analysiert. Die PCR ergab bei erfolgter Homologen Rekombination zwei Banden, siehe **B**. Die größere Bande wurde vom endogenen AtFLU-Gen amplifiziert. Die kleinere Bande stammt von einem rekombinierten wildtypischen AtFLU -Gen auf der T-DNA, da diesem ein Intron fehlt.

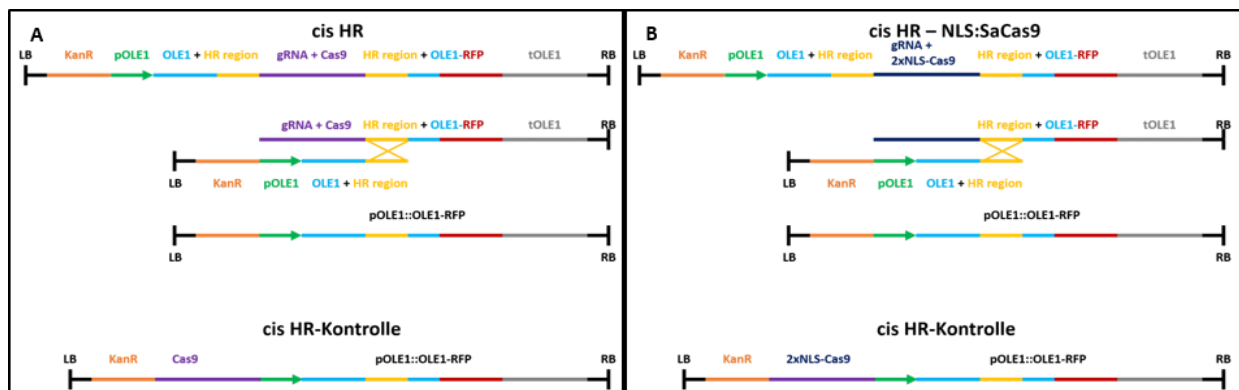
In Tabelle 3-4 sind alle getesteten Linien mit der Anzahl an positiv getesteten Pflanzen aufgeführt. Insgesamt wurden 26 Linien identifiziert, die positiv auf die Homologe Rekombination waren. Diese wurden alle mittels PCR bestätigt. Anschließend wurde von diesen ein neues Saatgut generiert und dieses wurde für die Transformation mit einem zweiten Reporter-Konstrukt verwendet.

**Tabelle 3-4: Erste Pflanzengeneration mit Homologer Rekombination**

Aufgelistet sind die Anzahl der HR-positiven Pflanzen, sowie die Anzahl verwendeten Samen je Linie. Es wurden als Genotyp entweder Col-0 oder flu5C Pflanzen verwendet, die teilweise mit EMS mutagenisiert und mit unterschiedlichen Reporter-Konstrukten transformiert wurden.

Genotyp	Mutagenese	Transformation	Liniennummer	Getestete Samen	Positive Pflanzen
Col-0	Kein EMS	SaCas9	#1	30.000	0
flu5C	Ohne EMS	Keine Transformation	#1	300.000	0
			#2	275.000	0
			Positiv Kontrolle	#1	30.000
		SaCas9 C15G	#1	100.000	0
			#2	100.000	0
		SaCas9	#1	400.000	0
			#2	200.000	0
			#3	200.000	0
		SaCas9 C15G	#1	200.000	0
			#3	200.000	0
			#1	300.000	1
			#2	400.000	4
			#3	300.000	0
			#4	400.000	0
			#5	400.000	3
			#6	400.000	3
			#8	300.000	0
			#9	300.000	0
			#10	300.000	0
#12	300.000		4		
#13	300.000		1		
flu5C	Mit EMS	SaCas9	#14	400.000	0
	#15		400.000	0	
	#17		400.000	0	
	#18		400.000	1	
	#19		400.000	0	
	#20		400.000	0	
	#21		200.000	2	
	#22		200.000	1	
	#23		200.000	1	
	#28		200.000	0	
	#29		200.000	1	
	#31	200.000	1		
	#33	200.000	3		

Wie bei dem ersten Reporter-Konstrukt sollte auch auf dem zweiten Reporter-Konstrukt eine *cis*-Homologe Rekombination auf der eingebrachten T-DNA erfolgen. Es wurden zwei Versionen des zweiten Reporters verwendet. Während die eine Version in der Cas9-Expressionskassette die SaCas9 unter dem eizellspezifischen DD45-Promotor exprimiert, wurde in der zweiten Version ebenfalls die SaCas9 unter dem eizellspezifischen DD45-Promotor exprimiert, jedoch war diese sowohl N- als auch C-terminal mit je einem Kernlokalisierungssignal versehen. Anstelle des *AtFLU*-Genes wurde das *OLE1*-Gene mit einer RFP-Fusion als Reporter, wie das pFAST-Element, verwendet (Abbildung 3-75). Das *OLE1*-Gen kodiert ein Protein, dass in der Membran der Ölkörper von Samen exprimiert ist (Shimada et al. 2010). Durch die Fusion mit RFP kommt es zu einer roten Fluoreszenz der Samen. Es konnte bei den Transformatierten Samen jedoch keine Fluoreszenz detektiert werden. Es ist bereits bekannt, dass Mutationen von Genen die bei der Homologen Rekombination und dem NHEJ beteiligt sind, es zu genomischen Instabilitäten kommen kann.



**Abbildung 3-75: Struktureller Aufbau und Homologe Rekombination Ereignis des zweiten Reporter-Konstrukt**  
 Dargestellt ist der Aufbau der zwei Versionen des zweiten Reporter-Konstrukt. Die beiden Versionen unterschieden sich durch die Lokalisationssignale der SaCas9. Bei der einen Version trug die SaCas9 keine Signale (A) während bei der anderen Version die SaCas9 sowohl am N- als auch am C-Terminus mit einem Kernlokalisierungssignal versehen war (B). Nach dem die SaCas9 einen DNA-Doppelstrang vor der Cas9-Expressionskassette generierte, sollte es durch die homologen Regionen zu einer Rekombination kommen. Dabei sollte ein funktionelles Gen, bestehend aus dem *OLE1*-Gen und einer Fusion von RFP kommen. Zudem wurde eine Kontrolle verwendet, bei der das funktionelle Gen bereits vorhanden war.

## 4 Diskussion

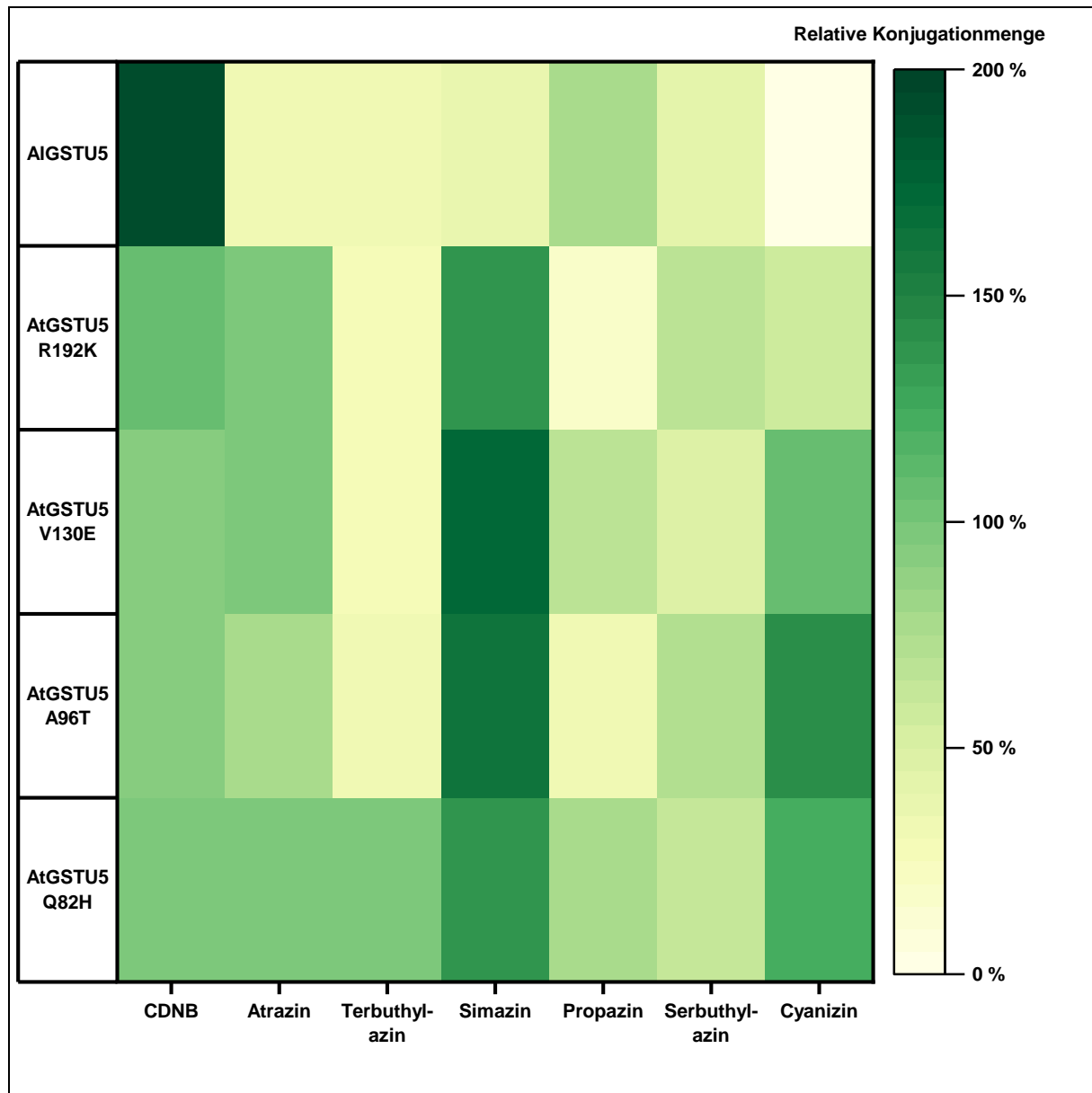
### 4.1 Detoxifizierende Rolle der GSTs

Zentrales Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von spezifischen exogenen und endogenen Substraten der Glutathion-Transferasen. Glutathion-Transferasen haben *in vivo* v. a. die Aufgabe Fremdstoffe und toxische Intermediate zu detoxifizieren (Frova 2006; Krajewski et al. 2013). Zudem sind GSTs bei einigen Biosyntheseprozessen involviert, meist um Schwefelgruppen in Verbindungen einzubringen (Bednarek et al. 2009; Czerniawski und Bednarek 2018; Piślewska-Bednarek et al. 2018). Der Schwefel wird durch Glutathion geliefert und anschließend wird das Tripeptid-Rückgrat recycelt. In *Arabidopsis thaliana* kodieren 55 Gene für AtGSTs (Krajewski et al. 2013). Die GST-Proteine weisen eine hohe Redundanz auf (Dixon et al. 2009; Chen et al. 2012; Krajewski et al. 2013). Durch diese Redundanz werden Funktionsanalysen der GSTs *in planta* erschwert. Vor allem die spezifische Detoxifizierung von Xenobiotika durch einzelne GSTs lässt sich nur schwer *in planta* aufklären. Um diese Redundanzen zu umgehen, wurden in dieser und vorherigen Arbeiten die AtGSTs heterolog in Hefe exprimiert (Krajewski et al. 2013; Kowalski 2016).

Mit den heterolog exprimierten AtGSTs konnte bereits gezeigt werden, dass die Triazin-Herbizide spezifisch durch einzelne AtGSTs konjugiert werden (Kowalski 2016). So werden die Triazin-Herbizide hochspezifisch durch die AtGSTU5, AtGSTU18 und AtGSTU22 umgesetzt. In dieser vorgelegten Arbeit wurde für unterschiedliche Herbizid-Klassen und einigen natürlichen Verbindungen die GST-abhängige Entgiftung untersucht. Von unterschiedlichen Akzessionen wurde die Aktivität der AtGSTU5 sowie die Aktivität der A/GSTU5, das GSTU5-Homolog aus *Arabidopsis lyrata*, gegenüber den Triazin-Herbiziden untersucht. Für alle AtGSTs aus Col-0 Wildtyp wurde das Vermögen der Konjugation von den Diphenylether-Herbiziden und von natürlichen Diphenylethern analysiert.

Anknüpfend an vorherige Arbeiten wurde, wie oben erwähnt, in dieser Arbeit die Konjugation der Triazin-Herbizide mit Glutathion durch die GSTU5 weiteruntersucht (Kowalski 2016). Hierfür wurden *in silico* unter Nutzung des *Catalog of Arabidopsis thaliana Genetic Variation (1001genomes.org; Weigel und Mott 2009)* die nicht-synonymen SNPs der AtGSTU5 identifiziert. Insgesamt wurden für diese *in silico* Analyse die Gen-Sequenzen von 1135 Akzessionen verwendet. Im Zuge der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die einzelnen AtGSTU5-Varianten die unterschiedlichen Triazin-Herbizide unterschiedlich effizient konjugieren. Zusammenfassend sind die relativen Konjugatmengen der einzelnen natürlichen Varianten der GSTU5 für die Markersubstanz CDNB und den Triazin-Herbiziden in Abbildung 4-1 dargestellt. Es ließ sich durch Hefeexpression zeigen, dass die A/GSTU5 aus *A. lyrata* die Triazin-Herbizide weniger effizient mit Glutathion konjugierte als die AtGSTU5 aus Col-0, während die Konjugation der Markersubstanz CDNB bei der A/GSTU5 ungefähr doppelt so hoch war wie bei der

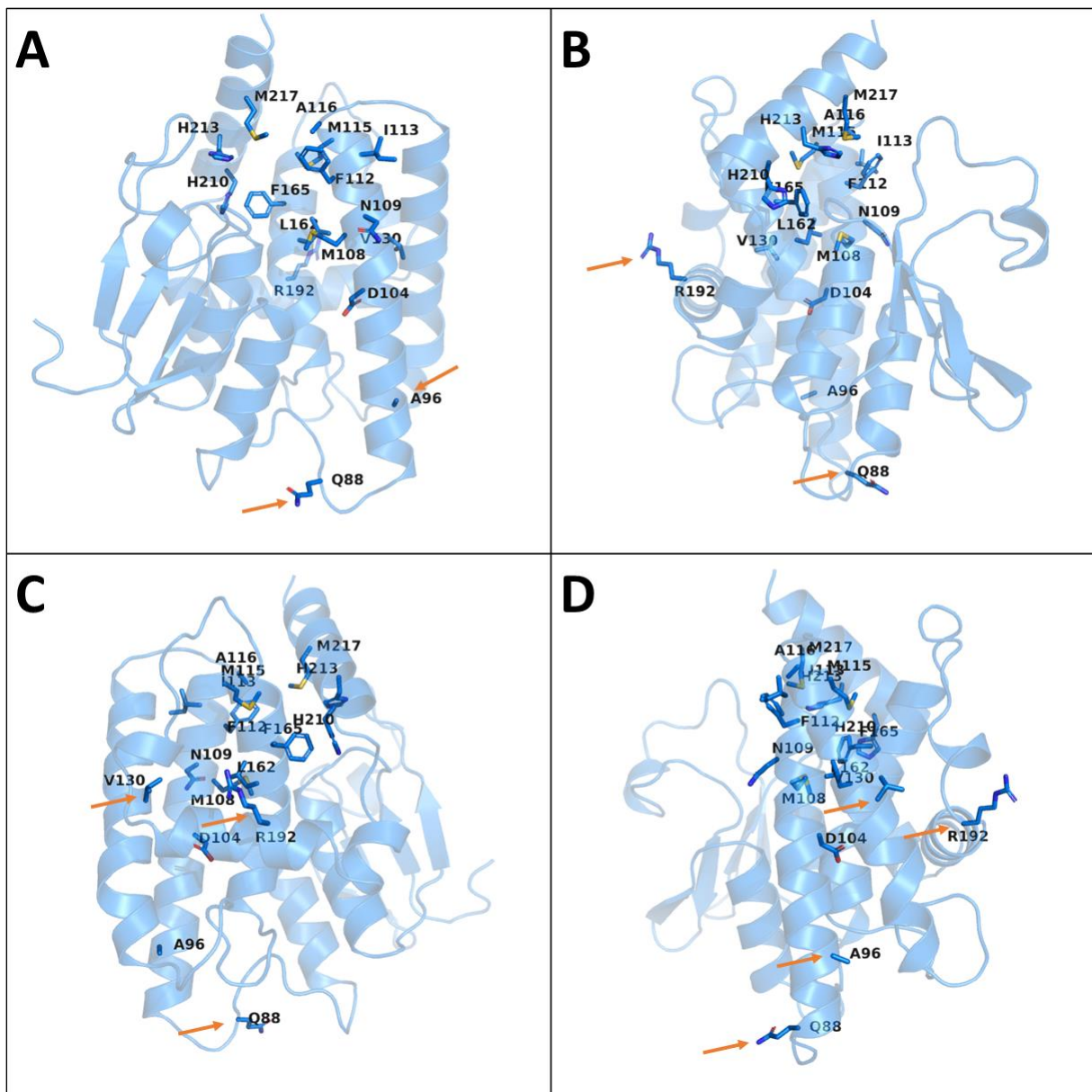
AtGSTU5 aus Col-0 (Abbildung 3-47). Alle AtGSTU5-Varianten konjugierten CDNB annähernd im gleichen Maße. Für die Triazin-Herbizide zeigten sich deutliche Unterschiede in den Konjugatmengen der einzelnen AtGSTU5-Varianten (3.7 Natürliche Variation des GSTU5 Gens; Abbildung 4-1).



**Abbildung 4-1: Relativer Umsatz der Triazin Herbizide durch die GSTU5 Varianten in Hefe**

Für die Markersubstanz CDNB und die Triazin-Herbizide ist die relative Konjugatmenge der einzelnen GSTU5-Varianten, bezogen auf die Konjugatmenge der AtGSTU5 aus Col-0, dargestellt. Die absoluten Konjugatmengen sind in Abbildung 3-43, Abbildung 3-44, Abbildung 3-46, Abbildung 3-47 und Abbildung 3-48 enthalten.

Auf der Grundlage von Proteinkristallstrukturen lässt sich die dreidimensionale Struktur berechnen (Kelley et al. 2015) und homologe Proteinstrukturen simulieren.



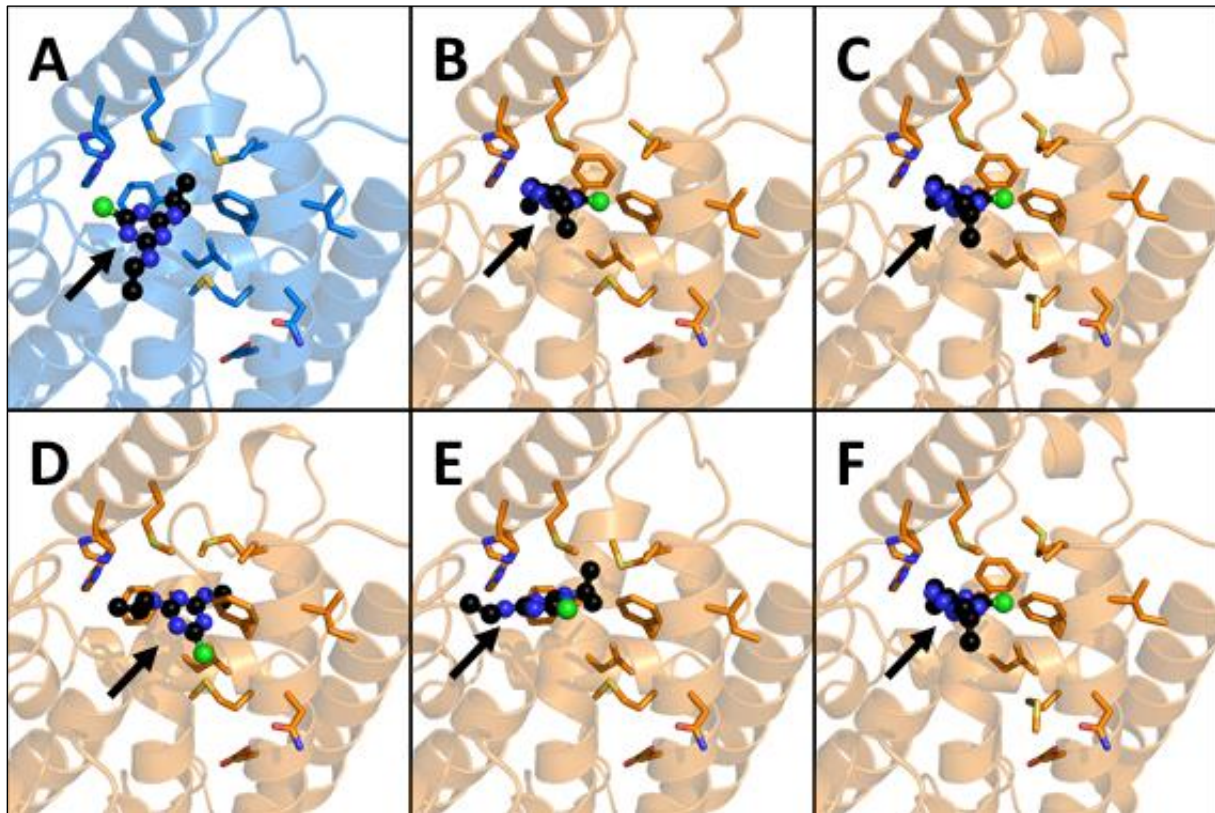
**Abbildung 4-2: Dreidimensionale Struktur der AtGSTU5**

Gezeigt wird die postulierte, dreidimensionale Struktur der AtGSTU5 aus Col-0 aus unterschiedlichen Blickwinkeln. In (B) ist das Protein um 90° gegenüber der Darstellung in (A) um die y-Achse gedreht. Eine weitere 90°-Drehung ist in (C) gezeigt und in (D) eine Drehung um 270° gegenüber der Darstellung in (A). Die Aminosäurereste der H-Site sowie die, für die nsSNPs bekannt sind, sind als Sticks dargestellt. Weiter sind die sichtbaren Aminosäurereste der nsSNPs mit Pfeilen markiert. Von der Aminosäuresequenz wurden 96 % mit einer Genauigkeit von 100 % an die Kristallstruktur 4J2F simuliert (Kim et al. 2013).

In der simulierten Struktur der AtGSTU5 aus Col-0 befindet sich die Aminosäuren der nsSNPs definitiv nicht innerhalb der H-Site (Abbildung 4-2). Jedoch zeigen die Daten dieser Arbeit, dass die Aminosäureaustausche durch die nsSNPs zu Aktivitätsveränderungen führen. Evolutionär ist diese unterschiedliche Substratspezifität der GSTs von Interesse, da sie möglicherweise auf eine Anpassung auf verschiedene Umweltfaktoren zurückzuführen sind. Welche Auswirkungen die einzelnen Aminosäureaustausche auf die Bindung des Substrates haben, lassen sich mit Simulationen vorhersagen und mittels Proteinkristallstrukturanalysen anschließend bestätigen oder widerlegen. Mit



solchen *in silico* Analysen konnten bereits sowohl die GST-Proteinstruktur als auch die Bindung von Substraten an entsprechende GSTs vorhergesagt werden (Axarli et al. 2009).



**Abbildung 4-3: Simulierte Bindung von Atrazin an die H-Site von natürlichen GSTU5-Variationen**

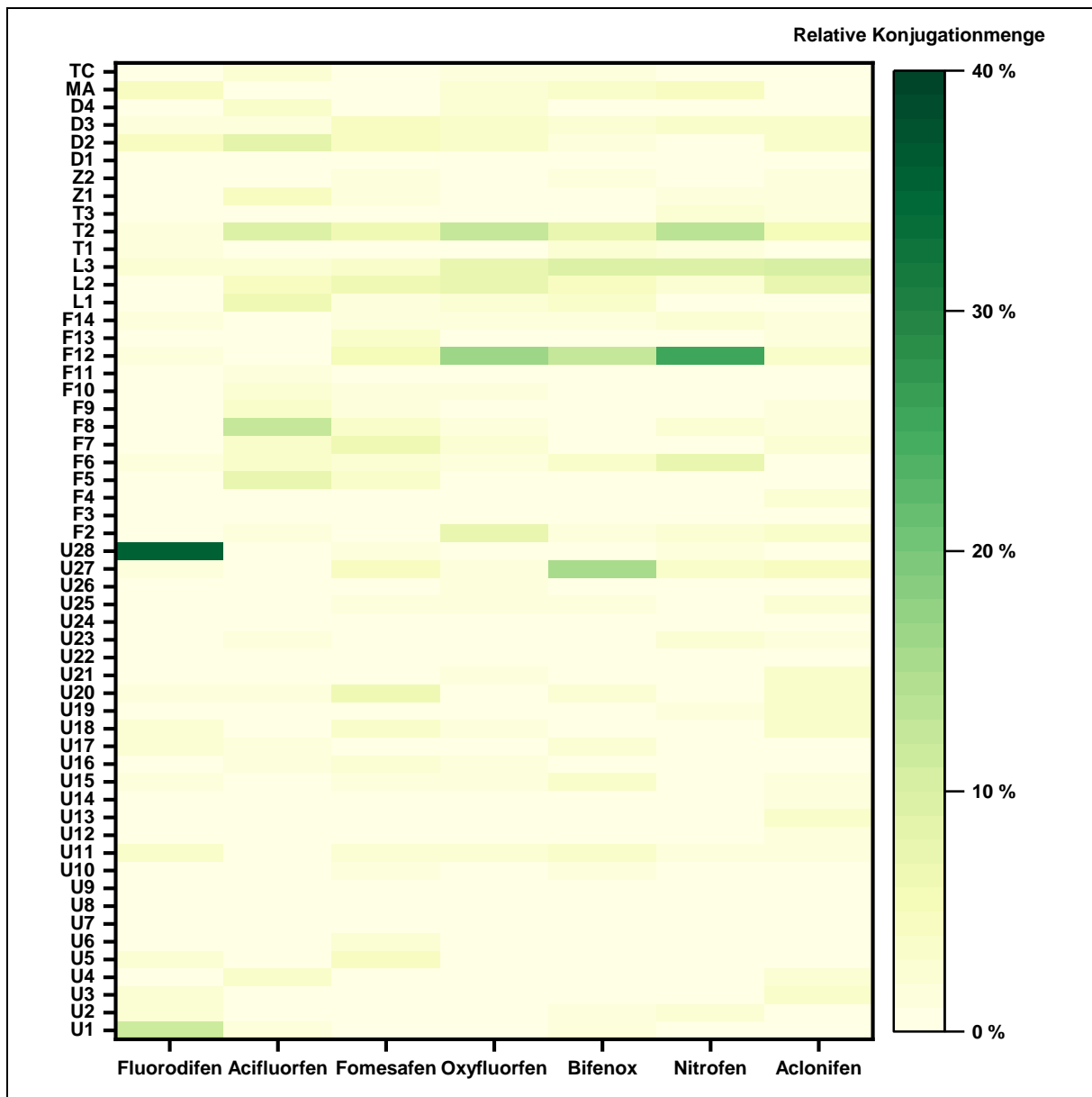
Die dreidimensionale Struktur der einzelnen GSTU5-Varianten wurden mittels Phyre2 simuliert (Kelley et al. 2015) und anschließend das Substrat Atrazin mittels der Software Vina AutoDock in die H-Site gebunden (Trott und Olson 2010). Die in Abbildung 4-2 gezeigte Struktur der AtGSTU5 Col-0 ist in (A) mit dem Atrazin-Molekül gezeigt (schwarz: Kohlenstoff; blau: Stickstoff; grün: Chlor). Dargestellt ist das Atrazin-Molekül in der H-Site der Proteinstruktur der Q82H-Variante in (B), der A96T-Variante in (C), der V130E-Variante in (D), und der R192K-Variante in (E). Die Struktur der hGSTU5 mit dem Atrazin-Molekül ist in (F) dargestellt. Das Atrazin-Molekül ist als Kugel-Stab-Modell dargestellt und durch einen Pfeil jeweils hervorgehoben. Die nsSNP-Varianten und die hGSTU5 wurden anhand der Kristallstruktur 6GHF simuliert (Papageorgiou et al. 2018). Von der Q82H-Variante wurden 96 % der Aminosäuresequenz und von den anderen Varianten 93 % der Aminosäuresequenz jeweils mit einer Genauigkeit von 100 % an die Kristallstruktur simuliert. Die relevanten Aminosäuren wurden zu 100 % genau simuliert.

Die Simulation zeigt, dass *in silico* der jeweilige Aminosäureaustausch die dreidimensionale Struktur der H-Site und damit auch die Bindung von Atrazin in die H-Site beeinflusst. Dieser Einfluss könnte die Aktivität beeinflussen, da sich das Zentrum des nukleophilen Angriffs der Schwefelgruppe des Glutathion-Moleküls teilweise nicht in optimaler Orientierung zur G-Site befindet. Bei dem Zentrum des nukleophilen Angriffs handelt es sich um das Kohlenstoffatom, an dem das Chloratom gebunden ist. Somit unterstützen diese *in silico* Daten die Ergebnisse dieser Arbeit, da gezeigt werden konnte, dass die unterschiedlichen Varianten Atrazin und die weiteren Triazin-Herbizide unterschiedlich mit Glutathion konjugieren und es höchst wahrscheinlich strukturelle Unterschiede zwischen den Varianten gibt. Für humane GSTs konnte gezeigt werden, dass ein nsSNP der hGSTP1, der zu dem

Aminosäureaustausch I105V führt, zu Änderungen der Struktur der H-Site führen kann (Manevich et al. 2013; Ściskalska und Milnerowicz 2021). Wie bei den in dieser Arbeit untersuchten GST-Varianten betrifft der Aminosäureaustausch keine Aminosäure der H-Site. Er nimmt jedoch Einfluss auf die Substratspezifität des Proteins (Romero et al. 2012; Ściskalska und Milnerowicz 2021).

Neben den Triazinen werden weltweit unterschiedliche Klassen von Herbiziden verwendet. In vorherigen Arbeiten konnte bereits nachgewiesen werden, dass die Herbizide der Diphenylether-Herbizide Klasse durch *AtGSTs* konjugiert werden (Kowalski 2016). Die Konjugation einiger Diphenylether-Herbizide konnte nicht nur für *A. thaliana* sondern auch für Nutzpflanzen *in planta* nachgewiesen werden (Frear et al. 1983; Pascal et al. 2000; Dixon et al. 2003). Diphenylether-Verbindungen werden in Pilzen, die teilweise mit Pflanzen assoziiert sind (Hargreaves et al. 2002; Ohashi et al. 1992; Dayan et al. 2000; Dayan et al. 2008), sowie maritimen Organismen, darunter Cyanobakterien und Rotalgen (Unson et al. 1994; Malmvärn et al. 2005; Malmvärn et al. 2008), synthetisiert. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Vergleich der GST-spezifischen Konjugation der Diphenylether-Herbiziden und den natürlichen Diphenylethern durchgeführt, um mögliche evolutionäre Triebkräfte für die pflanzlichen GSTs aufdecken zu können.

Bei der Konjugationsanalyse für die Diphenylether-Herbizide ergab sich, dass die *AtGSTU28* die aktivste Form bei der Konjugation von Fluorodifen mit Glutathion ist, während sie gegenüber den anderen sechs getesteten Diphenylether-Herbiziden kaum Aktivität zeigt (Abbildung 4-4). Ähnlich verhält es sich beispielsweise auch für die *ZmGSTU1* und *ZmGSTU2*. Beide *ZmGSTs* weisen einen hohen Umsatz für Fluorodifen auf, während beide *ZmGSTs* für Acifluorfen und Fomesafen kaum Aktivität zeigen (Dixon et al. 2003). Dies legt nahe, dass die Substitutionen der Diphenylether-Herbizide Ausschlag gebend sind, welche GST die Diphenylether-Herbizide detoxifizieren. Betrachtet man die relative Konjugatbildung der einzelnen Herbizide für die *AtGSTs*, so zeigt die Konjugation von Fluorodifen durch die *AtGSTU28* mit ca. 35 % der Gesamtaktivität der Arabidopsis GSTs den höchsten Anteil (Abbildung 4-4).



**Abbildung 4-4: Selektive Konjugation von Diphenylether-Herbizide durch Arabidopsis GSTs**

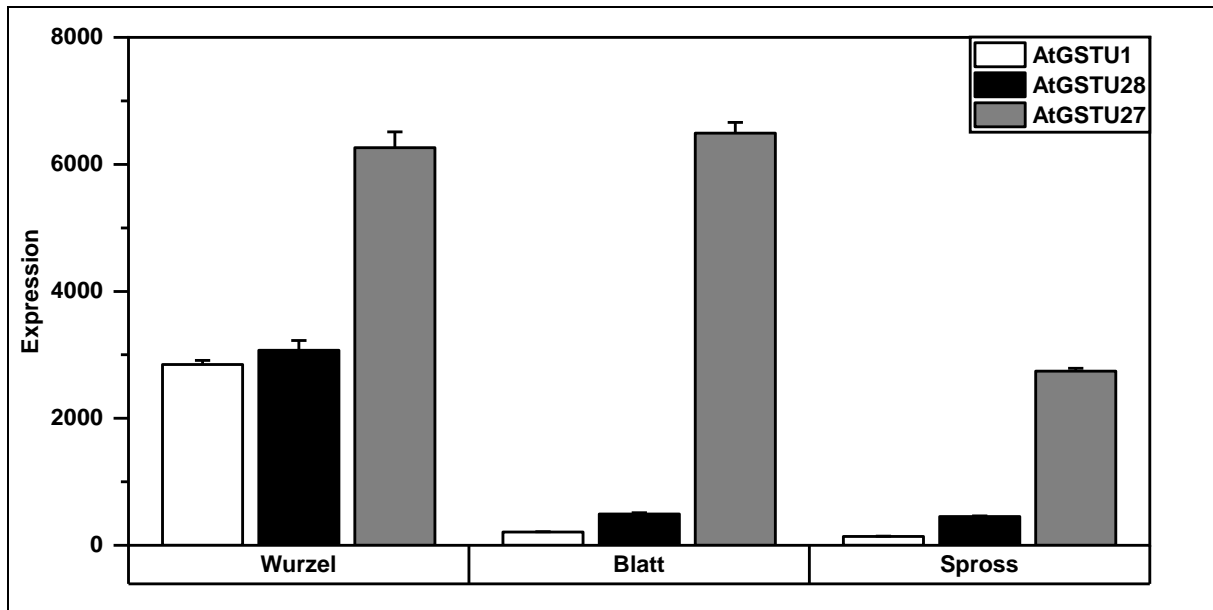
Dargestellt ist die relative Konjugatmenge der getesteten Diphenylether-Herbizide jeder AtGSTs bezogen auf die gesamte Konjugatmenge aller AtGSTs für das jeweilige Diphenylether-Herbizid. Die absolute Konjugatmengen sind in Abbildung 3-15, Abbildung 3-16, Abbildung 3-17, Abbildung 3-18, Abbildung 3-19, Abbildung 3-20 und Abbildung 3-21 gezeigt. In vorherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Expression der GSTs in Hefe vergleichbar ist (Krajewski et al. 2013; Kowalski 2016).

Durch die Identifizierung von aktiven AtGSTs, die einzelne Herbizide oder eine Herbizid-Klasse mit Glutathion konjugieren, können Kandidaten für Knock-Out- und Überexpressionslinien bestimmt werden. Für solche Linien können Phänotypen der mit Herbiziden oder strukturell ähnlichen Verbindungen exponierten Pflanzen beobachtet werden. Beispielsweise zeigten die AtGSTU28-Überexpressionslinien eine erhöhte Resistenz gegenüber Fluorodifen (Abbildung 3-26). Auch die Überexpression der ZmGSTU1 oder der ZmGSTU2 bzw. von mutierten Varianten führt zu einer Resistenz von *Arabidopsis thaliana* gegenüber Fluorodifen (Dixon et al. 2003). Jedoch zeigte die atgstu28-Knock-Out-Linien keinen Phänotyp unter der Belastung mit Fluorodifen (Abbildung 3-23). Da

einzelne AtGSTs strukturelle Homologien aufweisen, können solche AtGSTs die Funktion von deletierten Genen zumindest teilweise übernehmen (Krajewski et al. 2013). Die AtGSTU1 bis AtGSTU7 zeigen zusammen ca. 20 % Fluorodifen Konjugation im Vergleich zur gesamt Aktivität aller AtGSTs. Diese funktionelle Redundanz kann durch Feedback-Mechanismen, die zur höheren Expression führen, den Knock-Out kompensieren. Zusätzlich zu dieser funktionellen Redundanz kommt hinzu, dass es neben der Detoxifizierung durch die GSTs weitere Entgiftungsprozesse gibt, die GST-Knock-Outs ausgleichen können. Darunter beispielsweise die Phase II Enzyme UDP-Glycosyltransferase, die Xenobiotika wie beispielsweise das Mycotoxin Deoxynivalenol glykosyliert (Messner et al. 2003; Poppenberger et al. 2003), und unterschiedliche Acetyltransferasen (Taguchi et al. 2010), die beispielsweise Phenolglykosiden malonylieren.

Auch die gewebespezifische Expression der AtGSTs muss eine entscheidende Rolle bei der Phänotypisierung der Knock-Out-Linien gegenüber der Wirkung der Herbizide spielen. So wird beispielsweise die AtGSTU28 vor allem in der Wurzel exprimiert (Abbildung 4-5). Auch andere AtGSTs werden primär in der Wurzel exprimiert wie die AtGSTU1, die ebenfalls Fluorodifen mit Glutathion konjugierte. Somit können in dem Gewebe, das das Herbizid aufnimmt, unterschiedliche Detoxifizierungskapazitäten vorhanden sein. Als Vorläuferherbizide werden die Diphenylether-Herbizide vor allem von der Wurzel des frischen Keimlings aufgenommen. Dies kann dazu führen, dass das Herbizid bereits teilweise abgebaut wird, noch bevor die eigentliche Target-Site erreicht wurde. Die AtGSTU27, die zumindest für einige Diphenylether-Herbizide wie Bifenox und Aclonifen eine Konjugationsreaktion katalysiert, ist sowohl in der Wurzel als auch in Blättern verstärkt exprimiert. Somit können unterschiedliche Wirkungen der einzelnen Diphenylether-Herbizide erklärt werden, da diese eine hohe AtGST-Spezifität zeigen. Sowohl die AtGSTU28 als auch die AtGSTU27 werden durch Herbizid-Safeners reprimiert (Abbildung 1-8).

Die GSTs der Tau- und Phi-Klasse sind als Dimere aktiv (Dixon et al. 2002). Sie können sowohl homodimer als auch heterodimer vorliegen, wobei nur GSTs der gleichen Klasse mit einander dimerisieren (Dixon et al. 2002). Über die Funktionalität und Substratspezifität der Heterodimere ist bisher wenig bekannt. Jedoch ist klar, dass bei der Dimerisierung nur eine Einheit die katalytische Funktion übernimmt (Dixon et al. 2002). Daher ist es möglich, dass bei der Heterodimerisierung die zweite GST-Einheit die Aktivität der andern GST gegenüber einem Substrat modulieren kann. Hypothetisch könnte eine co-exprimierte GSTU die Substratspezifität der GSTU27 so modulieren, dass diese neben der in Hefe nachgewiesenen Konjugation von Bifenox, Fomesafen, Nitrofen und Aclonifen auch in der Lage ist, Fluorodifen mit Glutathion zu konjugieren (Dixon et al. 2002).



**Abbildung 4-5: Expression der AtGSTU28 im Vergleich zur AtGSTU1 und AtGSTU27**

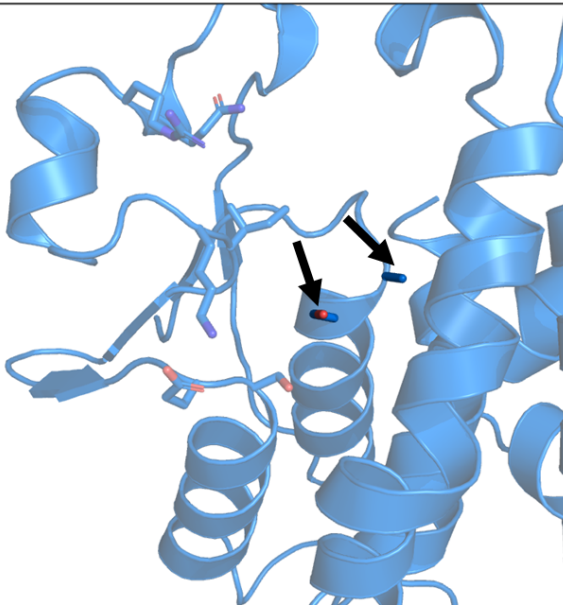
Die Expression der AtGST variiert je nach Gewebe. Dargestellt ist exemplarisch die Expression der AtGSTU1, AtGSTU28 und AtGSTU27 in der Wurzel, dem Blatt oder dem Spross. Die Daten wurden von der Datenbank GENEVESTIGATOR® bezogen. Die Daten wurden mit Arabidopsis ATH1 Genome Arrays generiert und normalisiert.

Nicht nur die AtGSTUs sind in der Konjugation von Xenobiotika beteiligt, sondern auch die AtGSTFs spielen eine entscheidende Rolle (Krajewski et al. 2013). Neben den AtGSTU27 und der AtGSTU28 zeigte die AtGSTF12 für einige Diphenylether-Herbizide eine im Vergleich zu den restlichen AtGSTs erhöhte Konjugation. Prozentual machte die Konjugation der Herbizide durch AtGSTF12 für Fomesafen  $5,7 \pm 1,8 \%$ , für Oxyfluorfen  $16,3 \pm 6,0 \%$ , Bifenox  $13,0 \pm 5,1 \%$  und für Nitrofen  $25,3 \pm 4,5 \%$  der jeweiligen Konjugatmenge aus. Die AtGSTF12 besitzt weder ein katalytisch aktives Serin noch ein aktives Cystein oder Tyrosin in der G-Site (Abbildung 4-6, A). Für GSTs, die in der G-Site keine dieser drei katalytisch aktiven Aminosäuren tragen, ist beschrieben, dass diese keine Glutathion-Transferase-Aktivität aufweisen, da es nicht zu einer Stabilisierung des Glutathion-Thiolat-Anions kommt (Dixon und Edwards 2010b). Jedoch konnte bereits in vorherigen Arbeiten gezeigt werden, dass beispielsweise einige Chloroacetanilide durch die AtGSTF12 mit Glutathion konjugiert werden (Kowalski 2016) und auch die Konjugation von Anilazin durch die AtGSTF11 konnte gezeigt werden (Krajewski et al. 2013). Die Stabilisierung des Glutathion-Thiolat-Anions ist für diese beiden AtGSTs noch nicht weiter untersucht. In der simulierten, dreidimensionalen Struktur der AtGSTF11 und AtGSTF12 (Abbildung 4-6, C und D) zeigt sich im Vergleich zu den Strukturen der AtGSTF10 und AtGSTF13 (Abbildung 4-6, A und E), dass die G-Site alle vier AtGSTFs dreidimensional ähnlich ist.

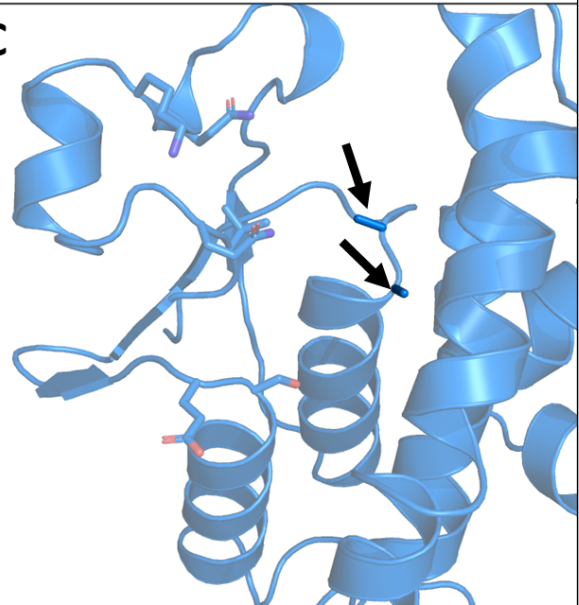
**A**

AtGSTF2 FGHPA-SIATRRLVLIALHEKNLDFELVHVE-LKDGEHKKEP-FLS-R-NPFGQVPAFEDGDLKLFESRAITQYIAHR  
 AtGSTF3 FGHPA-STSTRRLVLIALHEKNLDFELVHVE-LKDGEHKKEP-FLS-R-NPFGQVPAFEDGDLKLFESRAITQYIAHR  
 AtGSTF4 HGDPF-STNTRRVLAVLHEKRLSYEPITVK-LQTGEHKTEP-FLS-L-NPFGQVPVFEDGSVKLYESRAITQYIAYV  
 AtGSTF5 YGYPY-STNTRRVLAVLHEKGLSYDPI TVN-LIAGDQK-KPSFLA-I-NPFGQVPVFLDGLKLTESRAISEYIATV  
 AtGSTF6 FGHPA-STATRRLVLIALHEKNVDFEFVHVE-LKDGEHKKEP-FIL-R-NPFGKVPAFEDGDFKLFESRAITQYIAHE  
 AtGSTF7 FGHPA-STATRRLVLIALHEKNLDFEFVHIE-LKDGEHKKEP-FIF-R-NPFGKVPAFEDGDFKLFESRAITQYIAH-  
 AtGSTF8 HGVPM-STATMRVLATLYEKDLQFELI PVD-MRAGA HQEA-HLA-L-NPFGQI PALEDGDLTLFESRAITQYLAEE  
 AtGSTF9 YG-PHFAS-PKRALVTLIEKGVAFETI PVD-LMKGEHK-QPAYLA-L-QPFGTVPAVVGDYKIFESRAVMRYVAEK  
 AtGSTF10 YA-PLFAS-SKRAVVTLVEKGVSFETVNVD-LMKGEQR-QPEYLA-I-QPFGKI PVLVDGDYKIFESRAIMRYIAEK  
 AtGSTF11 YGQIK-AANPQRVLLCFLEKDI EF EVIHVD-LDKLEQK-KPQHL--LRQPFQVPAIEDGYLKLFE SRAIARYATK  
 AtGSTF12 YGQVT-AACPQRVLLCFLEKGI EF EIIHID-LDTFEQK-KPEHL--LRQPFQVPAIEDGDFKLFESRAIARYATK  
 AtGSTF13 YGDEM-SACVARVLLCLHEKNTEFELVPVN-LFACHHK-LPSFLS-M-NPFGKVPALQDDDLTLFESRAITAYIAEK  
 AtGSTF14 WGN---SAA---LFCINEKGLDFELVFVDWL-AGEAKTKT-FLSTL-NPFGQVPLEDGD LKLFEPKAITRYLAEQ

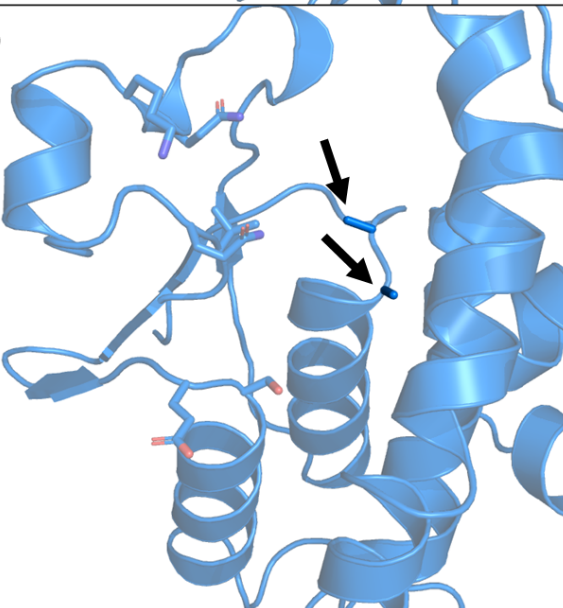
**B**



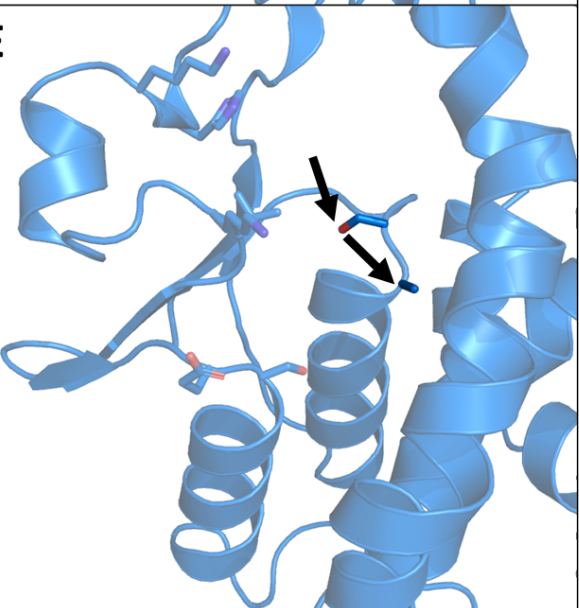
**C**



**D**



**E**

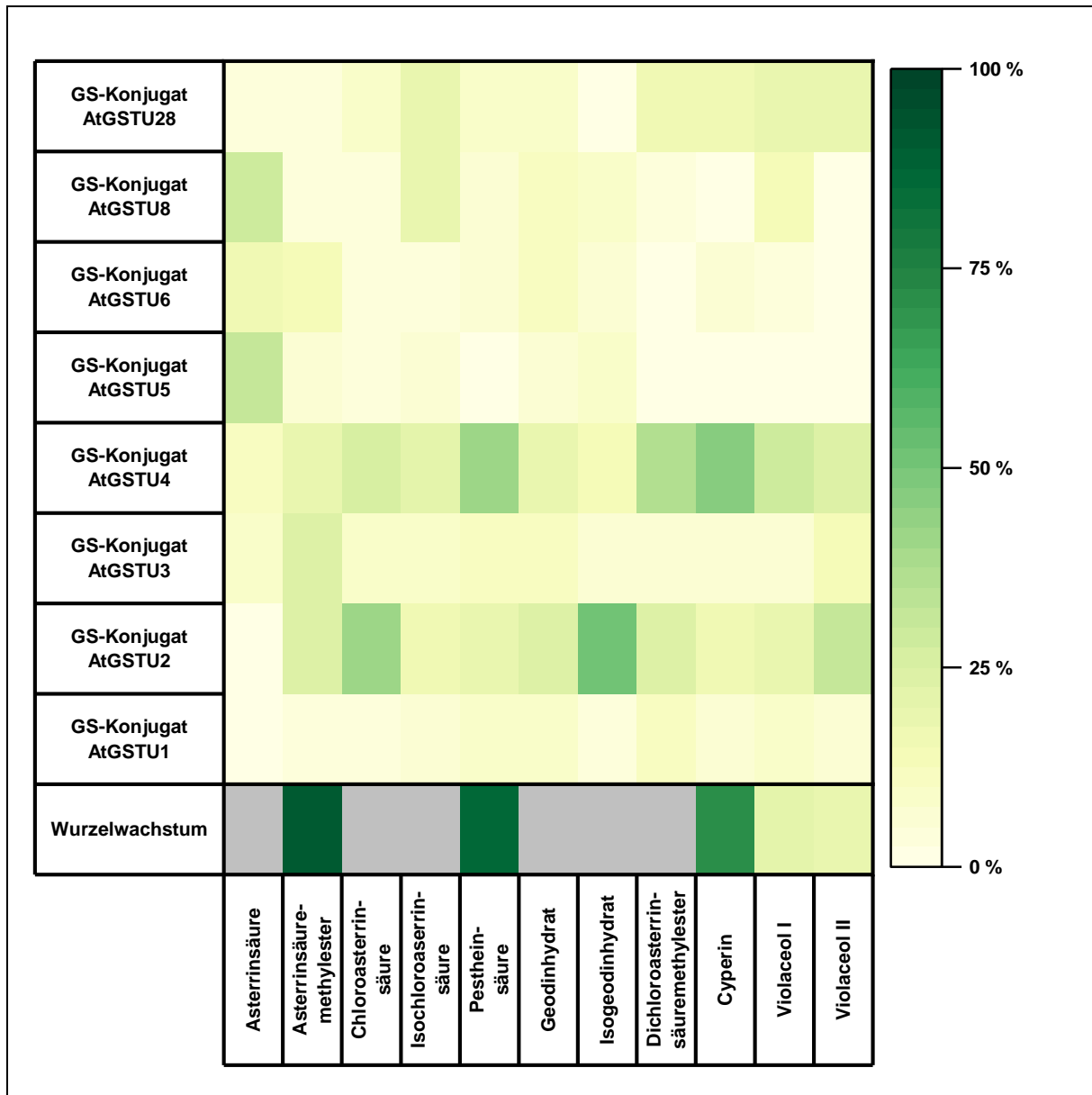


**Abbildung 4-6: Sequenzvergleich G-Site der AtGSTFs**

Vergleich der Aminosäure-Sequenz im Bereich der G-Site aller AtGSTFs (A). In orange sind die Aminosäuren, die die G-Site ausbilden hervorgehoben. Das katalytisch Aktive Serin ist in grün hervorgehoben. Die AtGSTF11 und AtGSTF12 besitzen kein katalytisch aktives Serin. Die AtGSTF12 konjugiert die Diphenylether-Herbizide Oxyfluorfen (Abbildung 3-18), Bifenox (Abbildung 3-19) und Nitrofen (Abbildung 3-20) mit Glutathion. Möglicherweise sind in der AtGSTF11 und AtGSTF12 weitere Aminosäuren an der G-Site beteiligt und können zur Bildung des Thiolatanion beitragen. Diese Aminosäuren könnten das Lysin und Asparagin in der AtGSTF11 und das Threonin und Cystein in der AtGSTF12 sein. In (A) sind diese Aminosäuren in blau dargestellt. Die dreidimensionale Strukturen der AtGSTF10 (B), AtGSTF11 (C), AtGSTF12 (D) und AtGSTF13 (E) Varianten wurden mittels Phyre2 simuliert (Kelley et al. 2015). Von der Aminosäuresequenzen wurden für die AtGSTF10 98 % mit einer Genauigkeit von 100 % an die Kristallstruktur 6F01 (Tossounian et al. 2018), für die AtGSTF11 und AtGSTF12 99 % mit einer Genauigkeit von 100 % an die Kristallstruktur 5F07 (Didierjean et al. 2016b) und für die AtGSTF13 99 % mit einer Genauigkeit von 100 % an die Kristallstruktur 5F06 (Didierjean et al. 2016a) simuliert. Die Pfeile weisen auf die zwei Aminosäuren des katalytischen Zentrums. Alle Aminosäuren der G-Site sind als Sticks dargestellt.

Abgesehen von anthropogenen Substanzen sind Pflanzen mit natürlichen Phytotoxinen und anderen Verbindungen konfrontiert (Sugawara et al. 1987; Venkatasubbaiah et al. 1992; Dayan et al. 2008). Solche Naturverbindungen können in ihrer Grundstruktur Ähnlichkeiten zu den anthropogenen Verbindungen aufweisen. Beispielsweise kommen natürliche Diphenylether vor, die mitunter halogeniert vorliegen (Xu et al. 2014; Hargreaves et al. 2002). Diese strukturellen Ähnlichkeiten bergen die Möglichkeit neuer Wirkstoffgruppen für Herbizide (Dayan et al. 2008; Asami et al. 2012). Zudem können mit Ihnen evolutionäre Anpassungen erklärt werden (Dayan und Duke 2014).

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, das Violaceol I und Violaceol II das Wurzelwachstum von Pflanzen inhibieren können (Abbildung 4-7). Für beide Verbindungen sind bisher keine physiologischen Wirkungen auf Pflanzen bekannt. Jedoch zeigten beide antimikrobielle Wirkungen (6 Anhang, Tabelle 6-15, Asami et al. 2012; Li et al. 2015; Nuankeaw et al. 2020). Die inhibierende Wirkung von Cyperin ist bereits bekannt und konnte in dieser Arbeit bestätigt werden (Abbildung 4-7). Bis dato gibt es jedoch zu keinem natürlichen Diphenylether Befunde, wie diese entgiftet werden. In dieser Arbeit konnte erstmals die Konjugation von natürlichen Diphenylether durch AtGSTs nachgewiesen werden (Abbildung 3-28 bis Abbildung 3-36, Abbildung 3-38 bis Abbildung 3-40 und Abbildung 4-7). Für Cyperin und Violaceol I zeigte die AtGSTU4 von den getesteten Enzymen die höchste Aktivität, während die AtGSTU2 für Violaceol II die höchste Aktivität zeigte. Die weiteren in dieser Arbeit analysierten Verbindungen wurden ebenfalls durch AtGSTs konjugiert. Die AtGSTU2 war ebenfalls die aktivste AtGST bei der Konjugation der Chloroasterrinsäure und des Isogeodihydrates, während die AtGSTU4 die aktivste für die Pestheinsäure war (Abbildung 4-7).



**Abbildung 4-7: Glutathion-Konjugation und physiologische Wirkung der natürlichen Diphenylether**

Gezeigt wird die relative Konjugatmenge der einzelnen natürlichen Diphenylether durch die getesteten AtGSTs normiert auf die Summe der Konjugatmenge aller getesteten AtGSTs, sowie das relative Wachstum im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle für 100 $\mu$ M der getesteten natürlichen Diphenylether nach sieben Tagen (Grau = nicht getestet). Die absoluten Konjugatmengen sind in Abbildung 3-28, Abbildung 3-29, Abbildung 3-30, Abbildung 3-31, Abbildung 3-32, Abbildung 3-33, Abbildung 3-34, Abbildung 3-35, Abbildung 3-36, Abbildung 3-38, Abbildung 3-39 und Abbildung 3-40 gezeigt. Das Wurzelwachstum ist in Abbildung 3-41 und Abbildung 3-42 dargestellt.

Die natürlichen Diphenylether werden von Mikroorganismen synthetisiert (Venkatasubbaiah et al. 1992; Jayasuriya et al. 1995; Hargreaves et al. 2002; Malmvärn et al. 2005). Bei den halogenierten Diphenylethern kann zwischen den bromierten und den chlorierten natürlichen Diphenylethern unterschieden werden. Bromierte Verbindungen finden sich ausschließlich in aquatischen Mikroorganismen wie Rotalgen und Cyanobakterien (Utkina et al. 2001; Malmvärn et al. 2005; Malmvärn et al. 2008) während chlorierte Diphenylether in terrestrischen oder Mangroven-



assoziierten Pilzen zu finden sind (Ogawa et al. 1995; Hargreaves et al. 2002; Klaiklay et al. 2012; Zhang et al. 2016; Qin et al. 2019). In dieser Arbeit sind nur Verbindungen untersucht worden, die durch terrestrische Pilze oder durch Mangroven-assoziierte aquatische Pilze gebildet werden. Die Bioaktivität einiger dieser Verbindungen ist gegenüber Mikroorganismen, Human- und Tierzelllinien und in einigen wenigen Fällen gegenüber Pflanzen beschrieben (6 Anhang; Tabelle 6-15). Das Diphenylether-Grundgerüst ist die am zweithäufigsten verwendete Grundstruktur sowohl für Pharmazeutika als auch Agrochemikalien (Chen et al. 2020). Die natürlichen Diphenylether weisen ein breiteres Wirkungsspektrum auf, als die Diphenylether-Herbizide. So sind phytotoxische Wirkungen für Barcoloneinsäure und Cyperin bekannt, die beispielsweise Nekrosen induzieren oder das Wurzelwachstum inhibieren (Overy et al. 2005).

Im Detail sind für die in dieser Arbeit verwendeten natürlichen Diphenylether folgende phytophysiologische Wirkungen bekannt. Asterrinsäure inhibiert vollständig die Keimung von Kressesamen bei einer Konzentration von 100 µg/ml (Hargreaves et al. 2002). Die chlorierten Asterrinsäure-Derivate Chloroasterrinsäuremethylester und Dichloroasterrinsäuremethylester zeigen sich noch aktiver und inhibierten die Keimung von Kressesamen vollständig ab einer Konzentration von 10 µg/ml (Hargreaves et al. 2002). Zudem wirkt der Dichloroasterrinsäuremethylester sowie das Isomer des Chloroasterrinsäuremethylester, Penicilither, antimikrobiell auf Phytopathogene (6 Anhang, Tabelle 6-15, Qin et al. 2019). Das Wurzelwachstum von Salat- und Reiskeimlingen wurde durch die Behandlung mit der monochlorierten Pestheinsäure um das 60 % bzw. 30 % gesteigert (Shimada et al. 2001). Im Gegensatz zu den veröffentlichten Daten konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Pestheinsäure das Wurzelwachstum von *A. thaliana* Keimlingen bei einer Konzentration von 100 µM um 13 % inhibiert. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz könnte die unterschiedlichen Pflanzenspezies darstellen. Entweder wird die Pestheinsäure in den einzelnen Pflanzenspezies unterschiedlich verstoffwechselt (Dixon et al. 2003) oder die molekularen Targets weisen Unterschiede auf, die zu Resistenzen führen (Powles und Yu 2010).

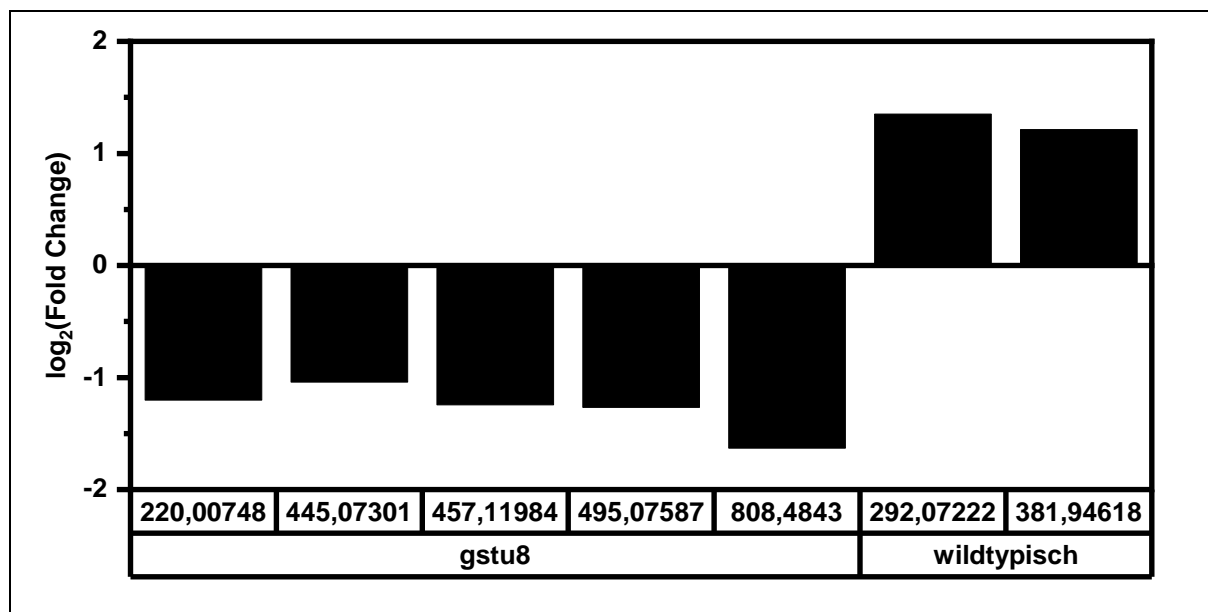
Cyperin wurde aus unterschiedlichen Phytopathogenen isoliert (Venkatasubbaiah et al. 1992; Dayan et al. 2008). Es hat eine hemmende Wirkung auf das Wurzelwachstum von *A. thaliana* Keimlinge mit einem IC<sub>50</sub> von ca. 40 µM (Dayan et al. 2008). Auf molekularer Ebene inhibiert Cyperin die Enoyl-Reduktase von *A. thaliana* mit einem IC<sub>50</sub> von ca. 90 µM (Dayan et al. 2008). Auch das Wurzelwachstum von Hirse wird durch Cyperin gehemmt (Venkatasubbaiah et al. 1992). Zudem führte die Applikation von Cyperin auf die Blätter unterschiedlicher Pflanzenspezies zu Nekrosen (6 Anhang, Tabelle 6-15; Venkatasubbaiah et al. 1992). In dieser Arbeit war der Effekt von Cyperin auf das Wurzelwachstum von *A. thaliana* Keimlingen geringer, wobei der Belastungszeitraum mit sieben statt zwölf Tagen kürzer als in bisherigen Arbeiten war (Dayan et al. 2008).

Da es sich bei den natürlichen Diphenylethern um Verbindungen handelt, die von Phytopathogenen (Venkatasubbaiah et al. 1992; Shimada et al. 2001; Guo et al. 2020a) aber auch von Endophyten (Ebrahim et al. 2016; Ebada et al. 2018; Qin et al. 2019) produziert werden, müssen Pflanzen, die mit entsprechenden Pilzen in Kontakt kommen, auch mit deren toxischen Cocktail umgehen können. Eine Entgiftung der natürlichen Diphenylether durch die Pflanzen sollte deshalb unter evolutionärer Selektion stehen. Die Daten dieser Arbeit weisen darauf hin, dass eine solche evolutionäre Beziehung erklären kann, weshalb auch anthropogene Diphenylether-Herbizide durch pflanzliche GSTs entgiftet werden können. Bisher sind, soweit bekannt, keine Daten veröffentlicht worden, die die Entgiftung der natürlichen Diphenylether durch pflanzliche Enzyme untersucht haben.

## 4.2 Endogene Substrate der GSTs

Neben der Entgiftung von Xenobiotika sind GSTs auch in endogenen Prozessen involviert. Die Identifizierung solcher endogenen GST-Substraten war wie die Identifizierung exogener GST-Substrate Teil dieser Arbeit. Als Entgiftungsenzyme sind sie in der Lage toxische Metabolite abzufangen und mittels Glutathion zu konjugieren (Marrs et al. 1995; Marrs 1996). Zudem transferieren GSTs Glutathion während einiger Biosynthese-Prozesse Metabolite um Schwefel zu inkorporieren (Chen et al. 2017; Piślewska-Bednarek et al. 2018; Czerniawski und Bednarek 2018). Vor allem für schwefelhaltige Indol-Glucosinolate und Indol-Phytoalexine ist bekannt, dass GSTs während der Biosynthese involviert sind (Piślewska-Bednarek et al. 2018; Czerniawski und Bednarek 2018; Mucha et al. 2019). Auf Grund der Redundanz ist bisher nicht vollständig aufgeklärt, welche GSTs beteiligt sind. Mögliche Kandidaten hierfür sind die GSTU4, GSTF6, GSTF9 und GSTF10 (Piślewska-Bednarek et al. 2018; Czerniawski und Bednarek 2018; Mucha et al. 2019).

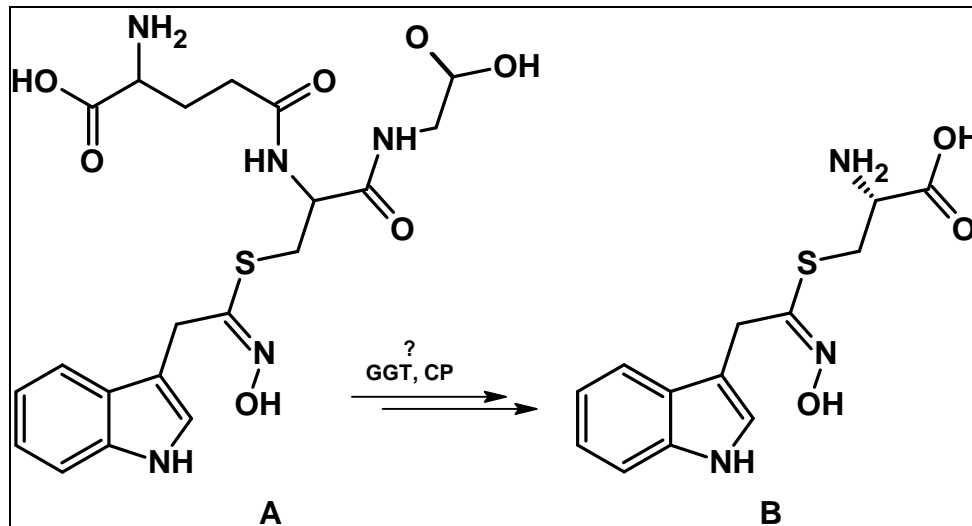
Die in dieser Arbeit erzeugten Pflanzen-Linien mit unterschiedlichen Gen-Cluster-Deletionen zeigten in der massenspektrometrischen Metabolit-Analyse eine Signalreduktion für mehrere Massenpeaks und eine Signalerhöhung für zwei Massenpeaks (Abbildung 4-8). Der Abgleich mit massenspektrometrischen Datenbanken deutet unter anderem auf unterschiedliche Flavonoid-Glykoside (3.8.2.4 Weiterentwicklung des Cas9-Systems – gstu8 CRISPR u1-u5) und auch auf eine mögliche, bisher nicht verifizierte Verbindung aus der Indolglucosinolat-Biosynthese hin. Mögliche Kandidaten für die einzelnen Massen, die entweder abgereichert oder angereicht waren, sind in Tabelle 6-12, Tabelle 6-13 und Tabelle 6-14 zusammengefasst (6 Anhang).



**Abbildung 4-8: Detektierte Massen der CRISPR-Linien**

Die massenspektroskopische Analyse der Metabolite der CRISPR-Linien zeigten Ab- und Anreicherungen einiger endogener Verbindungen. Zusammengefasst dargestellt sind die veränderten Gehalte der spezifischen Massen für die CRISPR-Linien im Vergleich zu ihrem genetischen Background *gstu8* und einer wildtypischen Linie. Die gezeigten Massen haben einen  $p$ -Value  $< 0,01$ . Der Volcano Plot ist in Abbildung 3-68 dargestellt.

Im Vergleich der CRISPR-Linie und der wildtypischen Linie konnte S-Indolylmethylthiohydroxymoyl)-L-Cystein als schwefelhaltige Verbindung (Abbildung 4-9, B; 6 Anhang, Tabelle 6-13) detektiert werden. Diese Verbindung ist bekanntermaßen bisher noch nicht weiter beschrieben. Es gibt jedoch strukturelle Ähnlichkeiten zu Verbindungen der Indolglucosinolat-Biosynthese (Gläser et al. 2014; Czerniawski und Bednarek 2018) und ein theoretisches Modell, in dem diese Verbindung postuliert wird (Geu-Flores et al. 2011). Beschrieben ist, dass durch Glutathion Transferasen an 1-aci-Nitro-2-Indolyethan Glutathion konjugiert wird (Czerniawski und Bednarek 2018). So entsteht S-(Indolylmethylthiohydroxymoyl)-Glutathion, das durch weitere, bisher nicht bekannte, biochemische Schritte zu Indolglucosinolate katalysiert wird (Geu-Flores et al. 2011; Czerniawski und Bednarek 2018). Sicher ist, dass von Glutathion-Konjugaten der Glutamylrest durch  $\gamma$ -Glutamyl-Transpeptidasen und das Glycin durch Carboxypeptidasen abgespalten wird (Grzam et al. 2006; Grzam et al. 2007; Ohkama-Ohtsu et al. 2007a; Ohkama-Ohtsu et al. 2007b). Eine solche Abspaltung wird auch für Glutathion-Intermediate bei der Indolglucosinolat-Biosynthese postuliert (Abbildung 4-9; Geu-Flores et al. 2009; Geu-Flores et al. 2011).



**Abbildung 4-9: GSH- und Cys-Konjugat der Indolglucosinolat-Biosynthese**

Während der Indolglucosinolat-Biosynthese wird an 1-aci-Nitro-2-Indolyethan Glutathion konjugiert. Dieses Glutathion-Konjugat (A) wird weiter prozessiert, wobei S-(Indolylmethylthiohydroxymoyl)-L-Cystein (B) entstehen könnte (Geu-Flores et al. 2011).

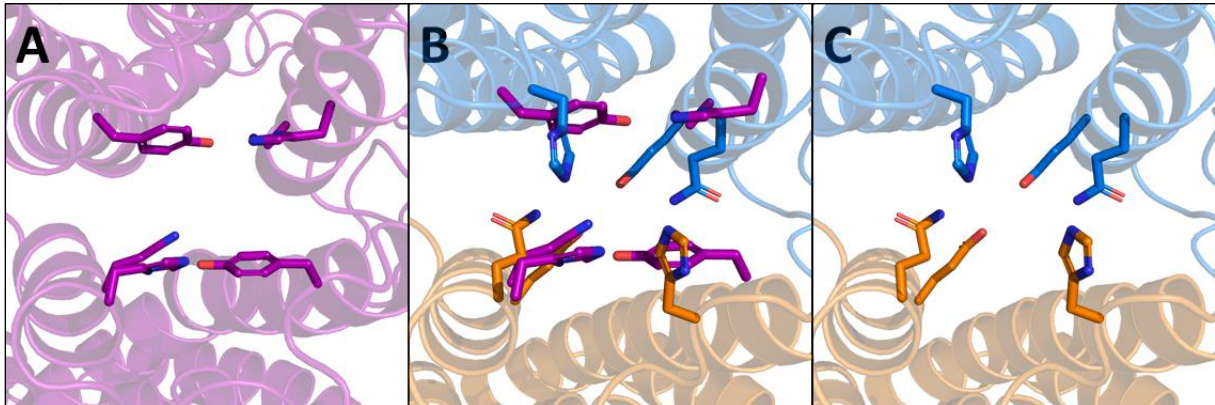
Neben der Anreicherung dieser schwefelhaltigen Verbindung zeigte sich in einer anderen Analyse, dass mehrere Massen abgereichert waren. Für drei der fünf Massen, die bei der *gstu8* CRISPR u1-u5 Linie abgereichert waren (Abbildung 4-8;  $[M+H]^+ = 445,0730086$  und  $[M+H]^+ = 457,1198429$  und  $[M+H]^+ = 495,075865$ ), ergab der Vergleich mit Datenbanken, dass es sich möglicherweise um Flavonoid-Glykoside handeln könnte (6 Anhang, Tabelle 6-12).

Seit einigen Jahren ist auch bekannt, dass GSTs neben den beiden Bindestellen für Glutathion (G-Site) und dem hydrophoben Substrat (H-Site) über weitere Bindestellen verfügen (Ahmad et al. 2017b; Dixon und Edwards 2018). Es wird davon ausgegangen, dass diese Liganden-bindenden Taschen (L-Sites) dem Transport von GST-spezifischen Liganden dienen. Bei diesen Liganden handelt es sich unter anderem um Flavonoide und Flavonoid-Glykoside aber auch Indol-Derivate. Diese konnten mittels *Fishing*-Experimenten (Dixon und Edwards 2018) und Protein-Liganden-Kristallisierung (Ahmad et al. 2017b) *in vitro* nachgewiesen werden. Die Kristallisierung des *AtGSTF2* Dimer mit unterschiedlichen Liganden ergab zwei L1-Sites und eine L2-Site (Ahmad et al. 2017b). Unter anderem wurden als Liganden Quercetin und Quercetrin identifiziert. Während Quercetin nur an die L2-Site bindet, kann Quercetrin sowohl in die L2-Site als auch die beiden L1-Sites binden.

In bisherigen Arbeiten konnte bislang nicht gezeigt werden, dass Flavonoide an die *AtGSTUs* binden. Für die *AtGSTU19* konnte eine Bindung endogener glutathionylierte Substanzen, wie beispielsweise glutathionylierte Oxo-Phytodiensäure und Oxylipin, vergleichbar der *AtGSTF2* nachgewiesen werden, wobei eine Bindung von Flavonoiden an die *AtGSTU19* hypothetisiert wird (Dixon und Edwards 2018). Um die Resultate der massenspektroskopischen Analyse, die in dieser Arbeit durchgeführt wurde, zu

unterstützen, dienen *in silico* Protein-Ligand-Bindungsstudien. Hierfür wurden drei Schritte der Simulation durchgeführt.

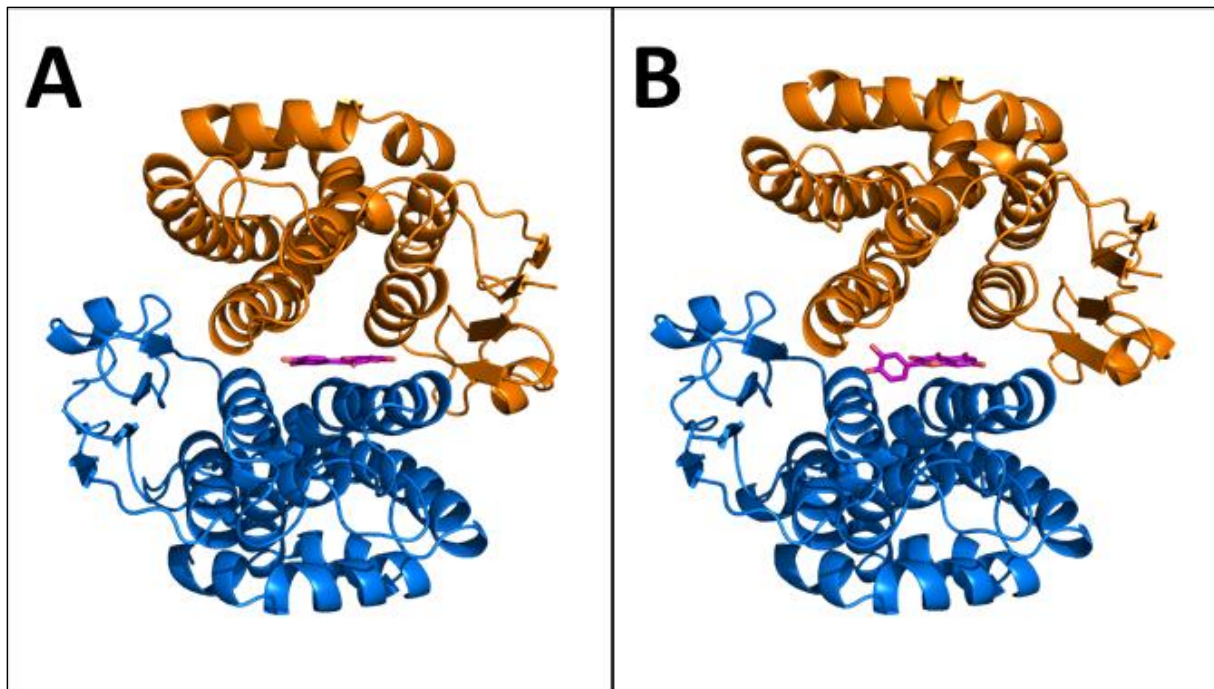
Im ersten Schritt wurde die dreidimensionale Proteinstruktur der deletierten GSTs simuliert und mit der Kristallstruktur der AtGSTF2 verglichen. Für die AtGSTU2 konnte so eine L2-Site postuliert werden, die strukturell der der AtGSTF2 ähnelt (Abbildung 4-10).



**Abbildung 4-10: Strukturvergleich der AtGSTU2 mit der L2-Site der AtGSTF2**

Auf Grundlage der Kristallstruktur der AtGSTF2 (5A4V; Ahmad et al. 2017b) gezeigt in (A) wurden die Aminosäuren der AtGSTU2 identifiziert, die die L2-Site bilden könnten (B und C). In violett ist die AtGSTF2 (A) bzw. deren Aminosäure der L2-Site (B) dargestellt. In blau und orange ist jeweils ein Monomer der AtGSTU2 und die postulierten Aminosäuren der L2-Site dargestellt. Die Proteinstruktur der AtGSTU2 wurde mit der Website Phyre<sup>2</sup> simuliert (Kelley et al. 2015). Es wurden 92 % der Aminosäuresequenz mit einer Genauigkeit von 100 % an die Kristallstruktur 7DWF simuliert (Zhuge und Yang 2021).

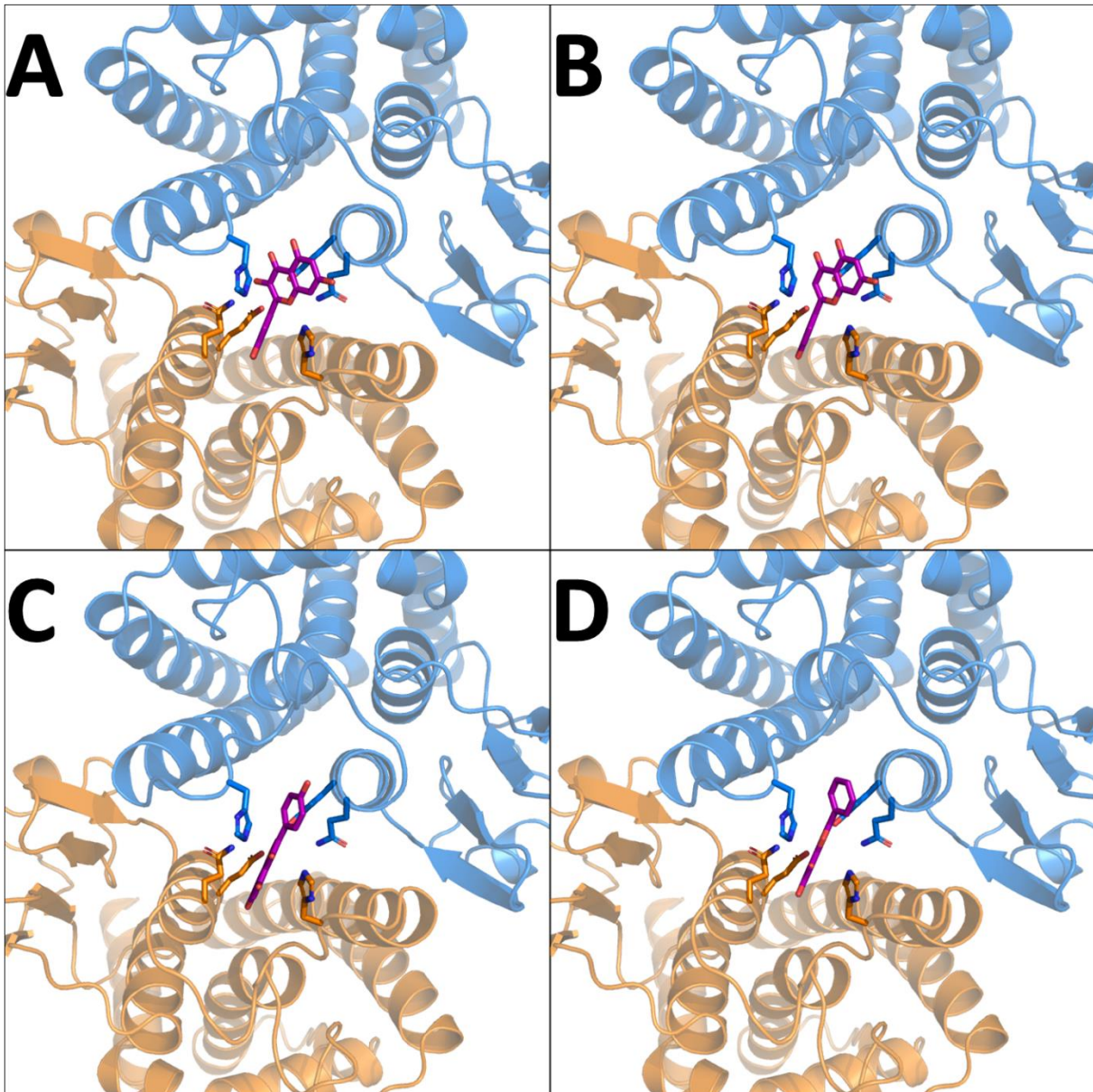
Um zu überprüfen, wie erfolgreich die Simulation der Bindung von Flavonoiden in die L2-Site ist, wurde im zweiten Schritt die Bindung von Quercetin in die L2-Site der AtGSTF2 berechnet. Die Simulation der Bindung kommt, mit einigen Abweichungen, der Kristallstruktur nahe (Abbildung 4-11). Für die theoretische Überlegung, ob AtGSTUs Flavonoide binden können, sind diese Abweichungen akzeptabel und unterstützen das Resultat der massenspektroskopischen Analyse. Die L2-Site befindet sich nicht in der Nähe einer katalytischen Einheit, weshalb es sich um eine Bindung der Flavonoide ohne Konjugation mit Glutathion handelt (Dixon und Edwards 2018).



**Abbildung 4-11: Vergleich der Bindung von Quercetin in die L2-Site der AtGSTF2**

Für die Vergleichbarkeit und Aussagekraft der Bindungssimulationen der Flavonoide in die L2-Sites der AtGSTs wurde im Vergleich zur Kristallstruktur der AtGSTF2 mit gebundenem Quercetin (5A4V; Ahmad et al. 2017b; **A**) diese Bindung simuliert. Hierfür wurde die dreidimensionale Proteinstruktur der AtGSTF2 mit Phyre<sup>2</sup> (Kelley et al. 2015) simuliert und anschließend die Bindung von Quercetin in die L2-Site der AtGSTF2 mittels AutoDoc Vina (Trott und Olson 2010) generiert (**B**). Die mittlere Abweichung der Atome zwischen der Simulation und der Kristallstruktur beträgt 4,8 Å.

Im letzten Schritt wurde die Bindung unterschiedlicher Flavonoide in die postulierte L2-Site der AtGSTU2 simuliert. Da bekannt ist, dass Quercetin von der AtGSTF2 gebunden wird, dient dies als Prototyp. Zudem wurden die Bindung der drei Flavonoide Apigenin, Genistein und Norwogonin simuliert, deren Glykoside Kandidaten der reduzierten Massen darstellen (6 Anhang, Tabelle 6-12). Alle vier Flavonoide konnten in die postulierte L-Site simuliert werden (Abbildung 4-12).



**Abbildung 4-12: Bindung von Flavonoiden in die postulierte L2-Site der AtGSTU2-Homodimer**

In die postulierte L2-Site der AtGSTU2 (Abbildung 4-10) wurde die Bindung von Quercetin (A), Apigenin (B), Genistein (C) und Norwogonin (D) mit Hilfe der Chimera-Software und AutoDoc Vina simuliert (Pettersen et al. 2004; Trott und Olson 2010; Kelley et al. 2015). Die Flavonoide sind in violett dargestellt und die beiden Monomere in blau und orange.

Die Ergebnisse dieser Arbeit und die durchgeführten Simulationen zeigen eine mögliche Bindung von Flavonoiden an die AtGSTUs wie an die AtGSTF2. Diese Bindung wurde bereits für möglich erachtet, konnte jedoch bisher weder bestätigt noch widerlegt werden (Dixon und Edwards 2018). Die in dieser Arbeit generierten Multi-GST-Deletionsmutanten stellen einen ersten Schritt da Gen-Cluster-Analysen von AtGSTs durchzuführen. Die Deletion weiterer GST-Clusters, sowie die partielle Komplementation erlauben in Zukunft weitere Einblicke in die endogene Funktion der AtGSTs.



### 4.3 CRISPR/Cas

Ein Ziel dieser Arbeit war es mittels CRISPR/Cas Multiple GST-Knock-Out Pflanzen zu generieren. Seit ihrer Erstbeschreibung im Jahr 2012 gewinnen die CRISPR/Cas-Systeme im Bereich des *Genome Editing* immer mehr an Bedeutung (Jinek et al. 2012; Lozano-Juste und Cutler 2014; Belhaj et al. 2015; Schindele et al. 2019). Die Systeme haben gegenüber den Zinkfingernukleasen und TALEN den erheblichen Vorteil, dass die zu modifizierende Target-Gene durch kleine RNA-Moleküle erkannt werden (Jinek et al. 2012). Im Fall der Zinkfingernukleasen und TALEN muss jeweils das Protein selbst für jedes Zielgen modifiziert werden (Voytas 2013; Liang et al. 2014). Das in der Natur vorkommende CRISPR/Cas-System ist Teil der Immunantwort von Bakterien (1.5 Genom Editierung mittels CRISPR/Cas; Gasiunas et al. 2012; Jinek et al. 2012). In den vergangenen Jahren wurden immer mehr neue CRISPR/Cas-Systeme in unterschiedlichen Bakterienarten identifiziert. Dies wiederum führte zur Entwicklung von vielen unterschiedlichen im Labor einsetzbaren CRISPR/Cas-Systemen, nicht nur im Gebiet der Pflanzenwissenschaften (Fauser et al. 2012; Steinert et al. 2015; Ordon et al. 2017), sondern in allen Bereichen bei denen biotechnologische Methoden verwendet werden (Kleinstiver et al. 2015a; Kleinstiver et al. 2015b; Kleinstiver et al. 2016a; Kleinstiver et al. 2016b; Lee et al. 2016).

In den Pflanzenwissenschaften werden CRISPR/Cas-Systeme für diverse Anwendungen genutzt. Als molekularbiologische Technik findet es Verwendung in der Grundlagenforschung, um die Funktion von Genen zu untersuchen, und in der Pflanzenbiotechnologie, um Pflanzen mit speziellen Phänotypen zu generieren (Bortesi und Fischer 2015; Malzahn et al. 2017). Solche Phänotypen können zur Erhöhung der Biomasse bzw. des Ertrages führen oder auch zu Resistenzen gegenüber Trockenheit, Pathogenen oder anderen Stressoren (Huang und Puchta 2019). Bei der Grundlagenforschung werden hauptsächlich CRISPR/Cas-Systeme genutzt, um Punktmutationen zu induzieren oder Gene zu deletieren. Der gezielte Gentransfer mittels Knock-Ins ist bei Pflanzen für das CRISPR/Cas-System, wie für alle Genom-Editierungssysteme, Problem behaftet, da das DNA-Reparatursystem der homologen Rekombination in Pflanzen nicht wie bei anderen Eukaryoten dominiert (Huang und Puchta 2019). Daher wird an der homologen Rekombination in Pflanzen intensiv geforscht. Die vielfältige Nutzung der CRISPR/Cas-Systeme in der Pflanzenforschung und der molekularbiologischen Agrarpflanzen-Entwicklung führt zu mannigfaltigen CRISPR/Cas-Systemen die zur Genom-Editierung von Pflanzen genutzt werden (Steinert et al. 2015; Ordon et al. 2017; Wolter et al. 2018).

CRISPR/Cas-Systeme können genutzt werden, um Gen-Cluster zu deletieren. Im Fall der GSTs treten häufig zwei oder mehrere Gene in solchen Clustern auf. Dabei weisen diese Proteine der Gen-Cluster eine hohe Homologie zu einander auf. Solche homologen Proteine haben funktionelle Redundanzen, weshalb ein hohes Interesse besteht, alle Gene eines Clusters auszuknocken. Knock-Out-Linien solcher

geclusterten Gene lassen sich nicht mit einander kreuzen. Daher ist es sinnvoll, diese Gen-Cluster vollständig zu deletieren.

Im Zuge dieser Arbeit wurde ein CRISPR/Cas-System verwendet, das durch seine Vereinheitlichung sowie durch Kombination mehrerer Cas-Gene mit vielen weiteren Expressionselementen eine hohe Flexibilität und Anwendbarkeit ermöglicht. Hierfür wurden sowohl die *SaCas9* aus *Staphylococcus aureus* als auch die *SpCas9* aus *Streptococcus pyogenes* und die entsprechenden tracrRNAs in das *Multi-Kingdom Golden-Gate-System* kloniert (GG-System; Binder et al. 2014; Chiasson et al. 2019). Somit wurde mit Hilfe des GG-Systems ein nutzerfreundliches System geschaffen, das es dem Anwender neben einer einfachen Anwendung auch erlaubt Modifikationen und Erweiterungen mit geringem Aufwand vorzunehmen. Beispielsweise lassen sich mit diesem System, wie in dieser Arbeit gezeigt, Promotoren einfach austauschen oder die Cas9 mit Lokalisierungssignalen versehen. Nach Testung unterschiedlicher Promotor-Varianten und Lokalisierungssignale wurde die *SaCas9* unter dem eizellspezifischen Promotor und sowohl N- als auch C-terminalen Kernlokalisierungssignalen verwendet. Der eizellspezifische Promotor exprimiert die Cas9 in der Eizelle, worauf Mutationen in den Folgegenerationen vererbt werden.

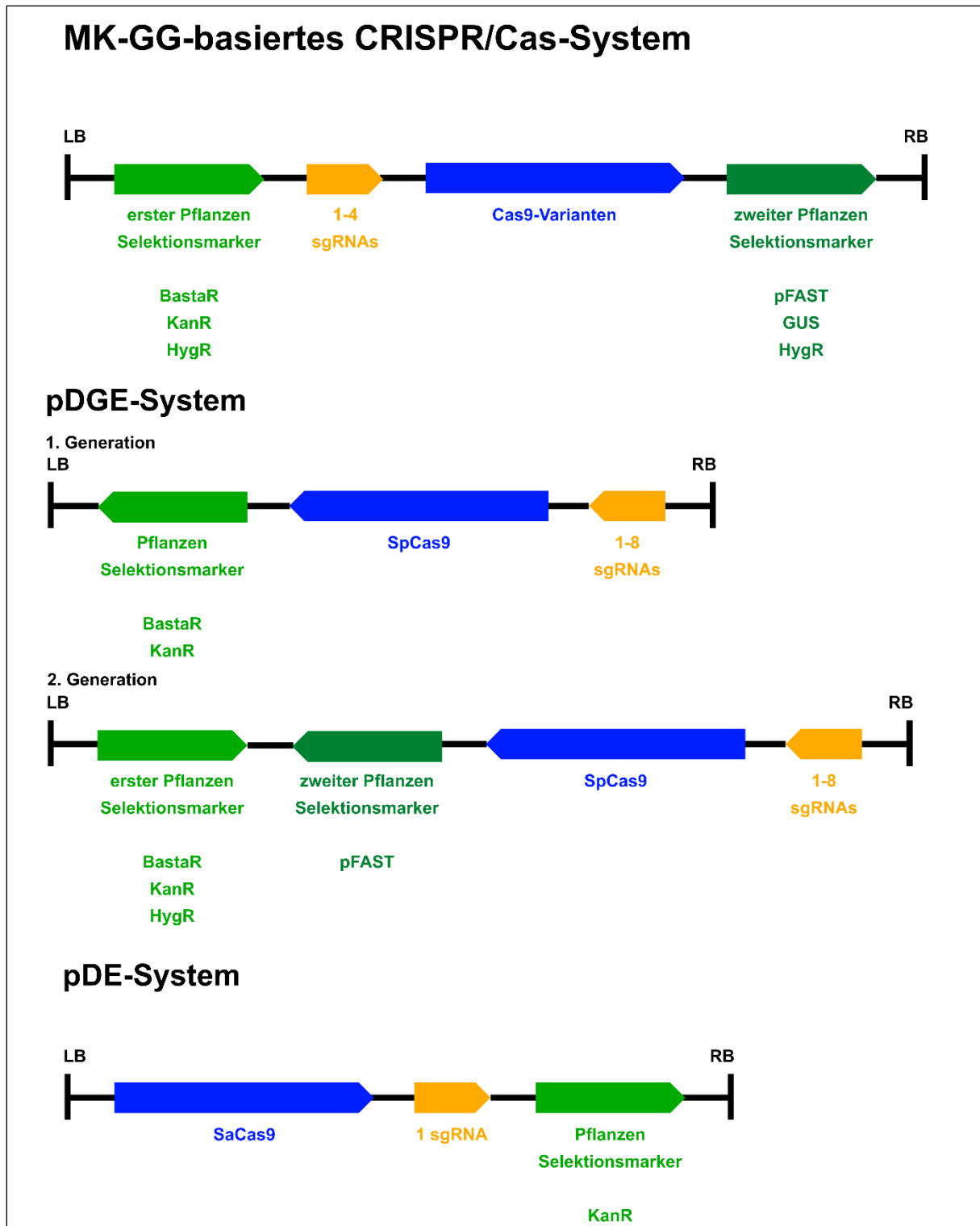
Mit diesem weiterentwickelten System, ist es nach einigen Optimierungen gelungen, unterschiedliche Deletionsmutanten zu generieren. Ausschlaggebend für die erfolgreiche Deletion von Genen und Gen-Clustern war die Fusion von Kernlokalisierungssignalen an die Cas9, wie in Säugerzellen gezeigt (Le Cong et al. 2013). Für das *AtGSTU10*-Gen zeigte dieses optimierte System eine Effizienz von 14 % aller analysierten Primärtransformanten gegenüber einer Effizienz kleiner 0,3 % für die *SaCas9* ohne Kernlokalisierung, wobei die Effizienzen der CRISPR/Cas9 stets Target-Gen-spezifisch sind. Aufbauend auf diesem Ergebnis konnten unter anderem Deletionsmutanten für den Gen-Cluster *AtGSTU1* bis *AtGSTU7* generiert werden. Hierfür wurden 14 kb der 14,25 kb (von Start-Codon der *AtGSTU1* bis zum Stopp-Codon der *AtGSTU7*) des Gen-Clusters mit einer Effizienz von 4,5 % deletiert. In weiteren Linien wurden gezielt Abschnitte des Gen-Clusters deletiert, wie beispielsweise der Bereich von der *AtGSTU1* bis *AtGSTU5*. Ebenfalls wurde das System dazu genutzt, Gene für andere Proteinfamilien zu deletieren. Diese Linien wurden in der vorliegenden Arbeit nicht weiterverwendet. Jedoch konnte mit ihnen verifiziert werden, dass dieses CRISPR/Cas9-System nicht nur auf die *AtGST*-Gene limitiert ist. Alle CRISPR/Cas-Pflanzenlinien die generiert wurden, sind in Tabelle 6-7 zusammengefasst (6 Anhang).

Das *Multi-Kingdom Golden-Gate System* ist zusammenfassend gesagt ein modulares System, das auf unterschiedlichen Klonierungsebenen basiert (2.5.6 Golden-Gate basierte Klonierung; Binder et al. 2014; Chiasson et al. 2019). Dabei werden aus den fünf Basiselementen Promotor, Gen, Terminator sowie N- und C-terminale Proteintags, die als Level I Vektoren vorliegen, in Level II funktionelle Konstrukte kloniert. Bis zu fünf dieser funktionellen Gen-Konstrukte können in Level III zu einem Multi-

Gen-Konstrukt verknüpft werden. Bei Vektoren, die in Pflanzen transformiert werden, sind Teil dieses Multi-Gen-Konstrukt auch entsprechende Selektionsmarker (Binder et al. 2014; Chiasson et al. 2019).

Die Integration der *SpCas9* und der *SaCas9* in das GG-System stellt die Grundlage eines vereinheitlichten CRISPR/Cas-Systems dar, das durch andere Cas-Proteine, weitere Promotoren und unterschiedliche Protein-Fusionen erweitert werden kann. Im GG-System sind bereits Protokolle für die Klonierung einzelner Genbausteine vorhanden. Diese Protokolle wurden für die Klonierung von CRISPR/Cas-Konstrukten erweitert. Basis dieser neuen Protokolle ist der Aufbau von binären Pflanzenvektoren, die von anderen Vektorsystemen abgeleitet sind.

Die Position der pflanzenspezifischen Resistenzmarker auf die erste bzw. letzte Position im binären Vektor (Abbildung 4-13, A) sind durch das GG-System definiert (Chiasson et al. 2019). Dadurch ist es möglich bei der Selektion die vollständige Integration der T-DNA in das pflanzliche Genom zu überprüfen. Alternativ dienen Fluoreszenzmarker wie das pFAST (*Fluorescence Accumulation Seed Technology*; Shimada et al. 2010) als eine Selektion von nicht-transgenen Pflanzen in der Folgegenerationen. Auch in anderen Vektorsystemen wie dem *Dicot Genome Editing* (pDGE; Ordon et al. 2017; Abbildung 4-13, B) und dem Gateway basierendem CRISPR-System (Fauser et al. 2014; Abbildung 4-13, C) sind die Resistenzmarker am Anfang oder Ende der zu inserierenden T-DNA lokalisiert. Die Expressionskassette der Cas9 ist in dem System, das in dieser Arbeit etabliert wurde, auf die vorletzte Position definiert (Abbildung 4-13, A). Somit können auf der zweiten und dritten Position zwei Expressionskassetten für sgRNAs integriert werden. Zudem wurden im Zuge der Arbeit weitere Vektoren kloniert, die es ermöglichen, dass die zweite und dritte Position erweitert wurden. So konnten schlussendlich bis zu vier sgRNAs integriert werden.



**Abbildung 4-13: Vergleichender Aufbau unterschiedlicher CRISPR/Cas-Systeme**

Aufbau der transferierten T-DNA des in dieser Arbeit entwickelten CRISPR/Cas-System im Vergleich zu dem pDGE-System (Ordon et al. 2017) und dem pDE-System (Wolter et al. 2018). Dargestellt sind in Grün die Position der Pflanzen-spezifischen Selektionsmarker, in Blau die Position der Cas9-Gene und in Gelb die Position der sgRNA-Kassetten.

Insgesamt gesehen, konnte ein System entwickelt werden, dass eine Gen-Deletionseffizienz von 9 % für alle in dieser Arbeit generierten CRISPR-Linien in den Primärtransformanten aufweist (n=590; 6 Anhang; Tabelle 6-7). Im Vergleich zu anderen Systemen ist die Effizienz für die Gen-Deletion bis zu

dreimal höher (Wang et al. 2015; Durr et al. 2018) und alle untersuchten Gen-Deletionen wurden vererbt, was bisher nicht bei allen Systemen mit dem eizellspezifischen Promotor der Fall war (Durr et al. 2018). Zudem kann das in dieser Arbeit generierte System auf einfache Weise erweitert werden, da es auf dem *Multi-Kingdom Golden-Gate* System basiert (Chiasson et al. 2019).

Intension dieser Arbeit war, neben der Generierung von Multi-Knock-Out-Linien, auch Pflanzenlinien zu generieren die eine höhere Rate der Homologen Rekombination aufweisen. Das Verständnis und die Manipulation der homologen Rekombination und des *non-homologous end-joining* (NHEJ) *in planta* ist von großer Bedeutung für die Pflanzen-Gentechnik (Huang und Puchta 2019). DNA-Schäden werden *in planta* durch das NHEJ sehr effizient repariert (Huang und Puchta 2019; Lin et al. 2020). Diese Tatsache erschwert es *in planta* Knock-Ins zu generieren.

Für die Untersuchung der Homologen Rekombination *in planta* wurden in dieser Arbeit mit der flu5C Arabidopsis Linie gearbeitet. Bei flu5C handelt es sich um eine Punktmutante. Durch die Mutation akkumuliert *in planta* während den Dunkelphasen Protoporphyrin IX, das unter Lichteinfluss Sauerstoffradikale bildet (Meskauskiene et al. 2001). Somit überlebt die Mutante nur bei Dauerlicht. Ein Tag-Nacht-Rhythmus von 6h/6h wirkt auf die Keimlinge letal. Diese Eigenschaft kann als Selektionsmarker ohne den Einsatz von Toxinen verwendet werden. Zudem zeigen im Dunkeln angezogene Keimlinge der Mutanten unter UV-Licht eine blaue Fluoreszenz (3.9 Homologe Rekombination *in planta*).

Durch das Einbringen eines funktionellen FLU-Gens kann die Mutation komplementiert werden. Im Zuge dieser Arbeit wurde ein nichtfunktionelles Gen eingebracht, dass durch Cas9-induzierte Homologe Rekombination funktionell wurde. Es konnten solche homologe Rekombination zweifelsfrei nachgewiesen werden. Hierfür wurden die transformierten Samen mit einem Tag-Nacht-Rhythmus von 6h/6h zur Keimung gebracht. Die Keimlinge, die diese Selektion überlebten wurden anschließend auf die Rekombination mittels PCR hin überprüft und das PCR-Produkt mittels Sequenzierung verifiziert. Wegen genomischer und chromosomaler Instabilität, die bei Mutanten des HR-Systems oder des NHEJ System auftreten (Huang und Puchta 2019), konnte die Folgegeneration nicht weiter analysiert werden.

Da die homologe Rekombination *in planta* viele Anwendungsgebiete bietet, wie beispielsweise Basenpaar-Substitutionen, Knock-Ins und Modifikation von regulatorischen Elementen der Genexpression, stand die Erforschung der homologen Rekombination lange im Vordergrund. Bisherige erfolgreiche homologen Rekombinationen sind jedoch in Reportergenen gelungen, deren spezifischer Phänotyp als Selektion diente (Miki et al. 2018). Neuere Systeme, wie beispielsweise das Prime-Editing,

versuchen, die homologe Rekombination zu umgehen (Hassan et al. 2020; Anzalone et al. 2020). Solche Systeme könnten in Zukunft immer mehr Anwendung finden (Hahn et al. 2018; Arya et al. 2020).

## 5 Literaturverzeichnis

Adeboya, Monilola O.; Edwards, Raymond L.; Lasse, Thomas; Maitland, Derek J.; Shields, Len; Whalley, Anthony J. S. (1996): Metabolites of the higher fungi. Part 29. Maldoxin, maldoxone, dihydromaldoxin, isodihydromaldoxin and dechlorodihydromaldoxin. A spirocyclohexadienone, a depsidone and three diphenyl ethers: keys in the depsidone biosynthetic pathway from a member of the fungus genus *Xylaria*. In: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* (12), S. 1419. DOI: 10.1039/p19960001419.

Ahmad, L.; Rylott, E.; Bruce, N. C.; Edwards, R.; Grogan, G. (2016): AtGSTF2 from *Arabidopsis thaliana* in complex with camalexin.

Ahmad, L.; Rylott, E.; Bruce, N. C.; Grogan, G. (2017a): Glutathione transferase U25 from *Arabidopsis thaliana* in complex with glutathione disulfide.

Ahmad, Laziana; Rylott, Elizabeth L.; Bruce, Neil C.; Edwards, Robert; Grogan, Gideon (2017b): Structural evidence for *Arabidopsis* glutathione transferase AtGSTF2 functioning as a transporter of small organic ligands. In: *FEBS open bio* 7 (2), S. 122–132. DOI: 10.1002/2211-5463.12168.

Akihiro Kubo; Tomoko Sano; Hikaru Saji; Kunisuke Tanaka; Noriaki Kondo; Kiyoshi Tanaka (1993): Primary Structure and Properties of Glutathione Reductase from *Arabidopsis thaliana*. In: *Plant and Cell Physiology*. DOI: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a078548.

Amberg, D. C.; Burk, D. J.; Strathern, J. N. (2005): *Methods in yeast genetics: a Cold Spring Harbor Laboratory course manual*.

Andrews, Christopher J.; Skipsey, Mark; Townson, Jane K.; Morris, Carol; Jepson, Ian; Edwards, Robert (1997): Glutathione transferase activities toward herbicides used selectively in soybean. In: *Pesticide science* 51 (2), S. 213–222.

Anzalone, Andrew V.; Koblan, Luke W.; Liu, David R. (2020): Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. In: *Nature biotechnology* 38 (7), S. 824–844. DOI: 10.1038/s41587-020-0561-9.

Armbruster, B. L.; Clark, R. D.; Sharp, C. R.; Dill, G. M. (1993): Herbicidal Action of Nitrophenyl Pyrazole Ether MON 12800: Immunolocalization, Ultrastructural, and Physiological Studies. In: *Pesticide Biochemistry and Physiology* 47 (1), S. 21–35. DOI: 10.1006/pest.1993.1059.

Arya, Sagar S.; Mahto, Binod K.; Ramkumar, Thakku R.; Lenka, Sangram K. (2020): Sharpening gene editing toolbox in *Arabidopsis* for plants. In: *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 29 (4), S. 769–784. DOI: 10.1007/s13562-020-00606-4.

Asami, Yukihiro; Jang, Jae-Hyuk; Oh, Hyuncheol; Sohn, Jae Hak; Kim, Jong Won; Moon, Dong Oh et al. (2012): Violaceols function as actin inhibitors inducing cell shape elongation in fibroblast cells. In: *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 76 (8), S. 1431–1437. DOI: 10.1271/bbb.120074.

Atkinson, Holly J.; Babbitt, Patricia C. (2009): Glutathione transferases are structural and functional outliers in the thioredoxin fold. In: *Biochemistry* 48 (46), S. 11108–11116. DOI: 10.1021/bi901180v.

Atwell, Susanna; Huang, Yu S.; Vilhjálmsson, Bjarni J.; Willems, Glenda; Horton, Matthew; Li, Yan et al. (2010): Genome-wide association study of 107 phenotypes in *Arabidopsis thaliana* inbred lines. In: *Nature* 465 (7298), S. 627–631. DOI: 10.1038/nature08800.

Axarli, Irene; Dhavala, Prathusha; Papageorgiou, Anastassios C.; Labrou, Nikolaos E. (2009): Crystallographic and functional characterization of the fluorodifen-inducible glutathione transferase from *Glycine max* reveals an active site topography suited for diphenylether herbicides and a novel L-site. In: *Journal of molecular biology* 385 (3), S. 984–1002. DOI: 10.1016/j.jmb.2008.10.084.

Babon, J. J.; McKenzie, M.; Cotton, R. G. H. (2003): The Use of Resolvases T4 Endonuclease VII and T7 Endonuclease I in Mutation Detection. In: *MB* 23 (1), S. 73–82. DOI: 10.1385/MB:23:1:73.

Bayer CropScience (2012): Sicherheitsdatenblatt - BASTA. Online verfügbar unter [https://wcms.agroschuth.de/sicherheitsdb/basta\\_12340\\_190712\\_v4\\_clp\\_n.pdf](https://wcms.agroschuth.de/sicherheitsdb/basta_12340_190712_v4_clp_n.pdf), zuletzt geprüft am 25.07.2021.

Bednarek, Pawel; Pislewska-Bednarek, Mariola; Svatos, Ales; Schneider, Bernd; Doubsky, Jan; Mansurova, Madina et al. (2009): A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense. In: *Science (New York, N.Y.)* 323 (5910), S. 101–106. DOI: 10.1126/science.1163732.

Belhaj, Khaoula; Chaparro-Garcia, Angela; Kamoun, Sophien; Patron, Nicola J.; Nekrasov, Vladimir (2015): Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. In: *Current opinion in biotechnology* 32, S. 76–84. DOI: 10.1016/j.copbio.2014.11.007.

Benekos, Kostantinos; Kissoudis, Christos; Nianiou-Obeidat, Irini; Labrou, Nikolaos; Madesis, Panagiotis; Kalamaki, Mary et al. (2010): Overexpression of a specific soybean GmGSTU4 isoenzyme improves diphenyl ether and chloroacetanilide herbicide tolerance of transgenic tobacco plants. In: *Journal of biotechnology* 150 (1), S. 195–201. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2010.07.011.

Berichte über Inlandsabsatz und Export von Pflanzenschutzmitteln (2021), zuletzt aktualisiert am 27.01.2021, zuletzt geprüft am 27.01.2021.



Binder, Andreas; Lambert, Jayne; Morbitzer, Robert; Popp, Claudia; Ott, Thomas; Lahaye, Thomas; Parniske, Martin (2014): A modular plasmid assembly kit for multigene expression, gene silencing and silencing rescue in plants. In: *PLoS one* 9 (2), e88218. DOI: 10.1371/journal.pone.0088218.

Booth, J.; Boyland, E.; Sims, P. (1961): An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione. In: *The Biochemical journal* 79 (3), S. 516–524. DOI: 10.1042/bj0790516.

Bortesi, Luisa; Fischer, Rainer (2015): The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. In: *Biotechnology advances* 33 (1), S. 41–52. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2014.12.006.

Brilisauer, Klaus; Rapp, Johanna; Rath, Pascal; Schöllhorn, Anna; Bleul, Lisa; Weiß, Elisabeth et al. (2019): Cyanobacterial antimetabolite 7-deoxy-sedoheptulose blocks the shikimate pathway to inhibit the growth of prototrophic organisms. In: *Nature communications* 10 (1), S. 545. DOI: 10.1038/s41467-019-08476-8.

Bunbamrung, Nantiya; Intaraudom, Chakapong; Supothina, Sumalee; Komwijit, Somjit; Pittayakhajonwut, Pattama (2015): Antibacterial and anti-phytopathogenic substances from the insect pathogenic fungus *Gibellula* sp. BCC36964. In: *Phytochemistry Letters* 12, S. 142–147. DOI: 10.1016/j.phytol.2015.03.011.

Carter, C. (2004): The Vegetative Vacuole Proteome of *Arabidopsis thaliana* Reveals Predicted and Unexpected Proteins. In: *THE PLANT CELL ONLINE* 16 (12), S. 3285–3303. DOI: 10.1105/tpc.104.027078.

Carter, P. (1986): Site-directed mutagenesis. In: *The Biochemical journal* 237 (1), S. 1–7. DOI: 10.1042/bj2370001.

Chen, Chun-Yen; Ho, Sih-Syun; Kuo, Tzu-Yen; Hsieh, Hsu-Liang; Cheng, Yi-Sheng (2017): Structural basis of jasmonate-amido synthetase FIN219 in complex with glutathione S-transferase FIP1 during the JA signal regulation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (10), E1815-E1824. DOI: 10.1073/pnas.1609980114.

Chen, Jui-Hung; Jiang, Han-Wei; Hsieh, En-Jung; Chen, Hsing-Yu; Chien, Ching-Te; Hsieh, Hsu-Liang; Lin, Tsan-Piao (2012): Drought and salt stress tolerance of an *Arabidopsis* glutathione S-transferase U17 knockout mutant are attributed to the combined effect of glutathione and abscisic acid. In: *Plant Physiol* 158 (1), S. 340–351. DOI: 10.1104/pp.111.181875.

Chen, Senhua; Cai, Runlin; Liu, Zhaoming; Cui, Hui; She, Zhigang (2021): Secondary metabolites from mangrove-associated fungi: source, chemistry and bioactivities. In: *Natural product reports*. DOI: 10.1039/d1np00041a.

- Chen, Tao; Xiong, Hao; Yang, Jing-Fang; Zhu, Xiao-Lei; Qu, Ren-Yu; Yang, Guang-Fu (2020): Diaryl Ether: A Privileged Scaffold for Drug and Agrochemical Discovery. In: *J. Agric. Food Chem.* 68 (37), S. 9839–9877. DOI: 10.1021/acs.jafc.0c03369.
- Cherifi, Myriam; Raveton, Muriel; Picciocchi, Antoine; Ravel, Patrick; Tissot, Michel (2001): Atrazine metabolism in corn seedlings. In: *Plant Physiology and Biochemistry* 39 (7-8), S. 665–672. DOI: 10.1016/S0981-9428(01)01281-5.
- Chiasson, David; Giménez-Oya, Victor; Bircheneder, Martin; Bachmaier, Sabine; Studtrucker, Tanja; Ryan, Joel et al. (2019): A unified multi-kingdom Golden Gate cloning platform. In: *Scientific reports* 9 (1), S. 10131. DOI: 10.1038/s41598-019-46171-2.
- Chomcheon, Porntep; Wiyakrutta, Suthep; Sriubolmas, Nongluksna; Ngamrojanavanich, Nattaya; Mahidol, Chulabhorn; Ruchirawat, Somsak; Kittakoop, Prasat (2009): Metabolites from the endophytic mitosporic Dothideomycete sp. LRUB20. In: *Phytochemistry* 70 (1), S. 121–127. DOI: 10.1016/j.phytochem.2008.10.007.
- Cimmino, Alessio; Masi, Marco; Evidente, Marco; Superchi, Stefano; Evidente, Antonio (2015): Fungal phytotoxins with potential herbicidal activity: chemical and biological characterization. In: *Natural product reports*. DOI: 10.1039/c5np00081e.
- Collinson, Emma J.; Grant, Chris M. (2003): Role of yeast glutaredoxins as glutathione S-transferases. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (25), S. 22492–22497. DOI: 10.1074/jbc.M301387200.
- Czerniawski, Paweł; Bednarek, Paweł (2018): Glutathione S-Transferases in the Biosynthesis of Sulfur-Containing Secondary Metabolites in Brassicaceae Plants. In: *Frontiers in plant science* 9, S. 1639. DOI: 10.3389/fpls.2018.01639.
- Dad, A-B K.; Ramakrishna, S.; Song, M.; Kim, H. (2014): Enhanced gene disruption by programmable nucleases delivered by a minicircle vector. In: *Gene Ther* 21 (11), S. 921–930. DOI: 10.1038/gt.2014.76.
- Daengrot, Charuwan; Rukachaisirikul, Vatcharin; Tadpetch, Kwanruthai; Phongpaichit, Souwalak; Bowornwiriyan, Kawitsara; Sakayaroj, Jariya; Shen, Xu (2016): Penicillanthone and penicillidic acids A–C from the soil-derived fungus *Penicillium aculeatum* PSU-RSPG105. In: *RSC Adv.* 6 (46), S. 39700–39709. DOI: 10.1039/c6ra04401h.
- Daley, James M.; Palmbo, Phillip L.; Wu, Dongliang; Wilson, Thomas E. (2005): Nonhomologous end joining in yeast. In: *Annual review of genetics* 39, S. 431–451. DOI: 10.1146/annurev.genet.39.073003.113340.

- Dayan, Franck E.; Cantrell, Charles L.; Duke, Stephen O. (2009): Natural products in crop protection. In: *Bioorganic & medicinal chemistry* 17 (12), S. 4022–4034. DOI: 10.1016/j.bmc.2009.01.046.
- Dayan, Franck E.; Duke, Stephen O. (2014): Natural compounds as next-generation herbicides. In: *PLANT PHYSIOLOGY* 166 (3), S. 1090–1105.
- Dayan, Franck E.; Duke, Stephen O.; Weete, John D.; Hancock, H. Gary (1997): Selectivity and mode of action of carfentrazone-ethyl, a novel phenyl triazolinone herbicide. In: *Pestic. Sci.* 51 (1), S. 65–73. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9063(199709)51:1%3C65::AID-PS598%3E3.0.CO;2-9.
- Dayan, Franck E.; Ferreira, Daneel; Wang, Yan-Hong; Khan, Ikhlas A.; McInroy, John A.; Pan, Zhiqiang (2008): A pathogenic fungi diphenyl ether phytotoxin targets plant enoyl (acyl carrier protein) reductase. In: *PLANT PHYSIOLOGY* 147 (3), S. 1062–1071.
- Dayan, Franck E.; Owens, Daniel K.; Duke, Stephen O. (2012): Rationale for a natural products approach to herbicide discovery. In: *Pest management science* 68 (4), S. 519–528. DOI: 10.1002/ps.2332.
- Dayan, Franck E.; Romagni, Joanne G.; Duke, Stephen O. (2000): Investigating the Mode of Action of Natural Phytotoxins. In: *Journal of chemical ecology* 26 (9), S. 2079–2094. DOI: 10.1023/A:1005512331061.
- Didierjean, C.; Rouhier, N.; Pegeot, H.; Gense, F. (2016a): Crystal structure of glutathione transferase F7 from *Populus trichocarpa*.
- Didierjean, C.; Rouhier, N.; Pegeot, H.; Gense, F. (2016b): Crystal structure of glutathione transferase F8 from *Populus trichocarpa*.
- Dixon, David P.; Edwards, Robert (2009): Selective binding of glutathione conjugates of fatty acid derivatives by plant glutathione transferases. In: *The Journal of biological chemistry* 284 (32), S. 21249–21256. DOI: 10.1074/jbc.M109.020107.
- Dixon, David P.; Edwards, Robert (2010a): Glutathione transferases. In: *The arabidopsis book* 8, e0131. DOI: 10.1199/tab.0131.
- Dixon, David P.; Edwards, Robert (2010b): Roles for stress-inducible lambda glutathione transferases in flavonoid metabolism in plants as identified by ligand fishing. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (47), S. 36322–36329. DOI: 10.1074/jbc.M110.164806.
- Dixon, David P.; Edwards, Robert (2018): Protein-Ligand Fishing in planta for Biologically Active Natural Products Using Glutathione Transferases. In: *Frontiers in plant science* 9, S. 1659. DOI: 10.3389/fpls.2018.01659.

- Dixon, David P.; Hawkins, Timothy; Hussey, Patrick J.; Edwards, Robert (2009): Enzyme activities and subcellular localization of members of the Arabidopsis glutathione transferase superfamily. In: *Journal of experimental botany* 60 (4), S. 1207–1218. DOI: 10.1093/jxb/ern365.
- Dixon, David P.; Laphorn, Adrian; Edwards, Robert (2002): Plant glutathione transferases. In: *Genome Biol* 3 (3), reviews3004.1. DOI: 10.1186/gb-2002-3-3-reviews3004.
- Dixon, David P.; McEwen, Alastair G.; Laphorn, Adrian J.; Edwards, Robert (2003): Forced evolution of a herbicide detoxifying glutathione transferase. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (26), S. 23930–23935. DOI: 10.1074/jbc.M303620200.
- Dixon, David P.; Sellars, Jonathan D.; Edwards, Robert (2011): The Arabidopsis phi class glutathione transferase AtGSTF2: binding and regulation by biologically active heterocyclic ligands. In: *The Biochemical journal* 438 (1), S. 63–70. DOI: 10.1042/BJ20101884.
- Dixon, David P.; Skipsey, Mark; Edwards, Robert (2010): Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. In: *Phytochemistry* 71 (4), S. 338–350. DOI: 10.1016/j.phytochem.2009.12.012.
- Duke, S. O.; Dayan, F. E. (2011): Bioactivity of Herbicides. In: *Comprehensive Biotechnology*: Elsevier, S. 23–35.
- Durr, Julius; Papareddy, Ranjith; Nakajima, Keiji; Gutierrez-Marcos, Jose (2018): Highly efficient heritable targeted deletions of gene clusters and non-coding regulatory regions in Arabidopsis using CRISPR/Cas9. In: *Scientific reports* 8 (1), S. 4443. DOI: 10.1038/s41598-018-22667-1.
- Ebada, Sherif S.; El-Neketi, Mona; Ebrahim, Weaam; Mándi, Attila; Kurtán, Tibor; Kalscheuer, Rainer et al. (2018): Cytotoxic secondary metabolites from the endophytic fungus *Aspergillus versicolor* KU258497. In: *Phytochemistry Letters* 24, S. 88–93. DOI: 10.1016/j.phytol.2018.01.010.
- Ebrahim, Weaam; El-Neketi, Mona; Lewald, Laura-Isabell; Orfali, Raha S.; Lin, Wenhan; Rehberg, Nidja et al. (2016): Metabolites from the Fungal Endophyte *Aspergillus austroafricanus* in Axenic Culture and in Fungal-Bacterial Mixed Cultures. In: *Journal of natural products* 79 (4), S. 914–922. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b00975.
- Edwards, R. (2000): Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. In: *Trends in Plant Science* 5 (5), S. 193–198. DOI: 10.1016/S1360-1385(00)01601-0.
- El-hawary, Seham S.; Moawad, Abeer S.; Bahr, Hebatallah S.; Abdelmohsen, Usama Ramadan; Mohammed, Rabab (2020): Natural product diversity from the endophytic fungi of the genus *Aspergillus*. In: *RSC Adv.* 10 (37), S. 22058–22079. DOI: 10.1039/d0ra04290k.

- Endo, Akira; Masafumi, Mikami; Kaya, Hidetaka; Toki, Seiichi (2016): Efficient targeted mutagenesis of rice and tobacco genomes using Cpf1 from *Francisella novicida*. In: *Scientific reports* 6, S. 38169. DOI: 10.1038/srep38169.
- Endo, Masaki; Ishikawa, Yuichi; Osakabe, Keishi; Nakayama, Shigeki; Kaya, Hidetaka; Araki, Takashi et al. (2006): Increased frequency of homologous recombination and T-DNA integration in *Arabidopsis* CAF-1 mutants. In: *The EMBO journal* 25 (23), S. 5579–5590. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601434.
- Fang, M. J.; Fang, H.; Li, W. J.; Huang, D. M.; Wu, Z.; Zhao, Y. F. (2012): A new diphenyl ether from *Phoma* sp. strain, SHZK-2. In: *Natural product research* 26 (13), S. 1224–1228. DOI: 10.1080/14786419.2011.559947.
- Fausser, Friedrich; Roth, Nadine; Pacher, Michael; Ilg, Gabriele; Sánchez-Fernández, Rocío; Biesgen, Christian; Puchta, Holger (2012): In planta gene targeting. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (19), S. 7535–7540. DOI: 10.1073/pnas.1202191109.
- Fausser, Friedrich; Schiml, Simon; Puchta, Holger (2014): Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana*. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 79 (2), S. 348–359. DOI: 10.1111/tpj.12554.
- Filichkin, Sergei A.; DiFazio, Stephen P.; Brunner, Amy M.; Davis, John M.; Yang, Zamin K.; Kalluri, Udaya C. et al. (2007): Efficiency of gene silencing in *Arabidopsis*: direct inverted repeats vs. transitive RNAi vectors. In: *Plant biotechnology journal* 5 (5), S. 615–626. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2007.00267.x.
- Frear, D. S.; Swanson, H. R.; Mansager, E. R. (1983): Acifluorfen metabolism in soybean: Diphenylether bond cleavage and the formation of homoglutathione, cysteine, and glucose conjugates. In: *Pesticide Biochemistry and Physiology* 20 (3), S. 299–310. DOI: 10.1016/0048-3575(83)90104-9.
- Fritsch, Olivier; Benvenuto, Giovanna; Bowler, Chris; Molinier, Jean; Hohn, Barbara (2004): The INO80 protein controls homologous recombination in *Arabidopsis thaliana*. In: *Molecular cell* 16 (3), S. 479–485. DOI: 10.1016/j.molcel.2004.09.034.
- Frova, Carla (2006): Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives. In: *Biomolecular engineering* 23 (4), S. 149–169. DOI: 10.1016/j.bioeng.2006.05.020.
- Gallé, Ágnes; Czékus, Zalán; Bela, Krisztina; Horváth, Edit; Ördög, Attila; Csiszár, Jolán; Poór, Péter (2018): Plant Glutathione Transferases and Light. In: *Frontiers in plant science* 9, S. 1944. DOI: 10.3389/fpls.2018.01944.

Garcerá, Ana; Barreto, Lina; Piedrafita, Lidia; Tamarit, Jordi; Herrero, Enrique (2006): *Saccharomyces cerevisiae* cells have three Omega class glutathione S-transferases acting as 1-Cys thiol transferases. In: *The Biochemical journal* 398 (2), S. 187–196. DOI: 10.1042/BJ20060034.

Gasiunas, Giedrius; Barrangou, Rodolphe; Horvath, Philippe; Siksnys, Virginijus (2012): Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (39), E2579-86. DOI: 10.1073/pnas.1208507109.

Geu-Flores, Fernando; Møldrup, Morten Emil; Böttcher, Christoph; Olsen, Carl Erik; Scheel, Dierk; Halkier, Barbara Ann (2011): Cytosolic  $\gamma$ -glutamyl peptidases process glutathione conjugates in the biosynthesis of glucosinolates and camalexin in *Arabidopsis*. In: *THE PLANT CELL ONLINE* 23 (6), S. 2456–2469.

Geu-Flores, Fernando; Nielsen, Morten Thrane; Nafisi, Majse; Møldrup, Morten Emil; Olsen, Carl Erik; Motawia, Mohammed Saddik; Halkier, Barbara Ann (2009): Glucosinolate engineering identifies a gamma-glutamyl peptidase. In: *Nature chemical biology* 5 (8), S. 575–577. DOI: 10.1038/nchembio.185.

Gläser, Katharina; Kanawati, Basem; Kubo, Tobias; Schmitt-Kopplin, Philippe; Grill, Erwin (2014): Exploring the *Arabidopsis* sulfur metabolome. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 77 (1), S. 31–45. DOI: 10.1111/tpj.12359.

Gläser-Wellmann, Katharina (2016): Analyse des Schwefelmetaboloms in *Arabidopsis thaliana*. Dissertation. Universitätsbibliothek der TU München, München.

Goloubinoff, P.; Edelman, M.; Hallick, R. B. (1984): Chloroplast-coded atrazine resistance in *Solanum nigrum*: psbA loci from susceptible and resistant biotypes are isogenic except for a single codon change. In: *Nucleic acids research* 12 (24), S. 9489–9496. DOI: 10.1093/nar/12.24.9489.

Goodstein, David M.; Shu, Shengqiang; Howson, Russell; Neupane, Rochak; Hayes, Richard D.; Fazo, Joni et al. (2012): Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. In: *Nucleic acids research* 40 (Database issue), D1178-86. DOI: 10.1093/nar/gkr944.

Grzam, Anke; Martin, Melinda N.; Hell, Rüdiger; Meyer, Andreas J. (2007): gamma-Glutamyl transpeptidase GGT4 initiates vacuolar degradation of glutathione S-conjugates in *Arabidopsis*. In: *FEBS letters* 581 (17), S. 3131–3138. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.05.071.

Grzam, Anke; Tennstedt, Pierre; Clemens, Stephan; Hell, Rüdiger; Meyer, Andreas J. (2006): Vacuolar sequestration of glutathione S-conjugates outcompetes a possible degradation of the glutathione

moiety by phytochelatin synthase. In: *FEBS letters* 580 (27), S. 6384–6390. DOI: 10.1016/j.febslet.2006.10.050.

Gueldener, U.; Heinisch, J.; Koehler, G. J.; Voss, D.; Hegemann, J. H. (2002): A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. In: *Nucleic acids research* 30 (6), e23. DOI: 10.1093/nar/30.6.e23.

Gullner, Gábor; Komives, Tamas; Király, Lóránt; Schröder, Peter (2018): Glutathione S-Transferase Enzymes in Plant-Pathogen Interactions. *Frontiers in Plant Science*, 9. DOI: 10.3389/fpls.2018.01836/.

Guo, Longfang; Lin, Jie; Niu, Shubin; Liu, Shuchun; Liu, Ling (2020a): Pestalotiones A-D: Four New Secondary Metabolites from the Plant Endophytic Fungus *Pestalotiopsis Theae*. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 25 (3). DOI: 10.3390/molecules25030470.

Guo, Yong-Wei; Gong, Ben-Qiang; Yuan, Jie; Li, Hou-Jin; Mahmud, Taifo; Huang, Yun et al. (2020b): L-Phenylalanine Alters the Privileged Secondary Metabolite Production in the Marine-Derived Fungus *Trichoderma erinaceum* F1-1. In: *Journal of natural products* 83 (1), S. 79–87. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b00710.

Gurushidze, Maia; Hensel, Goetz; Hiekel, Stefan; Schedel, Sindy; Valkov, Vladimir; Kumlehn, Jochen (2014): True-breeding targeted gene knock-out in barley using designer TALE-nuclease in haploid cells. In: *PLoS one* 9 (3), e92046. DOI: 10.1371/journal.pone.0092046.

Hahn, Florian; Eisenhut, Marion; Mantegazza, Otho; Weber, Andreas P. M. (2018): Homology-Directed Repair of a Defective Glabrous Gene in *Arabidopsis* With Cas9-Based Gene Targeting. In: *Frontiers in plant science* 9, S. 424. DOI: 10.3389/fpls.2018.00424.

Hargreaves, Jai; Park, Ja-on; Ghisalberti, Emilio L.; Sivasithamparam, Krishnapillai; Skelton, Brian W.; White, Allan H. (2002): New Chlorinated Diphenyl Ethers from an *Aspergillus* Species. In: *J. Nat. Prod.* 65 (1), S. 7–10. DOI: 10.1021/np0102758.

Hassan, Md. Mahmudul; Yuan, Guoliang; Chen, Jin-Gui; Tuskan, Gerald A.; Yang, Xiaohan (2020): Prime Editing Technology and Its Prospects for Future Applications in Plant Biology Research. In: *BioDesign Research* 2020, S. 1–14. DOI: 10.34133/2020/9350905.

Heazlewood, Joshua L.; Tonti-Filippini, Julian S.; Gout, Alexander M.; Day, David A.; Whelan, James; Millar, A. Harvey (2004): Experimental analysis of the *Arabidopsis* mitochondrial proteome highlights signaling and regulatory components, provides assessment of targeting prediction programs, and indicates plant-specific mitochondrial proteins. In: *THE PLANT CELL ONLINE* 16 (1), S. 241–256. DOI: 10.1105/tpc.016055.

- Heitzeberg, Fabian; Chen, I-Peng; Hartung, Frank; Orel, Nadiya; Angelis, Karel J.; Puchta, Holger (2004): The Rad17 homologue of Arabidopsis is involved in the regulation of DNA damage repair and homologous recombination. In: *Plant J* 38 (6), S. 954–968. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2004.02097.x.
- Hellens, R. P.; Edwards, E. A.; Leyland, N. R.; Bean, S.; Mullineaux, P. M. (2000): pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. In: *Plant Molecular Biology* 42 (6), S. 819–832. DOI: 10.1023/A:1006496308160.
- Hirschberg, J.; McIntosh, L. (1983): Molecular Basis of Herbicide Resistance in *Amaranthus hybridus*. In: *Science* 222 (4630), S. 1346–1349. DOI: 10.1126/science.222.4630.1346.
- Holsters, M.; Silva, B.; van Vliet, F.; Genetello, C.; Block, M. de; Dhaese, P. et al. (1980): The functional organization of the nopaline *A. tumefaciens* plasmid pTiC58. In: *Plasmid* 3 (2), S. 212–230. DOI: 10.1016/0147-619X(80)90110-9.
- Hu, Tina T.; Pattyn, Pedro; Bakker, Erica G.; Cao, Jun; Cheng, Jan-Fang; Clark, Richard M. et al. (2011): The Arabidopsis lyrata genome sequence and the basis of rapid genome size change. In: *Nature genetics* 43 (5), S. 476–481. DOI: 10.1038/ng.807.
- Hu, Tingzhang; Qv, Xiaoxiao; Xiao, Guosheng; Huang, Xiaoyun (2009): Enhanced tolerance to herbicide of rice plants by over-expression of a glutathione S-transferase. In: *Mol Breeding* 24 (4), S. 409–418. DOI: 10.1007/s11032-009-9302-y.
- Hu, Zheng; Ding, Wencheng; Da Zhu; Yu, Lan; Jiang, Xiaohui; Wang, Xiaoli et al. (2015): TALEN-mediated targeting of HPV oncogenes ameliorates HPV-related cervical malignancy. In: *The Journal of clinical investigation* 125 (1), S. 425–436. DOI: 10.1172/JCI78206.
- Huang, Teng-Kuei; Puchta, Holger (2019): CRISPR/Cas-mediated gene targeting in plants: finally a turn for the better for homologous recombination. In: *Plant cell reports* 38 (4), S. 443–453. DOI: 10.1007/s00299-019-02379-0.
- Izawa, Shingo; Inoue, Yoshiharu; Kimura, Akira (1995): Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *FEBS letters* 368 (1), S. 73–76. DOI: 10.1016/0014-5793(95)00603-7.
- Jablonowski, Nicolai David; Schäffer, Andreas; Burauel, Peter (2011): Still present after all these years: persistence plus potential toxicity raise questions about the use of atrazine. In: *Environmental science and pollution research international* 18 (2), S. 328–331. DOI: 10.1007/s11356-010-0431-y.



- Jacobs, J. M.; Jacobs, N. J.; Sherman, T. D.; Duke, S. O. (1991): Effect of diphenyl ether herbicides on oxidation of protoporphyrinogen to protoporphyrin in organellar and plasma membrane enriched fractions of barley. In: *PLANT PHYSIOLOGY* 97 (1), S. 197–203. DOI: 10.1104/pp.97.1.197.
- Jayasuriya, Hiranthi; Ball, Richard G.; Zink, Deborah L.; Smith, Jack L.; Goetz, Michael A.; Jenkins, Rosalind G. et al. (1995): Barcoloneic Acid A, a New Farnesyl-Protein Transferase Inhibitor from a Phoma Species. In: *J. Nat. Prod.* 58 (7), S. 986–991. DOI: 10.1021/np50121a002.
- Jeppesen, Mads Gravers; Ortiz, Pedro; Shepard, William; Kinzy, Terri Goss; Nyborg, Jens; Andersen, Gregers Rom (2003): The crystal structure of the glutathione S-transferase-like domain of elongation factor 1Bgamma from *Saccharomyces cerevisiae*. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (47), S. 47190–47198. DOI: 10.1074/jbc.M306630200.
- Ji, Yu-Bin; Chen, Wen-Ju; Shan, Ti-Zhuang; Sun, Bi-Yun; Yan, Peng-Cheng; Jiang, Wei (2020): Antibacterial Diphenyl Ether, Benzophenone and Xanthone Derivatives from *Aspergillus flavipes*. In: *Chemistry & biodiversity* 17 (2), e1900640. DOI: 10.1002/cbdv.201900640.
- Jinek, Martin; Chylinski, Krzysztof; Fonfara, Ines; Hauer, Michael; Doudna, Jennifer A.; Charpentier, Emmanuelle (2012): A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. In: *Science (New York, N.Y.)* 337 (6096), S. 816–821. DOI: 10.1126/science.1225829.
- Kahlau, Sabine; Schröder, Florian; Freigang, Jörg; Laber, Bernd; Lange, Gudrun; Passon, Daniel et al. (2020): Aclonifen targets solanesyl diphosphate synthase, representing a novel mode of action for herbicides. In: *Pest management science*. DOI: 10.1002/ps.5781.
- Kao, Chih-Wei; Bakshi, Madhunita; Sherameti, Irena; Dong, Sheqin; Reichelt, Michael; Oelmüller, Ralf; Yeh, Kai-Wun (2016): A Chinese cabbage (*Brassica campestris* subsp. *Chinensis*)  $\tau$ -type glutathione-S-transferase stimulates Arabidopsis development and primes against abiotic and biotic stress. In: *Plant Molecular Biology* 92 (6), S. 643–659. DOI: 10.1007/s11103-016-0531-2.
- Karavangeli, Margarita; Labrou, Nikolaos E.; Clonis, Yannis D.; Tsaftaris, Athanasios (2005): Development of transgenic tobacco plants overexpressing maize glutathione S-transferase I for chloroacetanilide herbicides phytoremediation. In: *Biomolecular engineering* 22 (4), S. 121–128. DOI: 10.1016/j.bioeng.2005.03.001.
- Kataya, Amr R. A.; Reumann, Sigrun (2010): Arabidopsis glutathione reductase 1 is dually targeted to peroxisomes and the cytosol. In: *Plant signaling & behavior* 5 (2), S. 171–175. DOI: 10.4161/psb.5.2.10527.

Kelley, Lawrence A.; Mezulis, Stefans; Yates, Christopher M.; Wass, Mark N.; Sternberg, Michael J. E. (2015): The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. In: *Nature protocols* 10 (6), S. 845–858. DOI: 10.1038/nprot.2015.053.

Kim, J.; Toro, R.; Bhosle, R.; Al Obaidi, N. F.; Morisco, L. L.; Wasserman, S. R. et al. (2013): Crystal structure of a glutathione transferase family member from *Ricinus communis*, target EFI-501866.

Kim, Sunghwan; Chen, Jie; Cheng, Tiejun; Gindulyte, Asta; He, Jia; He, Siqian et al. (2019): PubChem 2019 update: improved access to chemical data. In: *Nucleic acids research* 47 (D1), D1102-D1109. DOI: 10.1093/nar/gky1033.

Klaiklay, Saranyoo; Rukachaisirikul, Vatcharin; Tadpetch, Kwanruthai; Sukpondma, Yaowapa; Phongpaichit, Souwalak; Buatong, Jirayu; Sakayaroj, Jariya (2012): Chlorinated chromone and diphenyl ether derivatives from the mangrove-derived fungus *Pestalotiopsis* sp. PSU-MA69. In: *Tetrahedron* 68 (10), S. 2299–2305. DOI: 10.1016/j.tet.2012.01.041.

Kleinstiver, Benjamin P.; Pattanayak, Vikram; Prew, Michelle S.; Tsai, Shengdar Q.; Nguyen, Nhu T.; Zheng, Zongli; Joung, J. Keith (2016a): High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. In: *Nature* 529 (7587), S. 490–495. DOI: 10.1038/nature16526.

Kleinstiver, Benjamin P.; Prew, Michelle S.; Tsai, Shengdar Q.; Nguyen, Nhu T.; Topkar, Ved V.; Zheng, Zongli; Joung, J. Keith (2015a): Broadening the targeting range of *Staphylococcus aureus* CRISPR-Cas9 by modifying PAM recognition. In: *Nature biotechnology* 33 (12), S. 1293–1298. DOI: 10.1038/nbt.3404.

Kleinstiver, Benjamin P.; Prew, Michelle S.; Tsai, Shengdar Q.; Topkar, Ved V.; Nguyen, Nhu T.; Zheng, Zongli et al. (2015b): Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. In: *Nature* 523 (7561), S. 481–485. DOI: 10.1038/nature14592.

Kleinstiver, Benjamin P.; Tsai, Shengdar Q.; Prew, Michelle S.; Nguyen, Nhu T.; Welch, Moira M.; Lopez, Jose M. et al. (2016b): Genome-wide specificities of CRISPR-Cas Cpf1 nucleases in human cells. In: *Nature biotechnology* 34 (8), S. 869–874. DOI: 10.1038/nbt.3620.

Koch, Marcus A.; Matschinger, Michaela (2007): Evolution and genetic differentiation among relatives of *Arabidopsis thaliana*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (15), S. 6272–6277. DOI: 10.1073/pnas.0701338104.

Koncz, Csaba; Schell, Jeff (1986): The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. In: *Molec Gen Genet* 204 (3), S. 383–396. DOI: 10.1007/BF00331014.

- Koonin, E. V.; Mushegian, A. R.; Tatusov, R. L.; Altschul, S. F.; Bryant, S. H.; Bork, P.; Valencia, A. (1994): Eukaryotic translation elongation factor 1 gamma contains a glutathione transferase domain - study of a diverse, ancient protein superfamily using motif search and structural modeling. In: *Protein science : a publication of the Protein Society* 3 (11), S. 2045–2054. DOI: 10.1002/pro.5560031117.
- Kowalski, Natalie (2016): Charakterisierung der Glutathiontransferasen aus *Arabidopsis thaliana*. Dissertation. Universitätsbibliothek der TU München, München.
- Krajewski, Matthias P.; Kanawati, Basem; Fekete, Agnes; Kowalski, Natalie; Schmitt-Kopplin, Philippe; Grill, Erwin (2013): Analysis of *Arabidopsis* glutathione-transferases in yeast. In: *Phytochemistry* 91, S. 198–207. DOI: 10.1016/j.phytochem.2012.04.016.
- Krogh, Berit Olsen; Symington, Lorraine S. (2004): Recombination proteins in yeast. In: *Annual review of genetics* 38, S. 233–271. DOI: 10.1146/annurev.genet.38.072902.091500.
- Kumlehn, Jochen; Pietralla, Janine; Hensel, Goetz; Pacher, Michael; Puchta, Holger (2018): The CRISPR/Cas revolution continues: From efficient gene editing for crop breeding to plant synthetic biology. In: *Journal of integrative plant biology* 60 (12), S. 1127–1153. DOI: 10.1111/jipb.12734.
- Labun, Kornel; Montague, Tessa G.; Gagnon, James A.; Thyme, Summer B.; Valen, Eivind (2016): CHOPCHOP v2: a web tool for the next generation of CRISPR genome engineering. In: *Nucleic acids research* 44 (W1), W272-6. DOI: 10.1093/nar/gkw398.
- Labun, Kornel; Montague, Tessa G.; Krause, Maximilian; Torres Cleuren, Yamila N.; Tjeldnes, Håkon; Valen, Eivind (2019): CHOPCHOP v3: expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing. In: *Nucleic acids research* 47 (W1), W171-W174. DOI: 10.1093/nar/gkz365.
- Lallement, Pierre-Alexandre; Brouwer, Bastiaan; Keech, Olivier; Hecker, Arnaud; Rouhier, Nicolas (2014): The still mysterious roles of cysteine-containing glutathione transferases in plants. In: *Frontiers in pharmacology* 5, S. 192. DOI: 10.3389/fphar.2014.00192.
- Lallement, Pierre-Alexandre; Meux, Edgar; Gualberto, José M.; Dumarcay, Stéphane; Favier, Frédérique; Didierjean, Claude et al. (2015): Glutathionyl-hydroquinone reductases from poplar are plastidial proteins that deglutathionylate both reduced and oxidized glutathionylated quinones. In: *FEBS letters* 589 (1), S. 37–44. DOI: 10.1016/j.febslet.2014.11.021.
- Lamoureux, G. L.; Shimabukuro, R. H.; Swanson, H. R.; Frear, D. S. (1970): Metabolism of 2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-s-triazine (atrazine) in excised sorghum leaf sections. In: *J. Agric. Food Chem.* 18 (1), S. 81–86. DOI: 10.1021/jf60167a029.

- Lans, Hannes; Marteiijn, Jurgen A.; Vermeulen, Wim (2012): ATP-dependent chromatin remodeling in the DNA-damage response. In: *Epigenetics & chromatin* 5, S. 4. DOI: 10.1186/1756-8935-5-4.
- Le Cong; Ran, F. Ann; Cox, David; Lin, Shuailiang; Barretto, Robert; Habib, Naomi et al. (2013): Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. In: *Science (New York, N.Y.)* 339 (6121), S. 819–823. DOI: 10.1126/science.1231143.
- Lee, Ciaran M.; Cradick, Thomas J.; Bao, Gang (2016): The *Neisseria meningitidis* CRISPR-Cas9 System Enables Specific Genome Editing in Mammalian Cells. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 24 (3), S. 645–654. DOI: 10.1038/mt.2016.8.
- Lee, H. J.; Duke, M. V.; Duke, S. O. (1993): Cellular Localization of Protoporphyrinogen-Oxidizing Activities of Etiolated Barley (*Hordeum vulgare* L.) Leaves (Relationship to Mechanism of Action of Protoporphyrinogen Oxidase-Inhibiting Herbicides). In: *Plant Physiol* 102 (3), S. 881–889. DOI: 10.1104/pp.102.3.881.
- Li, Chao; Hao, Mengyu; Wang, Wenxiang; Wang, Hui; Chen, Fan; Chu, Wen et al. (2018a): An Efficient CRISPR/Cas9 Platform for Rapidly Generating Simultaneous Mutagenesis of Multiple Gene Homoeologs in Allotetraploid Oilseed Rape. In: *Frontiers in plant science* 9, Artikel 442, S. 442. DOI: 10.3389/fpls.2018.00442.
- Li, Xiao-Bin; Zhou, Yan-Hui; Zhu, Rong-Xiu; Chang, Wen-Qiang; Yuan, Hui-Qing; Gao, Wei et al. (2015): Identification and biological evaluation of secondary metabolites from the endolichenic fungus *Aspergillus versicolor*. In: *Chemistry & biodiversity* 12 (4), S. 575–592. DOI: 10.1002/cbdv.201400146.
- Li, Yan; Sun, Bingda; Liu, Shuchun; Jiang, Lihua; Liu, Xingzhong; Zhang, Hua; Che, Yongsheng (2008): Bioactive asterric acid derivatives from the Antarctic ascomycete fungus *Geomyces* sp. In: *Journal of natural products* 71 (9), S. 1643–1646. DOI: 10.1021/np8003003.
- Li, Zhao-Xia; Wang, Xiu-Fang; Ren, Guang-Wei; Yuan, Xiao-Long; Deng, Ning; Ji, Gui-Xia et al. (2018b): Prenylated Diphenyl Ethers from the Marine Algal-Derived Endophytic Fungus *Aspergillus tennesseeensis*. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 23 (9). DOI: 10.3390/molecules23092368.
- Liang, Zhen; Zhang, Kang; Chen, Kunling; Gao, Caixia (2014): Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. In: *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao* 41 (2), S. 63–68. DOI: 10.1016/j.jgg.2013.12.001.
- Lichtenthaler, Hartmut K. (1987): [34] Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. In: *Plant Cell Membranes*, Bd. 148: Elsevier (Methods in Enzymology), S. 350–382.

- Lieber, Michael R. (2010): The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. In: *Annual review of biochemistry* 79, S. 181–211. DOI: 10.1146/annurev.biochem.052308.093131.
- Lin, Qiupeng; Zong, Yuan; Xue, Chenxiao; Wang, Shengxing; Jin, Shuai; Zhu, Zixu et al. (2020): Prime genome editing in rice and wheat. In: *Nature biotechnology* 38 (5), S. 582–585. DOI: 10.1038/s41587-020-0455-x.
- Liu, Rui; Zhu, Weiming; Zhang, Yapeng; Zhu, Tianjiao; Liu, Hongbing; Fang, Yuchun; Gu, Qianqun (2006): A new diphenyl ether from marine-derived fungus *Aspergillus* sp. B-F-2. In: *J. Antibiot.* 59 (6), S. 362–365. DOI: 10.1038/ja.2006.52.
- Liu, Xin; Deng, Xiao-Jian; Li, Chun-Yan; Xiao, Yong-Kang; Zhao, Ke; Guo, Jia et al. (2022): Mutation of Protoporphyrinogen IX Oxidase Gene Causes Spotted and Rolled Leaf and Its Overexpression Generates Herbicide Resistance in Rice. In: *International journal of molecular sciences* 23 (10). DOI: 10.3390/ijms23105781.
- Liu, Xinru; Song, Fuhang; Ma, Li; Chen, Caixia; Xiao, Xue; Ren, Biao et al. (2013): Sydowiols A–C: Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase inhibitors from an East China Sea marine-derived fungus, *Aspergillus sydowii*. In: *Tetrahedron Letters* 54 (45), S. 6081–6083. DOI: 10.1016/j.tetlet.2013.08.137.
- Lozano-Juste, Jorge; Cutler, Sean R. (2014): Plant genome engineering in full bloom. In: *Trends in Plant Science* 19 (5), S. 284–287. DOI: 10.1016/j.tplants.2014.02.014.
- Lu, Zhenyu; Zhu, Huajie; Fu, Peng; Wang, Yi; Zhang, Zhihua; Lin, Haipeng et al. (2010): Cytotoxic polyphenols from the marine-derived fungus *Penicillium expansum*. In: *Journal of natural products* 73 (5), S. 911–914. DOI: 10.1021/np100059m.
- Luhua, Song; Hegie, Alicia; Suzuki, Nobuhiro; Shulaev, Elena; Luo, Xiaozhong; Cenariu, Diana et al. (2013): Linking genes of unknown function with abiotic stress responses by high-throughput phenotype screening. In: *Physiol Plant* 148 (3), S. 322–333. DOI: 10.1111/ppl.12013.
- Malmvärn, Anna; Marsh, Göran; Kautsky, Lena; Athanasiadou, Maria; Bergman, Åke; Asplund, Lillemor (2005): Hydroxylated and Methoxylated Brominated Diphenyl Ethers in the Red Algae *Ceramium tenuicorne* and Blue Mussels from the Baltic Sea. In: *Environ. Sci. Technol.* 39 (9), S. 2990–2997. DOI: 10.1021/es0482886.
- Malmvärn, Anna; Zebühr, Yngve; Kautsky, Lena; Bergman, Ke; Asplund, Lillemor (2008): Hydroxylated and methoxylated polybrominated diphenyl ethers and polybrominated dibenzo-p-dioxins in red alga

and cyanobacteria living in the Baltic Sea. In: *Chemosphere* 72 (6), S. 910–916. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2008.03.036.

Malzahn, Aimee; Lowder, Levi; Qi, Yiping (2017): Plant genome editing with TALEN and CRISPR. In: *Cell & bioscience* 7, S. 21. DOI: 10.1186/s13578-017-0148-4.

Malzahn, Aimee A.; Tang, Xu; Lee, Keunsub; Ren, Qiurong; Sretenovic, Simon; Zhang, Yingxiao et al. (2019): Application of CRISPR-Cas12a temperature sensitivity for improved genome editing in rice, maize, and Arabidopsis. In: *BMC biology* 17 (1), S. 9. DOI: 10.1186/s12915-019-0629-5.

Manevich, Y.; Hutchens, S.; Tew, K. D.; Townsend, D. M. (2013): Allelic variants of glutathione S-transferase P1-1 differentially mediate the peroxidase function of peroxiredoxin VI and alter membrane lipid peroxidation. In: *Free radical biology & medicine* 54, S. 62–70. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.556.

Marrs, K. A.; Alfenito, M. R.; Lloyd, A. M.; Walbot, V. (1995): A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene Bronze-2. In: *Nature* 375 (6530), S. 397–400. DOI: 10.1038/375397a0.

Marrs, Kathleen A. (1996): The functions and Regulation of Glutathione S-Transferases in plants. In: *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 47, S. 127–158. DOI: 10.1146/annurev.arplant.47.1.127.

Marty, Laurent; Bausewein, Daniela; Müller, Christopher; Bangash, Sajid Ali Khan; Moseler, Anna; Schwarzländer, Markus et al. (2019): Arabidopsis glutathione reductase 2 is indispensable in plastids, while mitochondrial glutathione is safeguarded by additional reduction and transport systems. In: *The New phytologist* 224 (4), S. 1569–1584. DOI: 10.1111/nph.16086.

Mashiyama, Susan T.; Malabanan, M. Merced; Akiva, Eyal; Bhosle, Rahul; Branch, Megan C.; Hillerich, Brandan et al. (2014): Large-scale determination of sequence, structure, and function relationships in cytosolic glutathione transferases across the biosphere. In: *PLoS biology* 12 (4), e1001843. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001843.

Matringe, M.; Camadro, J. M.; Labbe, P.; Scalla, R. (1989a): Protoporphyrinogen oxidase as a molecular target for diphenyl ether herbicides. In: *The Biochemical journal* 260 (1), S. 231–235. DOI: 10.1042/bj2600231.

Matringe, Michel; Camadro, Jean-Michel; Labbe, Pierre; Scalla, René (1989b): Protoporphyrinogen oxidase inhibition by three peroxidizing herbicides: Oxadiazon, LS 82-556 and M&B 39279. In: *FEBS letters* 245 (1-2), S. 35–38. DOI: 10.1016/0014-5793(89)80186-3.

- Meskauskiene, R.; Nater, M.; Goslings, D.; Kessler, F.; op den Camp, R.; Apel, K. (2001): FLU: a negative regulator of chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (22), S. 12826–12831. DOI: 10.1073/pnas.221252798.
- Messner, Burkhard; Thulke, Oliver; Schäffner, Anton R. (2003): *Arabidopsis* glucosyltransferases with activities toward both endogenous and xenobiotic substrates. In: *Planta* 217 (1), S. 138–146. DOI: 10.1007/s00425-002-0969-0.
- Miki, Daisuke; Zhang, Wenxin; Zeng, Wenjie; Feng, Zhengyan; Zhu, Jian-Kang (2018): CRISPR/Cas9-mediated gene targeting in *Arabidopsis* using sequential transformation. In: *Nature communications* 9 (1), S. 1967. DOI: 10.1038/s41467-018-04416-0.
- Millot, Marion; Tomasi, Sophie; Studzinska, Elisabeth; Rouaud, Isabelle; Boustie, Joël (2009): Cytotoxic constituents of the lichen *Diploicia canescens*. In: *Journal of natural products* 72 (12), S. 2177–2180. DOI: 10.1021/np9003728.
- Mitsutake, Kenichiro; Iwamura, Hajime; Shimizu, Ryo; Fujita, Toshio (1986): Quantitative structure-activity relationship of photosystem II inhibitors in chloroplasts and its link to herbicidal action. In: *J. Agric. Food Chem.* 34 (4), S. 725–732. DOI: 10.1021/jf00070a034.
- Montague, Tessa G.; Cruz, José M.; Gagnon, James A.; Church, George M.; Valen, Eivind (2014): CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. In: *Nucleic acids research* 42 (Web Server issue), W401-7. DOI: 10.1093/nar/gku410.
- Mucha, Stefanie; Heinzlmeir, Stephanie; Kriechbaumer, Verena; Strickland, Benjamin; Kirchhelle, Charlotte; Choudhary, Manisha et al. (2019): The Formation of a Camalexin Biosynthetic Metabolon. In: *Plant Cell* 31 (11), S. 2697–2710. DOI: 10.1105/tpc.19.00403.
- Mulema, Joseph M. K. (2011): Proteomic analysis of the *Arabidopsis thaliana*-*Botrytis cinerea* interaction using two-dimensional liquid chromatography. In: *Afr. J. Biotechnol.* 10 (76). DOI: 10.5897/AJB10.2558.
- Mülhardt, Cornel (2013): *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*. 7., aktualisierte Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Der Experimentator).
- Murakami, Takeshi; Anzai, Hiroyuki; Imai, Satoshi; Satoh, Atsuyuki; Nagaoka, Kozo; Thompson, Charles J. (1986): The bialaphos biosynthetic genes of *Streptomyces hygroscopicus*: Molecular cloning and characterization of the gene cluster. In: *Molec Gen Genet* 205 (1), S. 42–53. DOI: 10.1007/BF02428031.

Murashige, Toshio; Skoog, Folke (1962): A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. In: *Physiol Plant* 15 (3), S. 473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.

Nianiou-Obeidat, Irini; Madesis, Panagiotis; Kissoudis, Christos; Voulgari, Georgia; Chronopoulou, Evangelia; Tsaftaris, Athanasios; Labrou, Nikolaos E. (2017): Plant glutathione transferase-mediated stress tolerance: functions and biotechnological applications. In: *Plant cell reports* 36 (6), S. 791–805. DOI: 10.1007/s00299-017-2139-7.

Nishimasu, H.; Ishitani, R.; Nureki, O. (2014): Crystal structure of *Streptococcus pyogenes* Cas9 in complex with guide RNA and target DNA.

Nishimasu, H.; Ishitani, R.; Nureki, O. (2015a): Crystal structure of *Staphylococcus aureus* Cas9 in complex with sgRNA and target DNA (TTGGGT PAM).

Nishimasu, Hiroshi; Le Cong; Yan, Winston X.; Ran, F. Ann; Zetsche, Bernd; Li, Yinqing et al. (2015b): Crystal Structure of *Staphylococcus aureus* Cas9. In: *Cell* 162 (5), S. 1113–1126. DOI: 10.1016/j.cell.2015.08.007.

Niu, Siwen; Si, Longlong; Liu, Dong; Zhou, Andrew; Zhang, Ziwei; Shao, Zongze et al. (2016): Spiromastilactones: A new class of influenza virus inhibitors from deep-sea fungus. In: *European journal of medicinal chemistry* 108, S. 229–244. DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.09.037.

Niu, Siwen; Xia, Manli; Chen, Mingliang; Liu, Xiupian; Li, Zengpeng; Xie, Yunchang et al. (2019): Cytotoxic Polyketides Isolated from the Deep-Sea-Derived Fungus *Penicillium chrysogenum* MCCC 3A00292. In: *Marine drugs* 17 (12). DOI: 10.3390/md17120686.

Nuankeaw, Katesaraporn; Chaiyosang, Boonyanoot; Suebrasri, Thanapat; Kanokmedhakul, Somdej; Lumyong, Saisaamorn; Boonlue, Sophon (2020): First report of secondary metabolites, Violaceol I and Violaceol II produced by endophytic fungus, *Trichoderma polyalthiae* and their antimicrobial activity. In: *Mycoscience* 61 (1), S. 16–21. DOI: 10.1016/j.myc.2019.10.001.

Ogawa, T.; Ando, K.; Aotani, Y.; Shinoda, K.; Tanaka, T.; Tsukuda, E. et al. (1995): RES-1214-1 and -2, novel non-peptidic endothelin type A receptor antagonists produced by *Pestalotiopsis* sp. In: *J. Antibiot.* 48 (12), S. 1401–1406. DOI: 10.7164/antibiotics.48.1401.

Ohashi, Hiroshi; Akiyama, Hirokazu; Nishikori, Koji; Mochizuki, Jun-Ichiro (1992): Asterric acid, a new endothelin binding inhibitor. In: *J. Antibiot.* 45 (10), S. 1684–1685. DOI: 10.7164/antibiotics.45.1684.

Ohkama-Ohtsu, Naoko; Radwan, Safaa; Peterson, Annita; Zhao, Ping; Badr, Abdel Fattah; Xiang, Chengbin; Oliver, David J. (2007a): Characterization of the extracellular gamma-glutamyl



transpeptidases, GGT1 and GGT2, in Arabidopsis. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 49 (5), S. 865–877. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2006.03004.x.

Ohkama-Ohtsu, Naoko; Zhao, Ping; Xiang, Chengbin; Oliver, David J. (2007b): Glutathione conjugates in the vacuole are degraded by gamma-glutamyl transpeptidase GGT3 in Arabidopsis. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 49 (5), S. 878–888. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2006.03005.x.

Ordon, Jana; Gantner, Johannes; Kemna, Jan; Schwalgun, Lennart; Reschke, Maik; Streubel, Jana et al. (2017): Generation of chromosomal deletions in dicotyledonous plants employing a user-friendly genome editing toolkit. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 89 (1), S. 155–168. DOI: 10.1111/tpj.13319.

Overy, David P.; Larsen, Thomas O.; Dalsgaard, Petur W.; Frydenvang, Karla; Phipps, Richard; Munro, Murray H.G.; Christophersen, Carsten (2005): Andrastin A and barceloneic acid metabolites, protein farnesyl transferase inhibitors from *Penicillium albocoremium*: chemotaxonomic significance and pathological implications. In: *Mycological Research* 109 (11), S. 1243–1249. DOI: 10.1017/S0953756205003734.

Owen, W. John (1991): Herbicide Metabolism as a Basis for Selectivity. In: Ralph C. Kirkwood (Hg.): *Target Sites for Herbicide Action*. Boston, MA: Springer US, S. 285–314.

Papageorgiou, A. C.; Chronopoulou, E. G.; Labrou, N. E. (2018): Crystal structure of a GST variant.

Pascal, Sophie; Gullner, Gabor; Kömives, Tamás; Scalla, René (2000): Selective Induction of Glutathione S-Transferase Subunits in Wheat Plants Exposed to the Herbicide Acifluorfen. In: *Zeitschrift für Naturforschung C* 55 (1-2). DOI: 10.1515/znc-2000-1-208.

Paul, Joseph W.; Qi, Yiping (2016): CRISPR/Cas9 for plant genome editing: accomplishments, problems and prospects. In: *Plant cell reports* 35 (7), S. 1417–1427. DOI: 10.1007/s00299-016-1985-z.

Peskan-Berghofer, Tatjana; Shahollari, Bationa; Giong, Pham Huong; Hehl, Solveig; Markert, Christine; Blanke, Verena et al. (2004): Association of *Piriformospora indica* with *Arabidopsis thaliana* roots represents a novel system to study beneficial plant-microbe interactions and involves early plant protein modifications in the endoplasmic reticulum and at the plasma membrane. In: *Physiol Plant* 122 (4), S. 465–477. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2004.00424.x.

Petřivalský, Marek; Machala, Miroslav; Nezveda, Karel; Piačka, Vladimír; Svobodová, Zdenka; Drábek, Petr (1997): Glutathione-dependent detoxifying enzymes in rainbow trout liver: Search for specific biochemical markers of chemical stress. In: *Environmental Toxicology and Chemistry* 16 (7), S. 1417–1421. DOI: 10.1002/etc.5620160714.

Pettersen, Eric F.; Goddard, Thomas D.; Huang, Conrad C.; Couch, Gregory S.; Greenblatt, Daniel M.; Meng, Elaine C.; Ferrin, Thomas E. (2004): UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. In: *Journal of computational chemistry* 25 (13), S. 1605–1612. DOI: 10.1002/jcc.20084.

Phainuphong, Patima; Rukachaisirikul, Vatcharin; Phongpaichit, Souwalak; Preedanon, Sita; Sakayaroj, Jariya (2017): Diphenyl ethers and indanones from the soil-derived fungus *Aspergillus unguis* PSU-RSPG204. In: *Tetrahedron* 73 (40), S. 5920–5925. DOI: 10.1016/j.tet.2017.08.039.

Piślewska-Bednarek, Mariola; Nakano, Ryohei Thomas; Hiruma, Kei; Pastorczyk, Marta; Sanchez-Vallet, Andrea; Singkaravanit-Ogawa, Suthitar et al. (2018): Glutathione Transferase U13 Functions in Pathogen-Triggered Glucosinolate Metabolism. In: *Plant Physiol* 176 (1), S. 538–551. DOI: 10.1104/pp.17.01455.

Poppenberger, Brigitte; Berthiller, Franz; Lucyshyn, Doris; Sieberer, Tobias; Schuhmacher, Rainer; Krska, Rudolf et al. (2003): Detoxification of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (48), S. 47905–47914. DOI: 10.1074/jbc.M307552200.

Powles, Stephen B.; Yu, Qin (2010): Evolution in action: plants resistant to herbicides. In: *Annual review of plant biology* 61, S. 317–347. DOI: 10.1146/annurev-arplant-042809-112119.

Qi, Yiping; Zhang, Yong; Zhang, Feng; Baller, Joshua A.; Cleland, Spencer C.; Ryu, Yungil et al. (2013): Increasing frequencies of site-specific mutagenesis and gene targeting in *Arabidopsis* by manipulating DNA repair pathways. In: *Genome research* 23 (3), S. 547–554. DOI: 10.1101/gr.145557.112.

Qin, Jing; Lyu, Ang; Zhang, Qing-Hua; Yang, Long; Zhang, Jing; Wu, Ming-de; Li, Guo-Qing (2019): Strain identification and metabolites isolation of *Aspergillus capensis* CanS-34A from *Brassica napus*. In: *Molecular biology reports* 46 (3), S. 3451–3460. DOI: 10.1007/s11033-019-04808-5.

Ray, Deepak K.; Mueller, Nathaniel D.; West, Paul C.; Foley, Jonathan A. (2013): Yield Trends Are Insufficient to Double Global Crop Production by 2050. In: *PloS one* 8 (6), e66428. DOI: 10.1371/journal.pone.0066428.

Renard, Joan; Niñoles, Regina; Martínez-Almonacid, Irene; Gayubas, Beatriz; Mateos-Fernández, Rubén; Bissoli, Gaetano et al. (2020): Identification of novel seed longevity genes related to oxidative stress and seed coat by genome-wide association studies and reverse genetics. In: *Plant, Cell & Environment* 43 (10), S. 2523–2539. DOI: 10.1111/pce.13822.

- Rendina, Alan R.; Craig-Kennard, Adrienne C.; Beaudoin, Jacqueline D.; Breen, Mary K. (1990): Inhibition of acetyl-coenzyme A carboxylase by two classes of grass-selective herbicides. In: *J. Agric. Food Chem.* 38 (5), S. 1282–1287. DOI: 10.1021/jf00095a029.
- Roberts, Terry R.; Hutson, David H.; Lee, Philip W.; Nicholls, Peter H.; Plimmer, Jack R. (2007): *Metabolic Pathways of Agrochemicals*. Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- Romero, A.; Martín, M.; Oliva, B.; La Torre, J. de; Furio, V.; La Hoya, M. de et al. (2012): Glutathione S-transferase P1 c.313A G polymorphism could be useful in the prediction of doxorubicin response in breast cancer patients. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 23 (7), S. 1750–1756. DOI: 10.1093/annonc/mdr483.
- Rukachaisirikul, Vatcharin; Satpradit, Siwaporn; Klaiklay, Saranyoo; Phongpaichit, Souwalak; Borwornwiriyan, Kawitsara; Sakayaroj, Jariya (2014): Polyketide anthraquinone, diphenyl ether, and xanthone derivatives from the soil fungus *Penicillium* sp. PSU-RSPG99. In: *Tetrahedron* 70 (34), S. 5148–5152. DOI: 10.1016/j.tet.2014.05.105.
- Saetang, Praphatsorn; Rukachaisirikul, Vatcharin; Phongpaichit, Souwalak; Preedanon, Sita; Sakayaroj, Jariya; Hadsadee, Sarinya; Jungsuttiwong, Siriporn (2021): Antibacterial and Antifungal Polyketides from the Fungus *Aspergillus unguis* PSU-MF16. In: *Journal of natural products* 84 (5), S. 1498–1506. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.0c01308.
- San Filippo, Joseph; Sung, Patrick; Klein, Hannah (2008): Mechanism of eukaryotic homologous recombination. In: *Annual review of biochemistry* 77, S. 229–257. DOI: 10.1146/annurev.biochem.77.061306.125255.
- Santamaría, M. Estrella; Arnaiz, Ana; Velasco-Arroyo, Blanca; Grbic, Vojislava; Diaz, Isabel; Martinez, Manuel (2018): Arabidopsis response to the spider mite *Tetranychus urticae* depends on the regulation of reactive oxygen species homeostasis. In: *Scientific reports* 8 (1), S. 9432. DOI: 10.1038/s41598-018-27904-1.
- Schimpl, Simon; Fauser, Friedrich; Puchta, Holger (2014): The CRISPR/Cas system can be used as nuclease for in planta gene targeting and as paired nickases for directed mutagenesis in Arabidopsis resulting in heritable progeny. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 80 (6), S. 1139–1150. DOI: 10.1111/tpj.12704.
- Schindele, Angelina; Dorn, Annika; Puchta, Holger (2019): CRISPR/Cas brings plant biology and breeding into the fast lane. In: *Current opinion in biotechnology* 61, S. 7–14. DOI: 10.1016/j.copbio.2019.08.006.

Schindele, Patrick; Wolter, Felix; Puchta, Holger (2018): Transforming plant biology and breeding with CRISPR/Cas9, Cas12 and Cas13. In: *FEBS letters* 592 (12), S. 1954–1967. DOI: 10.1002/1873-3468.13073.

Ściskalska, Milena; Milnerowicz, Halina (2021): Activity of glutathione S-transferase and its  $\pi$  isoenzyme in the context of single nucleotide polymorphism in the GSTP1 gene (rs1695) and tobacco smoke exposure in the patients with acute pancreatitis and healthy subjects. In: *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 140, S. 111589. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111589.

Shaked, Hezi; Melamed-Bessudo, Cathy; Levy, Avraham A. (2005): High-frequency gene targeting in Arabidopsis plants expressing the yeast RAD54 gene. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (34), S. 12265–12269. DOI: 10.1073/pnas.0502601102.

Sharma, Raghvendra; Sahoo, Annapurna; Devendran, Ragunathan; Jain, Mukesh (2014): Over-expression of a rice tau class glutathione s-transferase gene improves tolerance to salinity and oxidative stresses in Arabidopsis. In: *PloS one* 9 (3), e92900. DOI: 10.1371/journal.pone.0092900.

Sherman, Timothy D.; Duke, Mary V.; Clark, Robert D.; Sanders, Ernest F.; Matsumoto, Hiroshi; Duke, Stephen O. (1991): Pyrazole phenyl ether herbicides inhibit protoporphyrinogen oxidase. In: *Pesticide Biochemistry and Physiology* 40 (3), S. 236–245. DOI: 10.1016/0048-3575(91)90095-4.

Shi, Jinrui; Gao, Huirong; Wang, Hongyu; Lafitte, H. Renee; Archibald, Rayeann L.; Yang, Meizhu et al. (2017): ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. In: *Plant biotechnology journal* 15 (2), S. 207–216. DOI: 10.1111/pbi.12603.

Shimabukuro, R. H.; Swanson, H. R.; Walsh, W. C. (1970): Glutathione Conjugation Atrazine Detoxication Mechanism in Corn. In: *PLANT PHYSIOLOGY* 46 (1), S. 103–107.

Shimada, A.; Takahashi, I.; Kawano, T.; Kimura, Y. (2001): Chloroisosulochrin, Chloroisosulochrin Dehydrate, And Pestheic Acid, Plant Growth Regulators, Produced By *Pestalotiopsis Theae*. In: *Zeitschrift für Naturforschung B* 56 (8), S. 797–803. DOI: 10.1515/znb-2001-0813.

Shimada, Takashi L.; Shimada, Tomoo; Hara-Nishimura, Ikuko (2010): A rapid and non-destructive screenable marker, FAST, for identifying transformed seeds of *Arabidopsis thaliana*. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 61 (3), S. 519–528. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2009.04060.x.

Shu, Pan; Li, Ziye; Min, Dedong; Zhang, Xinhua; Ai, Wen; Li, Jiaozhuo et al. (2020): CRISPR/Cas9-Mediated SIMYC2 Mutagenesis Adverse to Tomato Plant Growth and MeJA-Induced Fruit Resistance to *Botrytis cinerea*. In: *J. Agric. Food Chem.* 68 (20), S. 5529–5538. DOI: 10.1021/acs.jafc.9b08069.

- Skipsey, Mark; Andrews, Christopher J.; Townson, Jane K.; Jepson, Ian; Edwards, Robert (1997): Substrate and thiol specificity of a stress-inducible glutathione transferase from soybean. In: *FEBS letters* 409 (3), S. 370–374. DOI: 10.1016/S0014-5793(97)00554-1.
- Sprunck, Stefanie; Rademacher, Svenja; Vogler, Frank; Gheyselinck, Jacqueline; Grossniklaus, Ueli; Dresselhaus, Thomas (2012): Egg cell-secreted EC1 triggers sperm cell activation during double fertilization. In: *Science (New York, N.Y.)* 338 (6110), S. 1093–1097. DOI: 10.1126/science.1223944.
- Steinert, Jeannette; Schiml, Simon; Fauser, Friedrich; Puchta, Holger (2015): Highly efficient heritable plant genome engineering using Cas9 orthologues from *Streptococcus thermophilus* and *Staphylococcus aureus*. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 84 (6), S. 1295–1305. DOI: 10.1111/tpj.13078.
- Sugawara, Fumio; Strobel, G.; Strange, R. N.; Siedow, J. N.; van Duyne, G. D.; Clardy, J. (1987): Phytotoxins from the pathogenic fungi *Drechslera maydis* and *Drechslera sorghicola*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84 (10), S. 3081–3085.
- Sugiyama, Akifumi; Sekiya, Jiro (2005): Homoglutathione confers tolerance to acifluorfen in transgenic tobacco plants expressing soybean homoglutathione synthetase. In: *Plant & cell physiology* 46 (8), S. 1428–1432. DOI: 10.1093/pcp/pci143.
- Taguchi, Goro; Ubukata, Takahisa; Nozue, Hatsumi; Kobayashi, Yuki; Takahi, Maki; Yamamoto, Hirobumi; Hayashida, Nobuaki (2010): Malonylation is a key reaction in the metabolism of xenobiotic phenolic glucosides in *Arabidopsis* and tobacco. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 63 (6), S. 1031–1041. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2010.04298.x.
- Taniguchi, Makoto; Kaneda, Norimasa; Shibata, Kozo; Kamikawa, Tadao (1978): Isolation and Biological Activity of Aspermutarubrol, a Self-growth- inhibitor from *Aspergillus sydowi*. In: *Agricultural and Biological Chemistry* 42 (8), S. 1629–1630. DOI: 10.1080/00021369.1978.10863223.
- Tawfike, Ahmed F.; Romli, Muhammad; Clements, Carol; Abbott, Gráinne; Young, Louise; Schumacher, Marc et al. (2019): Isolation of anticancer and anti-trypanosome secondary metabolites from the endophytic fungus *Aspergillus flocculus* via bioactivity guided isolation and MS based metabolomics. In: *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 1106-1107, S. 71–83. DOI: 10.1016/j.jchromb.2018.12.032.
- Thompson, Charles J.; Movva, N. Rao; Tizard, Richard; Crameri, Reto; Davies, Julian E.; Lauwereys, Marc; Botterman, Johan (1987): Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*. In: *The EMBO journal* 6 (9), S. 2519–2523. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1987.tb02538.x.

- Tossounian, M. A.; Wahni, K.; van Molle, I.; Vertommen, D.; Rosado, L.; Messens, J. (2018): Arabidopsis thaliana GSTF9, GSO3 and GSOH bound.
- Trott, Oleg; Olson, Arthur J. (2010): AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. In: *Journal of computational chemistry* 31 (2), S. 455–461. DOI: 10.1002/jcc.21334.
- Unson, M. D.; Holland, N. D.; Faulkner, D. J. (1994): A brominated secondary metabolite synthesized by the cyanobacterial symbiont of a marine sponge and accumulation of the crystalline metabolite in the sponge tissue. In: *Marine Biology* 119 (1), S. 1–11. DOI: 10.1007/BF00350100.
- Usui, Kenji (2001): Metabolism and selectivity of rice herbicides in plants. In: *Weed Biol Manage* 1 (3), S. 137–146. DOI: 10.1046/j.1445-6664.2001.00029.x.
- Utkina, Natalia K.; Denisenko, Vladimir A.; Scholokova, Olga V.; Virovaya, Marina V.; Gerasimenko, Andrey V.; Popov, Dmitriy Yu. et al. (2001): Spongiadioxins A and B, Two New Polybrominated Dibenzo- p -dioxins from an Australian Marine Sponge Dysidea dendyi. In: *J. Nat. Prod.* 64 (2), S. 151–153. DOI: 10.1021/np0003544.
- Vain, P.; Afolabi, A. S.; Worland, B.; Snape, J. W. (2003): Transgene behaviour in populations of rice plants transformed using a new dual binary vector system: pGreen/pSoup. In: *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* 107 (2), S. 210–217. DOI: 10.1007/s00122-003-1255-7.
- van Santen, Jeffrey A.; Poynton, Ella F.; Iskakova, Dasha; McMann, Emily; Alsop, Tyler A.; Clark, Trevor N. et al. (2022): The Natural Products Atlas 2.0: a database of microbially-derived natural products. In: *Nucleic acids research* 50 (D1), D1317-D1323. DOI: 10.1093/nar/gkab941.
- Vats, Sharad (2015): Herbicides: History, Classification and Genetic Manipulation of Plants for Herbicide Resistance. In: Eric Lichtfouse (Hg.): *Sustainable Agriculture Reviews*, Bd. 15. Cham: Springer International Publishing (Sustainable Agriculture Reviews), S. 153–192.
- Venkatasubbaiah, P.; Dyke, C. G. Van; Chilton, W. S. (1992): Phytotoxic Metabolites of Phoma sorghina, a New Foliar Pathogen of Pokeweed. In: *Mycologia* 84 (5), S. 715. DOI: 10.2307/3760381.
- Vos, Martin de; van Oosten, Vivian R.; van Poecke, Remco M. P.; van Pelt, Johan A.; Pozo, Maria J.; Mueller, Martin J. et al. (2005): Signal signature and transcriptome changes of Arabidopsis during pathogen and insect attack. In: *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 18 (9), S. 923–937. DOI: 10.1094/MPMI-18-0923.

- Voytas, Daniel F. (2013): Plant genome engineering with sequence-specific nucleases. In: *Annual review of plant biology* 64, S. 327–350. DOI: 10.1146/annurev-arplant-042811-105552.
- Wagner, Ulrich; Edwards, Robert; Dixon, David P.; Mauch, Felix (2002): Probing the Diversity of the Arabidopsis glutathione S-Transferase Gene Family. In: *Plant Molecular Biology* 49 (5), S. 515–532. DOI: 10.1023/A:1015557300450.
- Wang, Cong; Guo, Lei; Hao, Jiejie; Wang, Liping; Zhu, Weiming (2016):  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitors from the Marine-Derived Fungus *Aspergillus flavipes* HN4-13. In: *Journal of natural products* 79 (11), S. 2977–2981. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b00766.
- Wang, Cong; Tang, Siyan; Cao, Shugeng (2020): Antimicrobial compounds from marine fungi. In: *Phytochem Rev* 20 (1), S. 85–117. DOI: 10.1007/s11101-020-09705-5.
- Wang, Junfeng; Lu, Zhenyu; Liu, Peipei; Wang, Yi; Li, Jing; Hong, Kui; Zhu, Weiming (2012): Cytotoxic polyphenols from the fungus *Penicillium expansum* 091 006 endogenous with the mangrove plant *Excoecaria agallocha*. In: *Planta medica* 78 (17), S. 1861–1866. DOI: 10.1055/s-0032-1315395.
- Wang, Pengcheng; Zhang, Jun; Sun, Lin; Ma, Yizan; Xu, Jiao; Liang, Sijia et al. (2018a): High efficient multisites genome editing in allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum*) using CRISPR/Cas9 system. In: *Plant biotechnology journal* 16 (1), S. 137–150. DOI: 10.1111/pbi.12755.
- Wang, Ya-Nan; Mou, Yan-Hua; Dong, Yu; Wu, Yan; Liu, Bing-Yu; Bai, Jian et al. (2018b): Diphenyl Ethers from a Marine-Derived *Aspergillus sydowii*. In: *Marine drugs* 16 (11). DOI: 10.3390/md16110451.
- Wang, Zhi-Ping; Xing, Hui-Li; Dong, Li; Zhang, Hai-Yan; Han, Chun-Yan; Wang, Xue-Chen; Chen, Qi-Jun (2015): Egg cell-specific promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous mutants for multiple target genes in Arabidopsis in a single generation. In: *Genome Biol* 16, S. 144. DOI: 10.1186/s13059-015-0715-0.
- Weigel, Detlef; Mott, Richard (2009): The 1001 genomes project for Arabidopsis thaliana. In: *Genome Biol* 10 (5), S. 107. DOI: 10.1186/gb-2009-10-5-107.
- Wen, Shitong; Fan, Weilong; Guo, Huixian; Huang, Cuiying; Yan, Zhangyuan; Long, Yuhua (2020): Two new secondary metabolites from the mangrove endophytic fungus *Pleosporeles* sp. SK7. In: *Natural product research* 34 (20), S. 2919–2925. DOI: 10.1080/14786419.2019.1598993.
- Wolter, Felix; Klemm, Jeannette; Puchta, Holger (2018): Efficient in planta gene targeting in Arabidopsis using egg cell-specific expression of the Cas9 nuclease of *Staphylococcus aureus*. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 94 (4), S. 735–746. DOI: 10.1111/tpj.13893.

Wolter, Felix; Puchta, Holger (2018): The CRISPR/Cas revolution reaches the RNA world: Cas13, a new Swiss Army knife for plant biologists. In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 94 (5), S. 767–775. DOI: 10.1111/tpj.13899.

Wu, Yingnan; Chen, Yan; Huang, Xishan; Pan, Yahong; Liu, Zhaoming; Yan, Tao et al. (2018):  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitors: Diphenyl Ethers and Phenolic Bisabolane Sesquiterpenoids from the Mangrove Endophytic Fungus *Aspergillus flavus* QQSG-3. In: *Marine drugs* 16 (9). DOI: 10.3390/md16090307.

Wünschmann, Jana; Krajewski, Matthias; Letzel, Thomas; Huber, Eva M.; Ehrmann, Alexander; Grill, Erwin; Lenzian, Klaus J. (2010): Dissection of glutathione conjugate turnover in yeast. In: *Phytochemistry* 71 (1), S. 54–61. DOI: 10.1016/j.phytochem.2009.09.034.

Xu, Kuo; Li, Xiu-Qi; Zhao, Dong-Lin; Zhang, Peng (2021): Antifungal Secondary Metabolites Produced by the Fungal Endophytes: Chemical Diversity and Potential Use in the Development of Biopesticides. In: *Frontiers in microbiology* 12, S. 689527. DOI: 10.3389/fmicb.2021.689527.

Xu, Xinxin; Liu, Ling; Zhang, Fan; Wang, Wenzhao; Li, Jinyang; Guo, Liangdong et al. (2014): Identification of the first diphenyl ether gene cluster for pestheic acid biosynthesis in plant endophyte *Pestalotiopsis fici*. In: *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 15 (2), S. 284–292. DOI: 10.1002/cbic.201300626.

Xu, Xiuli; Yang, Haijin; Xu, Huitao; Yin, Liyuan; Chen, Zhengkun; Shen, Huihui (2018): Diphenyl ethers from a marine-derived isolate of *Aspergillus* sp. CUGB-F046. In: *Natural product research* 32 (7), S. 821–825. DOI: 10.1080/14786419.2017.1363754.

Yang, Beiye; Tong, Qingyi; Lin, Shuang; Guo, Jieru; Zhang, Jinwen; Liu, Junjun et al. (2019): Cytotoxic butenolides and diphenyl ethers from the endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. In: *Phytochemistry Letters* 29, S. 186–189. DOI: 10.1016/j.phytol.2018.11.021.

Yang, Guohua; Yun, Keumja; Nenkep, Viviane N.; Choi, Hong Dae; Kang, Jung Sook; Son, Byeng Wha (2010): Induced production of halogenated diphenyl ethers from the marine-derived fungus *Penicillium chrysogenum*. In: *Chemistry & biodiversity* 7 (11), S. 2766–2770. DOI: 10.1002/cbdv.201000067.

Zhang, Li-Hua; Feng, Bao-Min; Zhao, Yu-Qing; Sun, Yi; Liu, Bing; Liu, Fang et al. (2016): Polyketide butenolide, diphenyl ether, and benzophenone derivatives from the fungus *Aspergillus flavipes* PJ03-11. In: *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 26 (2), S. 346–350. DOI: 10.1016/j.bmcl.2015.12.009.



Zhang, Ya-Hui; Hou, Xue-Mei; Yu, Mei-Lin; Wang, Chang-Yun (2019a): Secondary Metabolites and their Bioactivities from the Gorgonian-Derived Fungus *Aspergillus versicolor*. In: *Chem Nat Compd* 55 (2), S. 327–330. DOI: 10.1007/s10600-019-02680-0.

Zhang, Yi; Li, Xiao-Ming; Shang, Zhuo; Li, Chun-Shun; Ji, Nai-Yun; Wang, Bin-Gui (2012): Meroterpenoid and diphenyl ether derivatives from *Penicillium* sp. MA-37, a fungus isolated from marine mangrove rhizospheric soil. In: *Journal of natural products* 75 (11), S. 1888–1895. DOI: 10.1021/np300377b.

Zhang, Yingxiao; Malzahn, Aimee A.; Sretenovic, Simon; Qi, Yiping (2019b): The emerging and uncultivated potential of CRISPR technology in plant science. In: *Nature plants* 5 (8), S. 778–794. DOI: 10.1038/s41477-019-0461-5.

Zhao, Huan; Wang, Gao-Qian; Tong, Xu-Peng; Chen, Guo-Dong; Huang, Yuan-Fan; Cui, Jia-Yu et al. (2014): Diphenyl ethers from *Aspergillus* sp. and their anti- $A\beta_{42}$  aggregation activities. In: *Fitoterapia* 98, S. 77–83. DOI: 10.1016/j.fitote.2014.07.007.

Zheng, Cai-Juan; Liao, Hai-Xia; Mei, Rong-Qing; Huang, Guo-Lei; Yang, Lu-Jia; Zhou, Xue-Ming et al. (2019): Two new benzophenones and one new natural amide alkaloid isolated from a mangrove-derived Fungus *Penicillium citrinum*. In: *Natural product research* 33 (8), S. 1127–1134. DOI: 10.1080/14786419.2018.1460832.

Zhuge, X. L.; Yang, H. L. (2021): Crystal structure of a glutathione S-transferase mutant SbGSTU7(T53I) from *Salix babylonica*.

Zhuravleva, O. I.; Kirichuk, N. N.; Denisenko, V. A.; Dmitrenok, P. S.; Yurchenko, E. A.; Min'ko, E. M. et al. (2016): New Diorcinol J Produced by Co-Cultivation of Marine Fungi *Aspergillus sulphureus* and *Isaria felina*. In: *Chem Nat Compd* 52 (2), S. 227–230. DOI: 10.1007/s10600-016-1601-z.

Zybilov, Boris; Rutschow, Heidi; Friso, Giulia; Rudella, Andrea; Emanuelsson, Olof; Sun, Qi; van Wijk, Klaas J (2008): Sorting signals, N-terminal modifications and abundance of the chloroplast proteome. In: *PLoS one* 3 (4), e1994. DOI: 10.1371/journal.pone.0001994.

## 6 Anhang

## 6.1 Oligomere

**Tabelle 6-1: In der Arbeit verwendete Primer für die Klonierung, Genotypisierung und Sequenzierung**

Primer	Sequenz (5' – 3')	Genlokus	Beschreibung
<b>GST-Klonierung</b>			
U5_Q82H_for	GATGAGACTTGGCCACACAATCCAATTCT CCCTC	At2g29450	
U5_Q82H_rev	GAGGGAGAATTGGATTGTGTGGCCAAGT CTCATC	At2g29450	
U5_A96T_for	CTTATGAAAGATCCAAAACCTGTTTCTTTG CTAAAC	At2g29450	
U5_A96T_rev	GTTTAGCAAAGAAACGAGTTTTGGATCTT TCATAAG	At2g29450	
U5_V130E_for	GTTTTAGCCGAGCAGGAAAGAGAACTGA TTATG	At2g29450	
U5_V130E_rev	CATAATCAGTTCTCTTCCTGCTCGGCTAA AAC	At2g29450	
U5_R192K_for	GTTCAAGAGATGGGTTAAGAATTTGGAG AAGGTTG	At2g29450	
U5_R192K_rev	CAACCTTCTCCAAATTCTTAACCCATCTCTT GAAC	At2g29450	
AlGSTU5_BamHI	TATATAGGATCCATGGCGGAGAAAGACC AAGTG	ARALYDRAFT _481861	
<b>Genotypisierung von GST-Knock-Outs</b>			
Seq_U1_E1_for	GACAAAGAGAAAGCAAATGGTCC	At2g29490	
Seq_U1_E1_rev	GCAAATCAATATTAGTATACCTGG	At2g29490	
Seq_U1_E2_for	GTTCTTTACTTGCAGATCCTAACACTAGG G	At2g29490	
Seq_U1_E2_rev	TTAGGCAGACTTAATTGTCTCTGC	At2g29490	
Seq_U2_E1_for	GACAGAGAGAGTCAGAGAGAG	At2g29480	
Seq_U2_E1_rev	GTTAGACTAGAGTACCTGCTC	At2g29480	
Seq_U2_E2_for	CAGATCCTACCAGTTGGCTTCATGC	At2g29480	
Seq_U2_E2_rev	TTAGAACGTAGACTTAGCTCTCTC	At2g29480	
Seq_U3_E1_for	GACTTTTCCTTTCTTTATGCC	At2g29470	
Seq_U3_E1_rev	CTATAAATAACATCTGCAATGAG	At2g29470	
Seq_U3_E2_for	GGTCACAATGATAGGGCTCAGGTC	At2g29470	
Seq_U3_E2_rev	CTCTTAGACCGCTTTGATTGCTCC	At2g29470	
Seq_U4_E2_for	GGTTGGACCAGTAGCTTTTATGTC	At2g29460	
Seq_U4_E2_rev	CTCTTAGGCTGATTTGATTCTTTC	At2g29460	
Seq_U5_E2_for	GCGATTATATGTCTCTGTCATTG	At2g29450	

Primer	Sequenz (5' – 3')	Genlokus	Beschreibung
Seq_U5_E2_rev	CCATACAAACATTGCATGATC	At2g29450	
Seq_U6_E1_for	CGTCGTCGTTTGCAAAAACGAC	At2g29440	
Seq_U6_E1_rev	GAAATGACTACTTCCATGTAC	At2g29440	
Seq_U6_E2_for	GATAGTAAATGTGGGATTTGCCTC	At2g29440	
Seq_U6_E2_rev	GCTATGAAAGATGCATTATCTTCTG	At2g29440	
U7_for	GAACATATGGCTCGATTCTGGTC	At2g29420	
U7_rev	AGATGCTCATCTTCAGGAGGAA	At2g29420	
U19_for	ATTGAGGGAGAAAGGTGTTGAA	At1g78380	
U19_rev	GTGTAGAATCCAATCAACGCAA	At1g78380	
U22_E1_for	GACATCAGCATCGCATACAAAT	At1g78340	
U22_E2_rev	GAAACGTAACGTGAGATGAAATTCT	At1g78340	
U23_for	TTCACAAGAAGATTCCGGTTTT	At1g78320	
U23_rev	TGACAAACTTGAAATACACGCC	At1g78320	
U28_E1_for	ATGGTTTTGGCTAGTGCTTTGT	At1g53680	
U28_E1_rev	CAAACCGAAACAGAAACAGATG	At1g53680	
U28_E2_for	TTGATCAAATTCACCAAATGC	At1g53680	
U28_E2_rev	TGCCAAAACAAAGAAAAGACAA	At1g53680	
<b>qPCR-Primer</b>			
GSTU28_qPCR_for	GGTTCTGGGCTGATTACGCT	At1g53680	
GSTU28_qPCR_rev	ACCACATTTCTCGAGTGCGT	At1g53680	
GG-basiertes CRISPR/Cas-System			
LII_2-CCAG_for	GGTTGGGGTCTCATGTCCCAGTTGTCTTC GGGG		
LII_2-CCAG_rev	CCGCTACCCCGAAGACAACCTGGGACATGA GACC		
LII_3-TTGC_for	GGTTGGGGTCTCATGTCTTGCTTGTCTTC GG		
LII_3-TTGC_rev	CCGCTACCCCGAAGACAAGCAAGACATG AGACC		
LII_CCAG-3_for	CTCGACCCGAAGACAACCAGGCGGTGAG ACC		
LII_CCAG-3_rev	CTTGTGGTCTCACCGCCTGGTTGTCTTCGG G		
LII_TTGC-4_for	GCTTATCTCGACCCGAAGACAATTGCGCG GTGAGACC		
LII_TTGC-4_rev	CAAACCTGTGGTCTCACCGCGCAATTGTC TTCGGG		
pDD45_A-B_for	ATGAAGACTTTACGGGTCTCAGCGGAATG GTTATAATATATAGCTT		
pDD45_A-B_rev	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACAGATATT CTTCTTTTTGGGGTTT		

Primer	Sequenz (5' – 3')	Genlokus	Beschreibung
pDD45_A-C_rev	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCAGGTGTATT CTTCTTTTTGGGGTTT		
pU4_A-B_for	ATGAAGACTTTACGGGTCTCAGCGGAAA AATTACGGATATGAATATAGGC		
pU4_A-B_rev	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACAGAGCTG CACATACATAACATATC		
pU4_A-C_rev	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCAGGTGGCT GCACATACATAACATATC		
<i>SpCas9</i> _C-D_for	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGG ACAAGAAGTACTCCATTGGGCTCG		
<i>SpCas9</i> _C-D_rev	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTTCAC ACCTTCCTCTTCTTGGGGTC		
<i>SaCas9</i> -GFP_C-D_rev	CCGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTCTTG TACAGCTCGTCCATGCCG		
<i>SaCas9</i> _C-D_NS_rev	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTAACC TTCCTCTTCTTCTTAGG		
<i>SaCas9</i> _D10A_for	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGA AGAGGAECTACATCCTCGGACTCGCTATC GG		
<i>SaCas9</i> _H557A_for	ATGAAGACTTGCCATCATCCCTAGATCTG TGTCTTTCG		
<i>SaCas9</i> _H557A_rev	ATGAAGACTTTGGCATCCACTTCGTAGTT GAAAGGG		
<i>SpCas9</i> _D10A_for	GGCGAAGACGGTACGGGTCTCACACCAT GGACAAGAAGTACTCCATTGGGCTCGAA ATCGGC		
<i>SpCas9</i> _H840A_for	TACGAAGACGATGCTATCGTGCCCCAGTC TTTTC		
<i>SpCas9</i> _H840A_rev	TGGGAAGACATAGCATCCACGTCGTAGTC GGAGAGCCG		
<i>SpCas9</i> _nS_C-D_rev	CGGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTCACC TTCCTCTTCTTGGGGTCAGCC		
<i>SpCas9</i> _D10A_2_for	CCAGAAGACTCGCAATCGGCACAAACAG CGTCGGCTGGGCCGTC		
<i>SpCas9</i> _D10A_2_rev	GTTTGAAGACGATTGCGAGCCCAATGGA GTACTTCTGTCCATGG		
<i>SpCas9</i> _D1135E_for	CGGAAGACTCGAATCTCCTACAGTCGCTT ACAGTGTACTGG		
<i>SpCas9</i> _D1135E_rev	CTGAAGACGCATTCTGAATCCGCCGTATTT CTTGGGGTCCC		
<i>SpCas9</i> _D1135V_for	CGGAAGACTCGTTTCTCCTACAGTCGCTT ACAGTGTACTGG		
<i>SpCas9</i> _D1135V_rev	CTGAAGACGCAAACGAATCCGCCGTATTT CTTGGGGTCCC		

Primer	Sequenz (5' – 3')	Genlokus	Beschreibung
<i>Sp</i> Cas9_RQ_RR_for	GAAGAAGACACAGGTCTACAAAGGAGGT CCTGGACGCC		
<i>Sp</i> Cas9_RQ_RR_rev	CCTCGAAGACAGACCTGTACTGCTTTCTG TCTATGGTGGTGTCG		
<i>Sa</i> Cas9_E782K_for	GAAGGAAGACAGAAAGCTTATCAACGAT ACCCTCTAC		
<i>Sa</i> Cas9_E782K_rev	TCGGAAGACAGCTTTCTGTTTGGCTTCTTA TCCAC		
<i>Sa</i> Cas9_N968K_for	CTTGAAGACACAAGAACGATCTTATCAAG ATT		
<i>Sa</i> Cas9_N968K_rev	GATGAAGACGTTCTTGTAGAATGAAGCA ATGA		
<i>Sa</i> Cas9_R1015H_for	AAGGAAGACCCTCACATCATCAAGACTAT CGCTTC		
<i>Sa</i> Cas9_R1015H_rev	GTCGAAGACATGTGAGGAGGCCTTATC GTTC		
pU6_A-ATTG_for	ATGAAGACTTTACGGGTCTCAGCGGCTTT TTTTCTTCTTCTTCGTTT		
pU6_A-ATTG_rev	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACAATCACT ACTTCGACTCTAGCTG		
trRNA_ <i>Sp</i> _for	ATGAAGACTTTACGGGTCTCAGTTTTAGA GCTAGAAATAGCA		
trRNA_ <i>Sp</i> _rev	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCAGACAAAAA AAAAGCACCGACTCGGT		
trRNA_ <i>Sa</i> _for	ATGAAGACTTTACGGGTCTCAGTTTTAGT ACTCTGGAAACAG		
trRNA_ <i>Sa</i> _rev	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCAGACAAAAA ATCTCGCCAACAAGTTGACG		
ocsT_D-G_for	ATGAAGACTTTACGGGTCTCAAAGGGTCC TGCTTTAATGAGATATGCGAG		
ocsT_D-G_rev	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCAGACAGTCC TGCTGAGCCTCGACATGTTGTGCG		
ocsT_E-G_for	ATGAAGACTTTACGGGTCTCAAATCGTCC TGCTTTAATGAGATATGCGAG		
Tpea3A_D-G_for	ATGAAGACTTTACGGGTCTCAAAGGCAG GCCTCCCAGCTTTCGTCCG		
Tpea3A_D-G_rev	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCAGACAAAGC CTATACTGTACTTAAT		
Tpea3A_E-G_for	ATGAAGACTTTACGGGTCTCAAATCCAGG CCTCCCAGCTTTCGTCCG		
SRDX_B-C_for	ATGAAGACTTTACGGGTCTCATCTGAACA ATGCTGGACCTGGACCTGGAGCTG		
SRDX_B-C_rev	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCAGGTGCCG GCGAAGCCCAGGCGCAGCTC		

Primer	Sequenz (5' – 3')	Genlokus	Beschreibung
SRDX_C-D_for	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGC TGGACCTGGACCTGGAGCTG		
SRDX_C-D_rev	CCTCGAAGACATCAGAGGTCTCTCCTTGG CGAAGCCCAGGCGCAGCTCCAGG		
<b>Homologe Rekombination</b>			
pFlu-Bsal-F1	ATGGTCTCAGCGGAGTACTGTACCGGGCC CCCCC		
pFlu-Bsal-R3	ATGGTCTCAGACACACTAAAGAAAGCTCT CTGAG		
pFlu-Bsal-F2	ATGGTCTCATGACCCAGAAAATCGGAAAA G		
pFlu-Bsal-R1	TAGGTCTCTGTCATCTTACTTTAAAGTGAA		
pFlu-Bsal-F3	ATGGTCTCACACTCCGCTGAGACAAAGAC A		
pFlu.Bsal-R2	TAGGTCTCTAGTGTCTACTGGAGCGGAG G		
FluC-Bsal-F1	ATGGTCTCAGCGGATGGCGGCGCTTATCC GGTGT		
FluC-Bsal-R2	ATGGTCTCAGACAAAGCTCCACCGCGGTG GCGGC		
FluC-Bsal-F2	ATGGTCTCAATCACAGCCTAAGGAGCGAC A		
FluC-Bsal-R1	TAGGTCTCTTGATGACGAATGTATAATTTT		
Seq_LII_Flu_for	GCGGCCGCTACCCCGAAGACA		
Seq_LII_Flu_rev	CCCAAGCTTATCTCGACCCGA		
Seq_LII_FluC_E4_rev	CCTCTGCCGAGCAAGCAACCC		
Seq_LII_FluC_E4_for	GGGTTGCTTGCTCGGCAGAGG		
FluC-Bsal-R2-2	ATGGTCTCAGACATGCATCAACAGGGTCA ACACCC		
pFlu_Bsal_rec_rev	TAGGTCTCTATCACTAAAGAAAGCTCTCT GAGAGG		
FluC_Bsal_rec_for	ATGGTCTCATGATGGCGGCGCTTATCCGG TGTTGCTCC		
FluC_Bsal_In3_rev	ATGGTCTCAGACAACCCTGATTTGGTACA CCACA		
FluC_Bsal_Ex2_for	ATGGTCTCAGCGGGAATCTTACAAACGCC ATTTGCC		
FluC_Bsal_Ex3_rev	ATGGTCTCACCTCCAACGGTGGCTCCAAT AAGAGC		
FluC_Bsal_Ex4_for	ATGGTCTCAGAGGGTTGCTTGCTCGGCAG AGG		
Seq_Flu_rec_1_for	CATAGCTCATTGCTGAATCA		
Seq_Flu_rec_1_rev	TGATTGAGCGAATGAGCTATG		

Primer	Sequenz (5' – 3')	Genlokus	Beschreibung
Seq_Flu_rec_2_for	GGACAGAGATCCACTGAGCTG		
Seq_Flu_rec_2_rev	CAGCTCAGTGGATCTCTGTCC		
FluC_Ex3_rev	ATGGTCTCACCTCCAACGGTGGCTCCAAT AAGAGC		
FluC_Ex4_for	ATGGTCTCAGAGGGTTGCTTGCTCGGCAG AGG		
OLE1_recomb_for_1	ATGAAGACTTTACGGGTCTCAGGCTCTCA TCACAGTTGCACTCCTCATCACCGG		
OLE1_recomb_for_2	TAGAAGACAATGATAGTGCAAGGATGAA GTTGGGAAGCAAAGC		
OLE1_recomb_for_3	TGGGCTAGAAGACAATGGGCACTGATGT CATCGTCATAGTCCAATAACTCC		
OLE1_recomb_rev_1	TAGAAGACAAGGATGCTCTCCCGTTGCGT ACCTATTCAC		
OLE1_recomb_rev_2	AAGCTTAGAAGACAACCCAAAGCTCACTT GTGCCCCAGTTTGCTAGGG		
OLE1_recomb_rev_3	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCAATATGTAC TAATGACTGCATCGGCTTGCG		
OLE1-RFP_cis_for_1	ATGGTCTCAGCGTTTCTAGAATGTCGCGG AAC		
OLE1-RFP_cis_rev_1	ATGGTCTCAGACATCAACTGTCCAATTG TCTGATCCCTGTGGG		
OLE1-RFP_cis_for_2	GAAGGTCTCAGCGTTGACTGTTGCAACA CCTCTGCTCG		
OLE1-RFP_cis_rev_2	TTAGGTCTCAGGATGGCTCTCCCGTTGCG TACCTAT		
OLE1-RFP_cis_for_3	CAGGGTCTCATGATAGTGCAAGGATGAA GTTGGGAAGC		
OLE1-RFP_cis_rev_3	AGAGGTCTCAGACAATAAATGGAGCAA CCT		
OLE1_A-C_rev	ATCGGTCTCACCTTAGTAGTGTGCTGGCC ACCACGAGTACGG		
tOLE_E-G_for	GCAGGTCTCAAATCACCCCACTGATGTCA TCGTCATAGTCC		

**Tabelle 6-2: In der Arbeit verwendete gRNAs für die Klonierung von CRISPR/Cas9 Konstrukten**

Oligomer	Sequenz (5' – 3')	Genlokus	Cas9
gRNA_U1_1_f	attgAAGTGAGAGATATCGAATGG	At2g29490	SpCas9
gRNA_U1_1_r	aaacCCATTTCGATATCTCTCACTT	At2g29490	SpCas9
gRNA_U1_2_f	attgGGGTTTAGCTCCAGAAGCAA	At2g29490	SpCas9

Oligomer	Sequenz (5' – 3')	Genlokus	Cas9
gRNA_U1_2_r	aaacTTGCTTCTGGAGCTAAACCC	At2g29490	<i>SpCas9</i>
gRNA_U7_f	attgGTTTTGGCTGATGAGAACGG	At2g29420	<i>SpCas9</i>
gRNA_U7_r	aaacCCGTTCTCATCAGCCAAAAC	At2g29420	<i>SpCas9</i>
gRNA_U19_1_f	attgGGGTTAAGAAGTGTTCAG	At1g78380	<i>SpCas9</i>
gRNA_U19_1_r	aaacCTGCAAACACTTCTTAACCC	At1g78380	<i>SpCas9</i>
gRNA_U19_2_f	attgGATCGTAACAATGGCGAACG	At1g78380	<i>SpCas9</i>
gRNA_U19_2_r	aaacCGTTCGCCATTGTTACGATC	At1g78380	<i>SpCas9</i>
gRNA_U23_f	attgGTTTCCTAAGCTAATGGCGT	At1g78320	<i>SpCas9</i>
gRNA_U23_r	aaacACGCCATTAGCTTAGGAAAC	At1g78320	<i>SpCas9</i>
gRNA_Sa_U1_for	attgGGGTTTAGCTCCAGAAGCAA	At2g29490	<i>SaCas9</i>
gRNA_Sa_U1_rev	aaacTTGCTTCTGGAGCTAAACCC	At2g29490	<i>SaCas9</i>
gRNA_Sa_U1#2_for	attgTACTTGCAGATCCTAACAC	At2g29490	<i>SaCas9</i>
gRNA_Sa_U1#2_rev	aaacGTGTTAGGATCTGCAAGTAA	At2g29490	<i>SaCas9</i>
gRNA_Sa_U2_for	attgCAAGAAGTAAAGTGCTCTTT	At2g29480	<i>SaCas9</i>
gRNA_Sa_U2_rev	aaacAAAGAGCACTTACTTCTTG	At2g29480	<i>SaCas9</i>
gRNA_Sa_U2#2_for	attgAGGGGCATGAAGCCAAGTGG	At2g29480	<i>SaCas9</i>
gRNA_Sa_U2#2_rev	aaacCCAGTTGGCTTCATGCCCT	At2g29480	<i>SaCas9</i>
gRNA_Sa_U3_for	attgATTCAATGGCCGAGAAAGAA	At2g29470	<i>SaCas9</i>
gRNA_Sa_U3_rev	aaacTTCTTTCTCGGCCATTGAAT	At2g29470	<i>SaCas9</i>
gRNA_Sa_U5_for	attgAAGTTTCCAGAGTTCAAGAG	At2g29450	<i>SaCas9</i>
gRNA_Sa_U5_rev	aaacCTCTTGAAGTCTGGAACTT	At2g29450	<i>SaCas9</i>
gRNA_Sa_U5#2_for	attgCTTTCATAAGGATCTTGAGG	At2g29450	<i>SaCas9</i>
gRNA_Sa_U5#2_rev	aaacCCTCAAGATCCTTATGAAAG	At2g29450	<i>SaCas9</i>
gRNA_Sa_U6_for	attgAAGTTTCCAGAATATAACAA	At2g29440	<i>SaCas9</i>
gRNA_Sa_U6_rev	aaacTTGTTATATTCTGGAACTT	At2g29440	<i>SaCas9</i>
gRNA_Sa_U7_for	attgAAGTTCCCGGAGATACATAG	At2g29420	<i>SaCas9</i>
gRNA_Sa_U7_rev	aaacCTATGTATCTCCGGAACTT	At2g29420	<i>SaCas9</i>
gRNA_Sa_U10_1_for	attgGAAAGGGCCCAGGTCCGGTT	At1g74590	<i>SaCas9</i>
gRNA_Sa_U10_1_rev	aaacAACCGGACCTGGGCCCTTTC	At1g74590	<i>SaCas9</i>
gRNA_Sa_U10_2_for	attgTGGGTCAAGTCATGTCCCAG	At1g74590	<i>SaCas9</i>
gRNA_Sa_U10_2_rev	aaacCTGGGACATGACTTGACCCA	At1g74590	<i>SaCas9</i>
gRNA_Sa_U19_for	attgGTAAGGATCAGAAGGAAGGA	At1g78380	<i>SaCas9</i>
gRNA_Sa_U19_rev	aaacTCCTTCTTCTGATCCTTAC	At1g78380	<i>SaCas9</i>
gRNA_Sa_U23_for	attgGTAAGGATCTGAAGGAAGAA	At1g78320	<i>SaCas9</i>
gRNA_Sa_U23_rev	aaacTTCTTCTTCAGATCCTTAC	At1g78320	<i>SaCas9</i>



## 6.2 Mikroorganismen

**Tabelle 6-3: *E. coli*-Stämme mit pflanzlichen GSTs die im Zuge der Arbeit erzeugt und verwendet wurden**  
 Mit (\*) Stämme wurden im Zuge dieser Arbeit generiert

Gen	Lokus	Nummer in der Stammsammlung pSH62-Vektor
<i>AtGSTF2</i>	At4g02520	2484
<i>AtGSTF3</i>	At2g02930	2497
<i>AtGSTF4</i>	At1g02950	2493
<i>AtGSTF5</i>	At1g02940	4942
<i>AtGSTF6</i>	At1g02930	2517
<i>AtGSTF7</i>	At1g02920	4703
<i>AtGSTF8</i>	At2g47730	2520
<i>AtGSTF9</i>	At2g30860	2494
<i>AtGSTF10</i>	At2g30870	2521
<i>AtGSTF11</i>	At3g03190	2506
<i>AtGSTF12</i>	At5g17220	4692
<i>AtGSTF13</i>	At3g62760	4943
<i>AtGSTF14</i>	At1g49860	2508
<i>AtGSTU1</i>	At2g29490	2496
<i>AtGSTU2</i>	At2g29480	2491
<i>AtGSTU3</i>	At2g29470	2507
<i>AtGSTU4</i>	At2g29460	2514
<i>AtGSTU5</i>	At2g29450	2501
<i>AtGSTU5 Q82H</i>	At2g29450	9766 *
<i>AtGSTU5 A96T</i>	At2g29450	9767 *
<i>AtGSTU5 V130E</i>	At2g29450	9768 *
<i>AtGSTU5 R192K</i>	At2g29450	9769 *
<i>AtGSTU6</i>	At2g29440	2526
<i>AtGSTU7</i>	At2g29420	2502
<i>AtGSTU8</i>	At3g09270	4696
<i>AtGSTU9</i>	At5g62480	4934
<i>AtGSTU10</i>	At1g74590	2516
<i>AtGSTU11</i>	At1g69930	2503
<i>AtGSTU12</i>	At1g69920	2515
<i>AtGSTU13</i>	At1g27130	2504
<i>AtGSTU14</i>	At1g27140	4944
<i>AtGSTU15</i>	At1g59670	2510
<i>AtGSTU16</i>	At1g59700	2512
<i>AtGSTU17</i>	At1g10370	2505
<i>AtGSTU18</i>	At1g10360	2519

Gen	Lokus	Nummer in der Stammsammlung pSH62-Vektor
AtGSTU19	At1g78380	2485
AtGSTU20	At1g78370	4691
AtGSTU21	At1g78360	4805
AtGSTU22	At1g78340	2511
AtGSTU23	At1g78320	2518
AtGSTU24	At1g17170	2492
AtGSTU25	At1g17180	2498
AtGSTU26	At1g17190	2513
AtGSTU27	At3g43800	2527
AtGSTU28	At1g53680	4935
AtGSTZ1	At2g02390	2499
AtGSTZ2	At2g02380	4938
AtGSTT1	At5g41210	2509
AtGSTT2	At5g41240	2495
AtGSTT3	At5g41220	5083
AtGSTL1	At5g02780	4941
AtGSTL2	At3g55040	4940
AtGSTL3	At5g02790	2530
AtDHAR1	At1g19570	5750
AtDHAR2	At1g75270	5751
AtDHAR3	At5g16710	2522
AtDHAR4	At5g36270	4939
AtTCHQD	At1g77290	4803
AtMAPEG	At1g65820	4804
A/GSTU5	B2BXJ3	9770 *

**Tabelle 6-4: E. coli-Stämme mit Konstrukten für CRISPR/Cas die im Zug der Arbeit erzeugt und verwendet wurden**

Mit (†) versehene Gen-IDs entsprechen Einträgen auf der Webseite [addgene.org](http://addgene.org).

Mit (\*) gekennzeichnete Stämme wurden im Zuge dieser Arbeit generiert.

Konstrukt	Gen-ID (Addgene-ID <sup>†</sup> )	Nummer in der Stammsammlung	Bemerkung
<b>pDGE-System</b>			
pDGE5	79461 <sup>†</sup>	7643	(Ordon et al. 2017)
pDGE6	79476 <sup>†</sup>	7644	(Ordon et al. 2017)
pDGE7	79462 <sup>†</sup>	7645	(Ordon et al. 2017)
pDGE8	79463 <sup>†</sup>	7646	(Ordon et al. 2017)
pDGE9	79465 <sup>†</sup>	7647	(Ordon et al. 2017)

Konstrukt	Gen-ID (Addgene-ID <sup>†</sup> )	Nummer in der Stammsammlung	Bemerkung
pDGE10	79466 <sup>†</sup>	7648	(Ordon et al. 2017)
pDGE11	79467 <sup>†</sup>	7649	(Ordon et al. 2017)
pDGE12	79469 <sup>†</sup>	7650	(Ordon et al. 2017)
pDGE13	79471 <sup>†</sup>	7651	(Ordon et al. 2017)
pDGE14	79473 <sup>†</sup>	7652	(Ordon et al. 2017)
pDGE15	79474 <sup>†</sup>	7653	(Ordon et al. 2017)
pDGE2	79441 <sup>†</sup>	7654	(Ordon et al. 2017)
pDGE144	79448 <sup>†</sup>	7661	(Ordon et al. 2017)
<b>Promotoren des GG-basierten Systems</b>			
LI_pU4_A-C		8997*	
LI_DD45_A-B		8998*	Eizellspezifischer Promotor
LI_DD45_A-C		8999*	Eizellspezifischer Promotor
LI_pU6_A-ATTG		9005*	Expression der sgRNA
LI_pU4_A-B		9618*	
<b>Terminatoren des GG-basierten Systems</b>			
LI_Tpea3A_D-G		9002*	
LI_ocsT_D-G		9003*	
LI_ocsT_E-G		9004*	
<b>tracrRNAs des GG-basierten Systems</b>			
LI_tracrRNA_Sa_GTTT-G		9008*	
LI_tracrRNA_Sp_GTTT-G		9009*	
LI-Cas13_gRNA		9579*	
LI_peg-tracrRNA_Sa		9621*	
LI_peg-tracrRNA_Sp		9622*	
LI_peg-tracrRNA_Sp_lcaZ		9623*	
<b>Cas-Gene des GG-basierten Systems</b>			
LI_SaCas9_C-D	J7RUA5	9000*	
LI_SpCas9_C-D	Q99ZW2	9001*	
LI_nSpCas9_D10A_C-D	Q99ZW2	9348*	Nickase (Jinek et al. 2012)
LI_nSpCas9_H840A_C-D	Q99ZW2	9349*	Nickase (Jinek et al. 2012)
LI_dSpCas9_C-D	Q99ZW2	9350*	Dead Version
LI_SpCas9_V_C-D	Q99ZW2	9351*	(Kleinstiver et al. 2015b)
LI_SpCas9_E_C-D	Q99ZW2	9352*	(Kleinstiver et al. 2015b)
LI_SpCas9_QR_C-D	Q99ZW2	9353*	(Kleinstiver et al. 2015b)
LI_SpCas9_VQR_C-D	Q99ZW2	9354*	(Kleinstiver et al. 2015b)

Konstrukt	Gen-ID (Addgene-ID <sup>†</sup> )	Nummer in der Stammsammlung	Bemerkung
LI_SpCas9_EQR_C-D	Q99ZW2	9355*	(Kleinstiver et al. 2015b)
LI_SaCas9_nS_C-D	J7RUA5	9356*	Kein Stop-Codon
LI_dSaCas9_C-D	J7RUA5	9357*	Dead Version
LI_SaCas9_KKH_C-D	J7RUA5	9358*	(Kleinstiver et al. 2015a)
LI_Cas13_C-D	109049 <sup>‡</sup>	9581*	
LI_nSaCas9_H557A_C-D	J7RUA5	9614*	Nickase (Jinek et al. 2012)
LI_nSaCas9_KKH_H557A_C-D	J7RUA5	9615*	Nickase (Jinek et al. 2012; Kleinstiver et al. 2015a)
LI_nSpCas9_VQR_H840A_C-D	Q99ZW2	9616*	Nickase (Jinek et al. 2012; Kleinstiver et al. 2015b)
LI_nSpCas9_EQR_H840A_C-D	Q99ZW2	9617*	Nickase (Jinek et al. 2012; Kleinstiver et al. 2015b)
LI_dSaCas9:SRDX_C-D	J7RUA5	9619*	Repressionskonstrukt
LI_dSpCas9_SRDX_C-D	Q99ZW2	9620*	Repressionskonstrukt
LI_SaCas9:GFP_C-D	J7RUA5	9736*	
<b>N- und C-terminale Elemente</b>			
LI_SRDX_B-C		9612*	
LI_SRDX_D-E		9613*	
LI_RT:NLS_D-E		9735*	
LII-Vektorbackbone			
LIIc_2-CCAG_ccdB		9044*	
LIIc_CCAG-3_ccdB		9045*	
LIIc_3-TTGC_ccdB		9046*	
LIIc_TTGC-4_ccdB		9047*	
<b>LII-Elemente für die Cas-Protein Expression</b>			
LIIc_4-5_pU4:: SaCas9-Tpea3A		9010*	
LIIc_4-5_DD45:: SaCas9-ocsT		9011*	
LIIc_4-5_35S:: SaCas9-nosT		9012*	
LIIc_4-5_35S+S1:: SaCas9-nosT		9013*	
LIIc_4-5_DD45:: SaCas9C15G-ocsT		9014*	

Konstrukt	Gen-ID (Addgene-ID <sup>†</sup> )	Nummer in der Stammsammlung	Bemerkung
LIIc_4-5_DD45:: <i>SpCas9</i> -ocsT		9015*	
LIIc_4-5_35S:: <i>SpCas9</i> -nosT		9016*	
LIIc_F_4-5_pU4:: NLS: <i>SaCas9</i> :NLS-Tpea3A		9084*	
LIIβ_F_4-5_DD45:: NLS: <i>SaCas9</i> :NLS-ocsT		9085*	
LIIc_4-5_DD45:: NLS: <i>SpCas9</i> :NLS		9360*	
LIIc_4-5_DD45:: <i>SaCas9</i> _KKH		9361*	
LIIc_4-5_DD45:: NLS: <i>SaCas9</i> _KKH:NLS		9362*	
LIIc_4-5_35S+S1:: NLS: <i>SaCas9</i> :NLS		9363*	
LIIc_4-5_35S+S1:: NLS: <i>SpCas9</i> :NLS		9364*	
LIIc_4-5_35S+S1:: <i>SaCas9</i> _KKH		9365*	
LIIc_4-5_35S+S1:: NLS: <i>SaCas9</i> _KKH:NLS		9366*	
LIIc_3-4_pU4:: d <i>SpCas9</i> :SRDX		9371*	
LIIc_3-4_pU4:: GFP:d <i>SpCas9</i> :SRDX		9372*	
LIIc_3-4_pLexA+35Smin:: d <i>SpCas9</i> :SRDX		9373*	
LIIc_3-4_pLexA+35Smin:: GFP:d <i>SpCas9</i> :SRDX		9374*	
LIIc_4-5_pU4::XVE		9375*	
LII_β_F_4-5-35S+S1:: NLS:Cas13:NLS		9582*	
LII_β_F_4-5-pGAL1:: NLS:Cas13:NLS		9583*	
LII_β_F_4-5-pTDH3:: NLS:Cas13:NLS		9584*	
LIIβ_4-5_DD45::		9625*	

Konstrukt	Gen-ID (Addgene-ID <sup>†</sup> )	Nummer in der Stammsammlung	Bemerkung
NLS:dSpCas9:RT:NLS			
LIIβ_4-5_pGal1::		9625*	
NLS:dSpCas9:SRDX			
LIIβ_4-5_pGal1::		9626*	
SRDX:nSpCas9:SRDX			
LIIβ_4-5_pU4::		9627*	
NLS:dSaCas9:SRDX:NLS			
LIIβ_4-5_pLexA+35Smin::		9628*	
NLS:dSaCas9:SRDX:NLS			
LIIβ_4-5_pGC::		9629*	
NLS:dSaCas9:SRDX:NLS			
LIIβ_4-5_pU4::		6930*	
NLS:dSpCas9:SRDX:NLS			
LIIβ_4-5_pLexA+35Smin::		9631*	
NLS:dSpCas9:SRDX:NLS			
LIIβ_4-5_pGC::		9632*	
NLS:dSpCas9:SRDX:NLS			
LIIβ_4-5_DD45::		9749*	
NLS:nSaCas9:RT:NLS			
LIIβ_4-5_DD45::		9750*	
NLS:nSaCas9 <sub>KKH</sub> :RT:NLS			
LIIβ_4-5_DD45::		9751*	
NLS:nSpCas9 <sub>VQR</sub> :RT:NLS			
LIIβ_4-5_DD45::		9752*	
NLS:nSpCas9 <sub>EQR</sub> :RT:NLS			
LIIβ_4-5_pTDH3::		9753*	
NLS:nSaCas9:RT:NLS			
LIIβ_4-5_pTDH3::		9754*	
NLS:nKCas9:RT:NLS			
LIIβ_4-5_pTDH3::		9755*	
NLS:nSaCas9 <sub>KKH</sub> :RT:NLS			
LIIβ_4-5_pTDH3::		9756*	
NLS:nSpCas9 <sub>VQR</sub> :RT:NLS			
LIIβ_4-5_pTDH3::		9757*	
NLS:nSpCas9 <sub>EQR</sub> :RT:NLS			
LIIβ_4-5_pClv3::		9758*	
NLS:dSaCas9:SRDX:NLS			
LIIβ_4-5_pGC::		9759*	

Konstrukt	Gen-ID (Addgene-ID <sup>†</sup> )	Nummer in der Stammsammlung	Bemerkung
NLS:dSaCas9:SRDX:NLS			
LIIβ_4-5_pML1::		9760*	
NLS:dSaCas9:SRDX:NLS			
LIIβ_4-5_pU4::		9761*	
NLS:Cas13:NLS			
LIIβ_4-5_pGC::		9762*	
NLS:Cas13:NLS			
LIIβ_4-5_pML1::		9763*	
NLS:Cas13:NLS			
LIIβ_4-5_pClv3::		9764*	
NLS:Cas13:NLS			
LIIβ_4-5_pCab3::		9765*	
NLS:Cas13:NLS			
<b>LII-Marker</b>			
LIIc_5-6_pUBI10::GUS:nosT		9737*	
<b>LIII-Vektoren</b>			
LIIIβ_E-F_Basta_pU4::		9367*	
dSpCas9:SRDX_pFAST			
LIIIβ_E-F_Basta_pU4::		9368*	
GFP:dSpCas9:SRDX_pFAST			
LIIIβ_E-F_Basta_pLexA+35Smin::		9369*	
dSpCas9:SRDX_pFAST			
LIIIβ_E-F_Basta_pLexA+35Smin::		9370*	
GFP:dSpCas9:SRDX_pFAST			

**Tabelle 6-5: In der Arbeit verwendete GST-exprimierenden *S. cerevisiae* Hefen**

Mit (\*) gekennzeichnete Stämme wurden im Zuge dieser Arbeit generiert

Gen im pSH62-Vektor	Lokus	BY4742 <i>Δtef4, Δgto1, Δgto2, Δgto3, Δcis2, Δcpc, Δcpy</i>
Leervektor		5728
AtGSTF2	At4g02520	5729
AtGSTF3	At2g02930	6018
AtGSTF4	At1g02950	5731
AtGSTF5	At1g02940	5754
AtGSTF6	At1g02930	5716
AtGSTF7	At1g02920	5755

Gen im pSH62-Vektor	Lokus	BY4742
		<i>Δtef4, Δgto1, Δgto2, Δgto3, Δcis2, Δcpc, Δcpy</i>
<i>AtGSTF8</i>	At2g47730	5663
<i>AtGSTF9</i>	At2g30860	5756
<i>AtGSTF10</i>	At2g30870	5717
<i>AtGSTF11</i>	At3g03190	5757
<i>AtGSTF12</i>	At5g17220	6021
<i>AtGSTF13</i>	At3g62760	5758
<i>AtGSTF14</i>	At1g49860	5759
<i>AtGSTU1</i>	At2g29490	5760
<i>AtGSTU2</i>	At2g29480	5761
<i>AtGSTU3</i>	At2g29470	5714
<i>AtGSTU4</i>	At2g29460	5763
<i>AtGSTU5</i>	At2g29450	5730
<i>AtGSTU5 Q82H</i>	At2g29450	9771 * und 9772 *
<i>AtGSTU5 A96T</i>	At2g29450	9773 * und 9774 *
<i>AtGSTU5 V130E</i>	At2g29450	9775 * und 9776 *
<i>AtGSTU5 R192K</i>	At2g29450	9777 * und 9778 *
<i>AtGSTU6</i>	At2g29440	5764
<i>AtGSTU7</i>	At2g29420	5765
<i>AtGSTU8</i>	At3g09270	5766
<i>AtGSTU9</i>	At5g62480	5913
<i>AtGSTU10</i>	At1g74590	5767
<i>AtGSTU11</i>	At1g69930	5768
<i>AtGSTU12</i>	At1g69920	5769
<i>AtGSTU13</i>	At1g27130	5770
<i>AtGSTU14</i>	At1g27140	5771
<i>AtGSTU15</i>	At1g59670	5772
<i>AtGSTU16</i>	At1g59700	5788
<i>AtGSTU17</i>	At1g10370	5789
<i>AtGSTU18</i>	At1g10360	5790
<i>AtGSTU19</i>	At1g78380	5791
<i>AtGSTU20</i>	At1g78370	5792
<i>AtGSTU21</i>	At1g78360	5793
<i>AtGSTU22</i>	At1g78340	5794
<i>AtGSTU23</i>	At1g78320	5795
<i>AtGSTU24</i>	At1g17170	5796
<i>AtGSTU25</i>	At1g17180	5797
<i>AtGSTU26</i>	At1g17190	5798



<b>Gen im pSH62-Vektor</b>	<b>Lokus</b>	<b>BY4742 <i>Δtef4, Δgto1, Δgto2, Δgto3, Δcis2, Δcpc, Δcpy</i></b>
<i>AtGSTU27</i>	At3g43800	5799
<i>AtGSTU28</i>	At1g53680	5601
<i>AtGSTZ1</i>	At2g02390	5800
<i>AtGSTZ2</i>	At2g02380	5939
<i>AtGSTT1</i>	At5g41210	5938
<i>AtGSTT2</i>	At5g41240	6016
<i>AtGSTT3</i>	At5g41220	6017
<i>AtGSTL1</i>	At5g02780	5919
<i>AtGSTL2</i>	At3g55040	5920
<i>AtGSTL3</i>	At5g02790	6015
<i>AtDHAR1</i>	At1g19570	5915
<i>AtDHAR2</i>	At1g75270	5916
<i>AtDHAR3</i>	At5g16710	5917
<i>AtDHAR4</i>	At5g36270	5918
<i>AtTCHQD</i>	At1g77290	5940
<i>AtMAPEG</i>	At1g65820	5941
<i>A/GSTU5</i>	B2BXJ3	9779 * und 9780 *

## 6.3 Pflanzenlinien

**Tabelle 6-6: Verwendete Überexpressions- und Insertionslinien**

Die aufgeführten Überexpressionslinien wurden im Zuge dieser Arbeit generiert. Insertionslinien wurden vom Nottingham Arabidopsis Stock Centre bezogen.

<b>GST-Überexpressionslinie</b>	<b>Gen-Lokus</b>	<b><i>A. thaliana</i> Linie</b>
p35S+S1::AtGSTU28	At1g53680	Col-0
p35S+S1::AtGSTU27	At3g43800	Col-0
p35S+S1::eV		Col-0

<b>T-DNA-Insertionslinie</b>	<b>Gen-Lokus</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b># NASC</b>
gstu4 #6	At2g29460	SALK_143928C	N653527
gstu4 #12	At2g29460	SALK_143928C	N653527
gstu5.1 #5-8	At2g9450	SALK_107148C	N660259
gstu8.2 #2	At3g09270	SALK_150234C	
gstu28	At1g53680	GK-496H02	N447606

**Tabelle 6-7: CIRPSR/Cas-Linien**

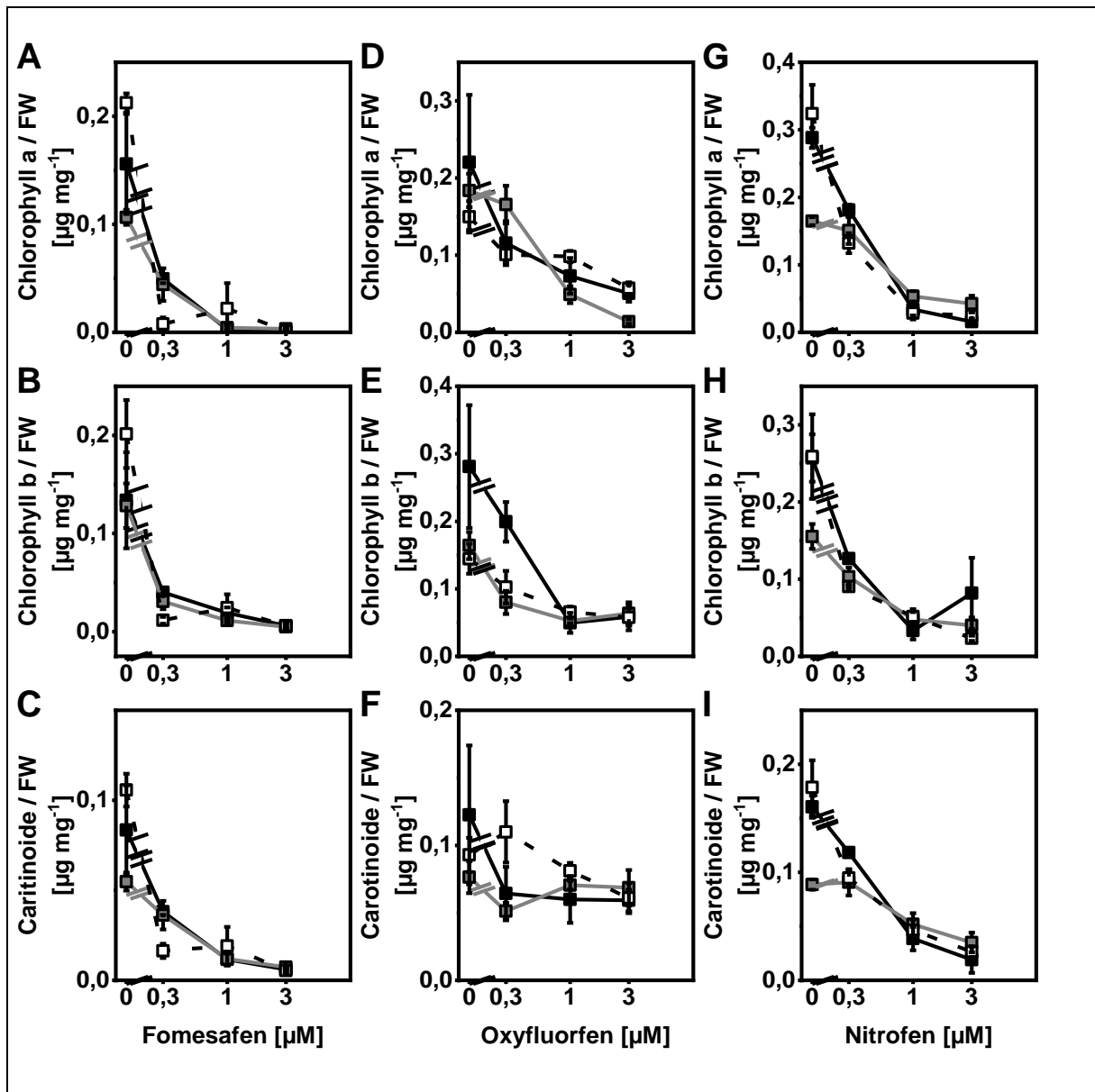
Im Zuge dieser Arbeit wurden mehrere CIRPSR-Linien generiert, die nicht alle Verwendung in dieser Arbeit fanden. Für alle Linien wird neben der Gen-ID aufgeführt welche Gene durch CIRPSR (C) oder durch T-DNA (T) einen Funktionsverlust aufweisen.

<b>Background</b>	<b>CRISPR</b>	<b>Nummer</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Gen-ID</b>
Col-0	CRISPR u1	#2-1	Segregierende Punktmutante	At2g29490 (C)
Col-0	CRISPR u10	#1-18-2	Homozygote Deletionsmutante	At1g74590 (C)
Col-0	CRISPR u22	#1-2-8-3	Segregierende Deletionsmutante	At1g78340 (C)
Col-0	CRISPR u28	#1-3, #1-5, #1-11, #1-17, #1-21	Segregierende Deletionsmutante	At1g53680 (C)
				At2g29450 (C)
				At2g29460 (C)
gstu4 #6	CRISPR u1-u5	#1-6-2	Homozygote Deletionsmutante	Atg29470 (C)
				At2g29480 (C)
				At2g29490 (C)
				At2g29450 (C)
				At2g29460 (C)
gstu4 #12	CRISPR u1-u5	#1-6-3, #1-6-4, #1-6-6, #1-6-7, #1-6-9, 1-6-10	Homozygote Deletionsmutante	At2g29470 (C)
				At2g29480 (C)
				At2g29490 (C)

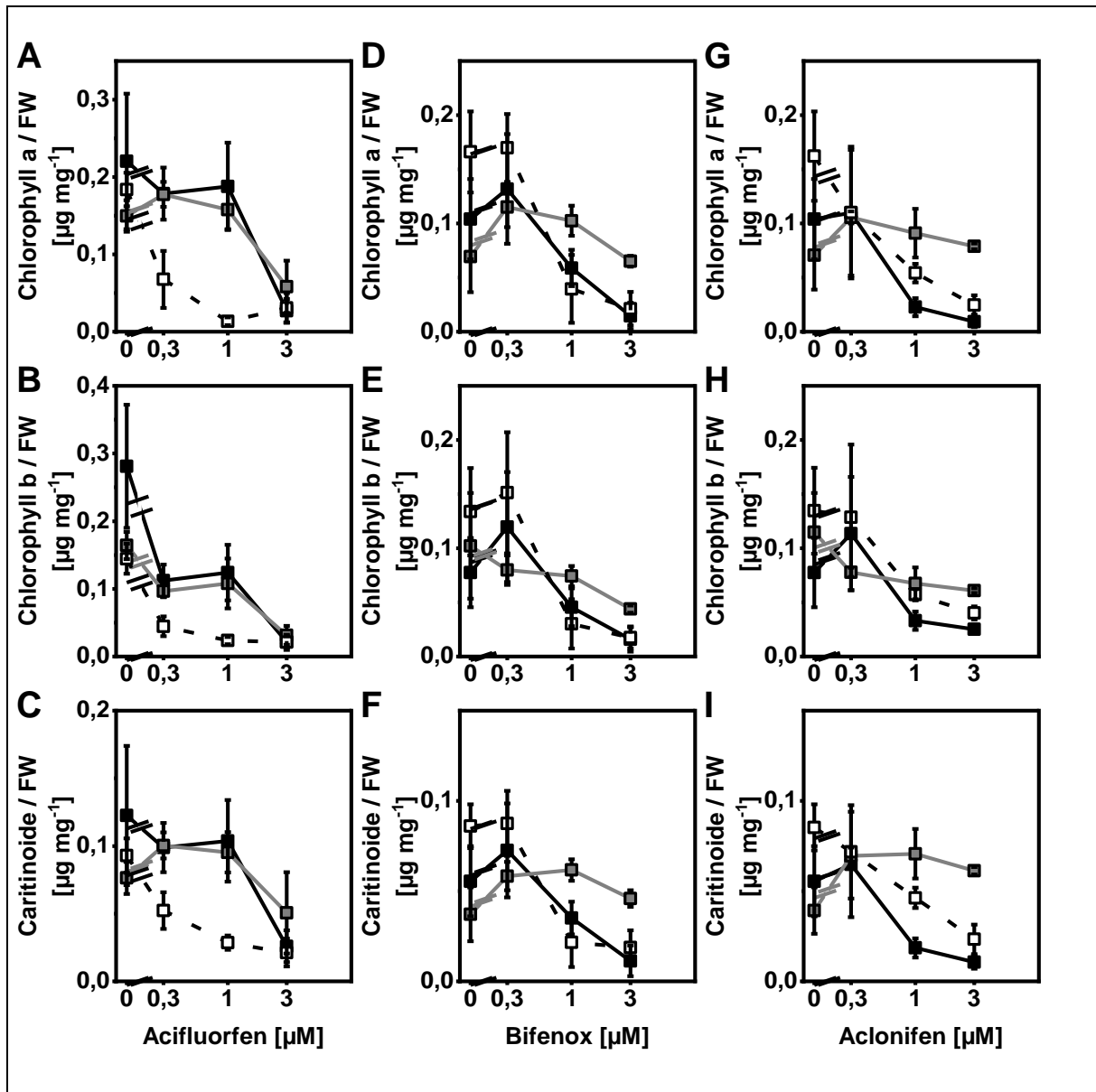
Background	CRISPR	Nummer	Genotyp	Gen-ID
gstu4 #12	CRISPR u2-u5	#2-4-2, #2-4-15	Homozygote Deletionsmutante	At2g29450 (C)
				At2g29460 (C)
				At2g29470 (C)
				At2g29480 (C)
gstu4 #12 CRISPR u1-u5 #1-6-3	CRISPR u10	#1-1, #1-20, #2-12, #2-9	Segregierende Deletionsmutante	At1g74590 (C)
				At2g29450 (C)
				At2g29460 (C)
				At2g29470 (C)
				At2g29480 (C)
gstu4 #12 CRISPR u2-u5 #2-4-2	CRISPR u10	#1-2, #1-4, #1-22	Segregierende Deletionsmutante	At2g29490 (C)
				At1g74590 (C)
				At2g29450 (C)
				At2g29460 (C)
gstu5.1 #5-8	CRISPR u2-u7	#2-1	Segregierende Deletionsmutante	At2g29470 (C)
				At2g29480 (C)
				At2g29420 (C)
				At2g29440 (C)
				At2g29450 (C)
gstu8.2 #2	CRISPR u1-u7	#1-6-2, #1-6-3, #1-6-4, #1-6-6, #1-6-8	Homozygote Deletionsmutante in T-DNA-Linie	At2g29460 (C)
				At2g29470 (C)
				At2g29480 (C)
				At2g29490 (C)
				At3g09270 (T)
				At2g29450 (C)
gstu8.2 # 2	CRISPR u1-u5	#1-9-3, #1-9-6	Homozygote Deletionsmutante in T-DNA-Linie	At2g29460 (C)
				At2g29470 (C)
				At2g29480 (C)
				At2g29490 (C)
				At3g09270 (T)

Background	CRISPR	Nummer	Genotyp	Gen-ID
gstu8.2 #2 CRISPR u1-u7 #1-6-2	CRISPR u10	#1-4, #1-18, #2-7, #2-20	Für GSTU10 segregierende Deletionsmutante	At1g74590 (C)
				At2g29420 (C)
				At2g29440 (C)
				At2g29450 (C)
				At2g29460 (C)
				At2g29470 (C)
				At2g29480 (C)
				At2g29490 (C)
gstu8.2 #2 CRISPR u1-u5 #1-9-3	CRISPR u10	#1-7, #2-5, #2-17	Für GSTU10 segregierende Deletionsmutante	At3g09270 (T)
				At1g74590 (C)
				At2g29450 (C)
				At2g29460 (C)
				At2g29470 (C)
				At2g29480 (C)
				At2g29490 (C)
				At3g09270 (T)
gstu18 #5.6 x gstu5 #10.7	CRISPR u1-u2	#1-2	Segregierende Deletionsmutante	At1g10360 (T)
				At2g29450 (T)
				At2g24980 (C)
gstu18 #5.6 x gstu5 #10.7	CRISPR u1-u7	#2-3	Segregierende Deletionsmutante	At2g29490 (C)
				At1g10360 (T)
				At2g29420 (C)
				At2g29440 (C)
				At2g29450 (T/C)
				At2g29460 (C)
				At2g29470 (C)
				At2g29480 (C)
At2G29490 (C)				
gstu18 #5.6 x gstu5 #10.7	CRISPR u2-u7	#1-1	Segregierende Deletionsmutante	At1g10360 (T)
				At2g29420 (C)
				At2g29440 (C)
				At2g29450 (T/C)
				At2g29460 (C)
				At2g29470 (C)
At2g29480 (C)				

Background	CRISPR	Nummer	Genotyp	Gen-ID
gstu18 #5.6 x gstu5 #10.7	CRISPR u22	#1-1-8-11, #1-2-5-18, #2-1-5-6, #2-1-15-2, #2-1-15-6, #2-1-18-13	Segregierende Deletionsmutante	At1g10360 (T) At1g78340 (C) At2g29450 (T)
Col-0	CRISPR dog1	#1-3-1, #1-3-2, #1-5-4, #1-7-1, #1-7-2, #1-7-3, #1-7-4, #1-7-5, #1-7-6, #1-7-7, #1-7-8, #1-7-9, #1-7-10, #2-2-2, #2-2-3, #2-2-4, #2-2-5, #2-2-6	Homozygote Deletionsmutanten	At5g45830 (C)
Col-0	CRISPR dogl4-dogl1	#2-7-1	Homozygote Deletionsmutante	At4g18650 (C) At4g18660 (C)
Col-0	CRISPR dogl4+dogl3	#1-6-2, #1-6-3, #1-6-4, #1-6-5, #1-6-6, #1-6-7, #1-6-8, #1-6-11, #1-6-12, #1-6-13	Homozygote Deletionsmutante	At4g18650 (C) AT4g18690 (C)
Col-0	CRISPR dogl2-dogl3	#1-14-5, #2-3-6	Homozygote Deletionsmutante	At4g18680 (C) At4g18690 (C)
Col-0	CRISPR dogl5	#1-9	Segregierende Deletionsmutante	At3g14880 (C)

6.4 Diphenylether-Herbizid-Wirkung auf *Arabidopsis thaliana* Akzessionen

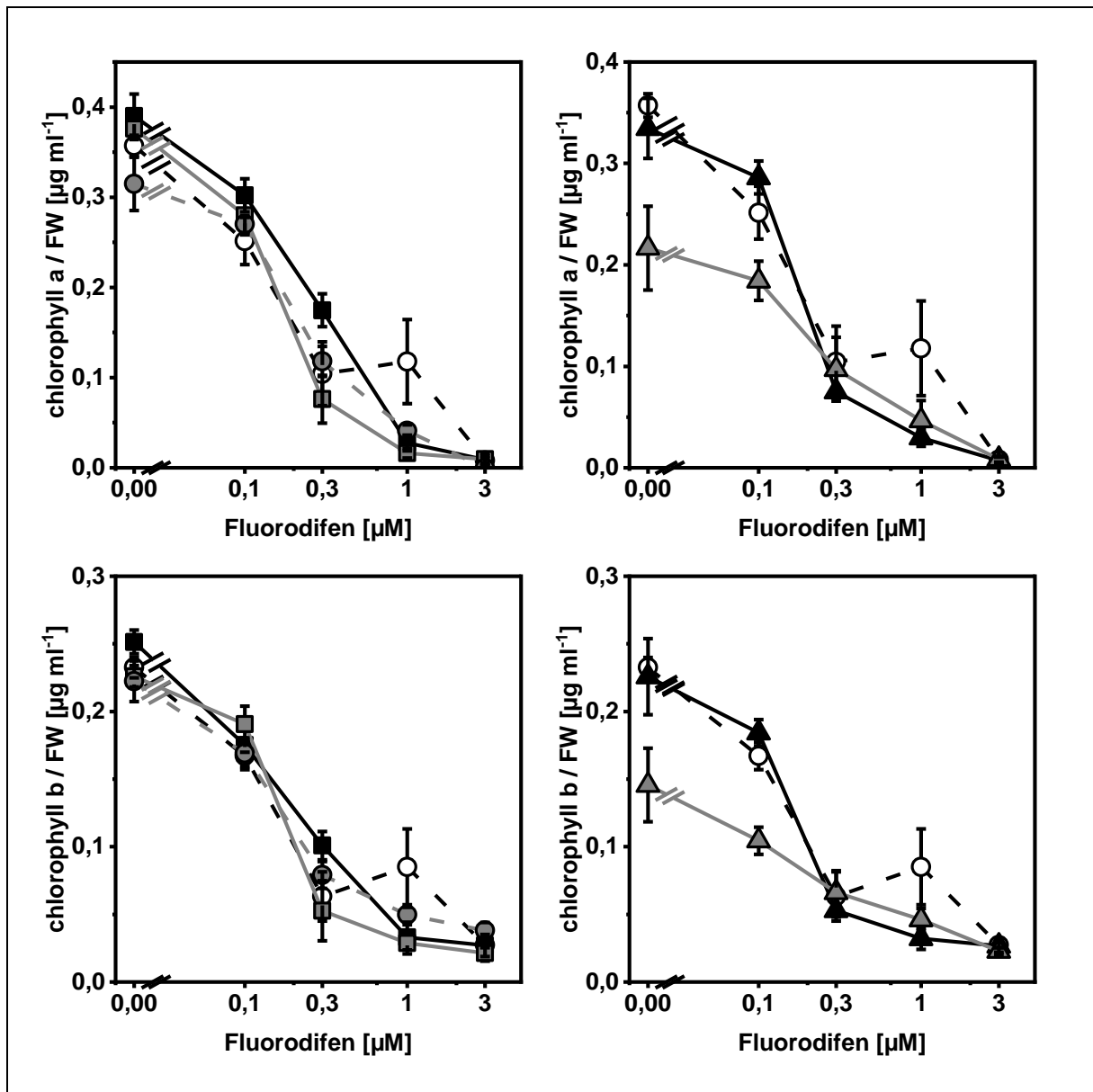
**Abbildung 6-1: Pigmentkonzentrationen nach Belastungen mit Fomesafen, Oxyfluorfen und Nitrofen**  
 Col-0 (■), Bur-0 (■) und Ler-0 (□) Keimlinge wurden auf ¼ MS-Platten bei Dauerlicht für fünf Tage angezogen. Anschließend wurden die Keimlinge auf ¼ MS-Platten mit unterschiedlichen Herbizid-Konzentrationen umgesetzt. Nach weiteren fünf Tagen bei Dauerlicht wurden die Keimlinge von den Platten genommen und die Pigmentkonzentration photometrisch im methanolischen Extrakt bestimmt. (A bis C) zeigen die Pigmentkonzentrationen nach Belastung mit Fomesafen, (D bis F) nach Belastung mit Oxyfluorfen und (G bis I) nach Belastungen mit Nitrofen.



**Abbildung 6-2: Pigmentkonzentrationen nach Belastungen mit Acifluorfen, Bifenox und Aclonifen**

Wie in Abbildung 3-8 wurden die Keimlinge der Akzessionen Col-0 (■), Bur-0 (■) und Ler-0 (□) angezogen und anschließend Acifluorfen (A bis C), Bifenox (D bis F) oder Aclonifen (G bis I) belastet. Dargestellt ist der Mittelwert der Pigmentkonzentrationen von drei Proben à drei bis vier Keimlingen je Probe und der Standardfehler

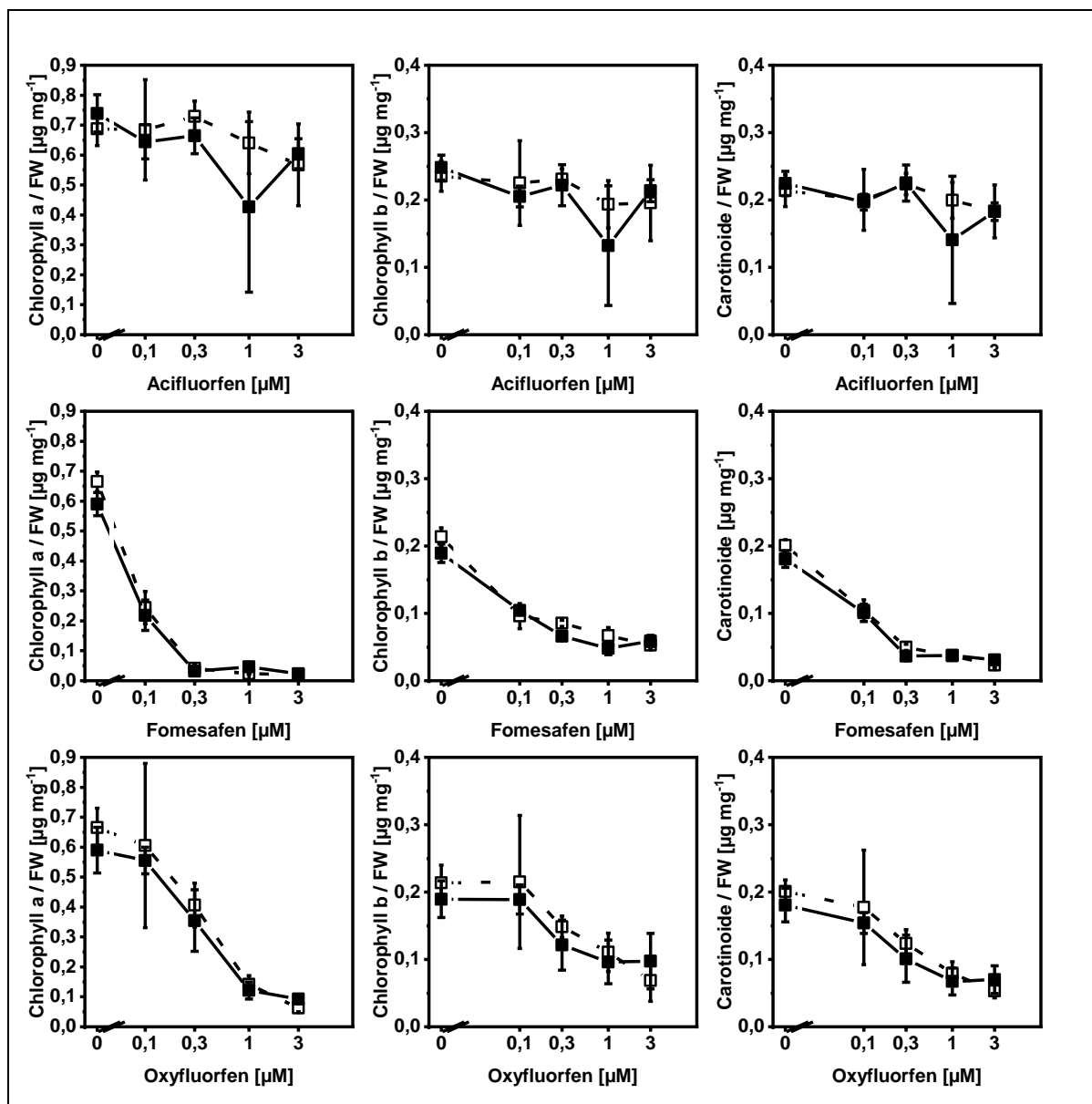
## 6.5 gstu28 CRISPR-Linie und T-DNA-Insertionslinie



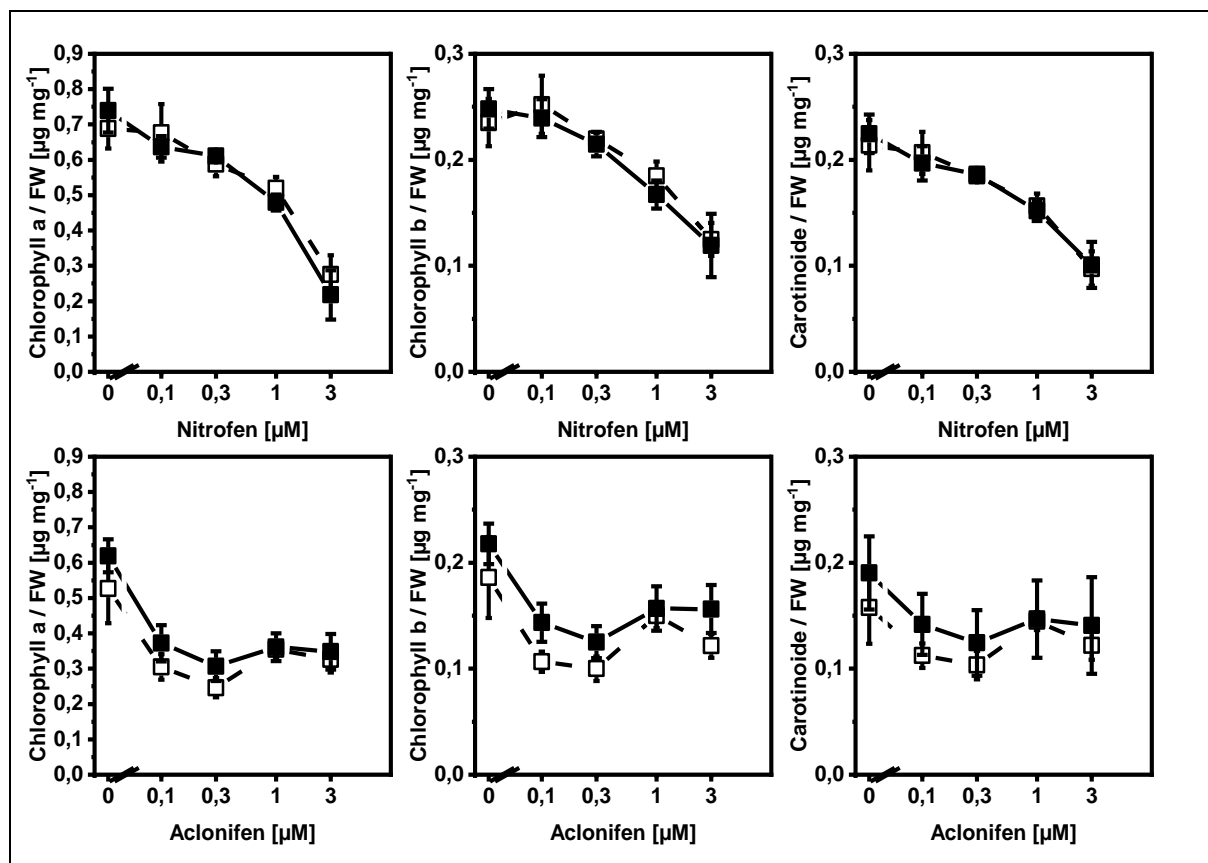
**Abbildung 6-3: Pigmentkonzentrationen der CRISPR u28-Linien**

Wie in Abbildung 3-23 beschrieben wurden Samen ausgebracht und nach fünf Tagen auf  $\frac{1}{4}$  MS-Platten mit unterschiedlichen Fluorodifen Konzentrationen transfertiert. Anschließend wurden von den Keimlingen, wie in Abbildung 3-23 aufgeführt, die Pigmentkonzentrationen bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert und der Standardfehler von je drei Proben von Col-0 (○) und CRISPR u28 #1-3 (■), #1-5 (■), #1-11 (●), #1-17 (▲) und #1-21 (▲).





**Abbildung 6-4: Pigmentkonzentration nach Belastung mit Acifluorfen, Fomesafen oder Oxyfluorfen**  
 Auf  $\frac{1}{4}$  MS-Platten wurden Keimlinge der Knock-Out-Linie *gstu28* (■) und dem Col-0 Wildtyp (□) für fünf Tage bei Dauerlicht angezogen. Diese wurden im Anschluss auf  $\frac{1}{4}$  MS-Platten mit unterschiedlichen Acifluorfen, Fomesafen oder Oxyfluorfen Konzentrationen transferiert und für weiter fünf Tagen bei Dauerlicht mit dem Herbizid belastet. Nach der Belastung wurden die Keimlinge von den Platten genommen, ihr Frischgewicht bestimmt und der Gehalt der Pigmente bestimmt. Dazu wurden ein methanolischer Extrakt hergestellt und dieser photometrisch analysiert.



**Abbildung 6-5: Pigmentkonzentration nach Belastung mit Nitrofen oder Aclonifen**

Fünf Tage alte Keimlinge der Knock-Out-Linie *gstu8* (■) sowie der Wildtyp-Linie *Col-0* (□), angezogen bei Dauerlicht und 21 °C auf  $\frac{1}{4}$  MS-Platten, wurden auf  $\frac{1}{4}$  MS-Platten mit unterschiedlichen Nitrofen oder Aclonifen Konzentrationen transferiert. Nach weiteren fünf Tagen wurde das Frischgewicht der Keimlinge bestimmt und mittels methanolischer Extraktion und photometrischer Analyse des Extraktes die Pigmentkonzentrationen bestimmt.

## 6.6 GST-Gen-Cluster

**Tabelle 6-8: Sequenzvergleich der AtGSTs im AtGSTU1-AtGSTU7-Gen-Cluster**

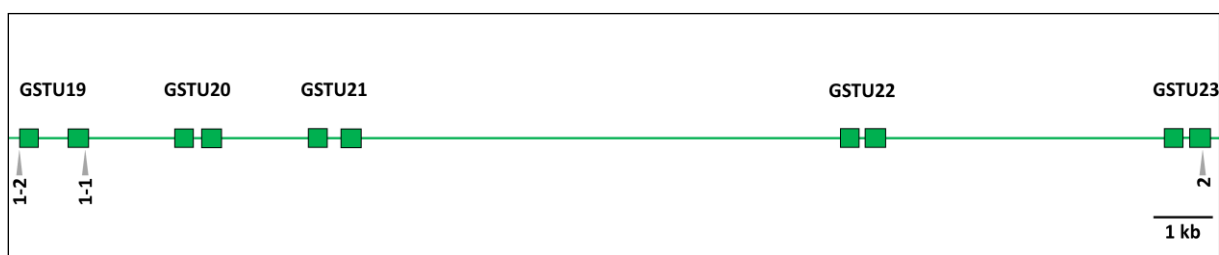
Dargestellt ist die Gleichheit und Ähnlichkeit der Proteinsequenz zwischen je zwei der AtGSTs des AtGSTU1-AtGSTU7-Gen-Clusters. Die Gleichheit bzw. Ähnlichkeit der Proteinsequenzen wurden mittels BLAST der Webseite [phytozome.jgi.doe.gov](http://phytozome.jgi.doe.gov) erstellt (Goodstein et al. 2012).

	AtGSTU2	AtGSTU3	AtGSTU4	AtGSTU5	AtGSTU6	AtGSTU7
AtGSTU1	81,7 / 88,8	74,2 / 85,8	78,1 / 89,7	68,0 / 85,8	68,3 / 84,6	54,8 / 76,5
AtGSTU2		73,3 / 84,4	76,8 / 87,5	64,4 / 82,2	65,6 / 79,6	55,3 / 76,7
AtGSTU3			75,6 / 85,8	61,3 / 81,3	63,1 / 79,7	50,7 / 76,5
AtGSTU4				65,8 / 84,9	65,6 / 82,8	55,3 / 77,2
AtGSTU5					77,7 / 90,6	56,7 / 75,9
AtGSTU6						55,8 / 75,4

**Tabelle 6-9: Sequenzvergleich der AtGSTs im AtGSTU19-AtGSTU23-Gen-Cluster**

Für den AtGSTU19-AtGSTU23-Gen-Cluster ist die Ähnlichkeit der Proteinsequenz je zwei der AtGSTs des Gen-Clusters gezeigt. Bestimmt wurden die Gleichheit und Ähnlichkeit der Proteinsequenzen mittels BLAST der Webseite [phytozome.jgi.doe.gov](http://phytozome.jgi.doe.gov) (Goodstein et al. 2012).

	AtGSTU20	AtGSTU21	AtGSTU22	AtGSTU23
AtGSTU19	75,2 / 83,6	74,4 / 83,1	71,9 / 82,9	70,1 / 82,7
AtGSTU20		65,9 / 76,5	69,2 / 83,2	63,6 / 79,4
AtGSTU21			64,7 / 77,4	64,7 / 77,5
AtGSTU22				63,3 / 77,7

**Abbildung 6-6: AtGSTU19-AtGSTU23-Gen-Cluster**

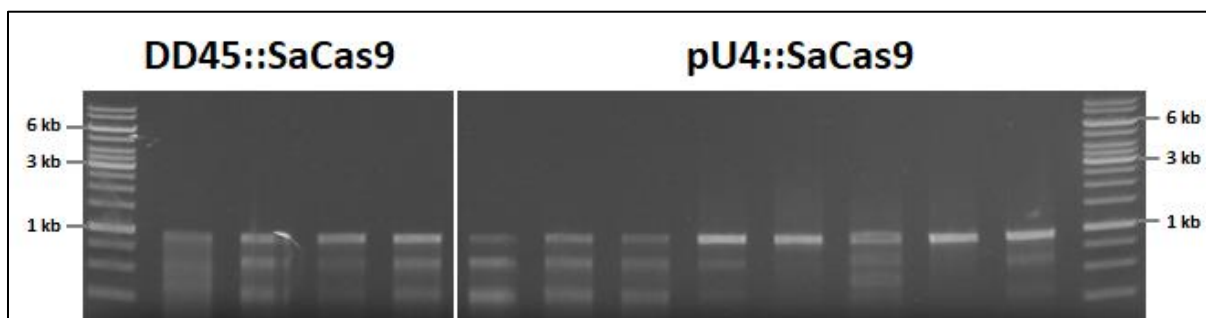
Der Gen-Cluster der AtGSTU19, AtGSTU20, AtGSTU21, AtGSTU22 und AtGSTU23 erstreckt sich auf dem ersten Chromosom von *A. thaliana* über fast 20,6 kb. Wie alle Gene der Tau-GSTs bestehen auch diese fünf Gene aus zwei Exons und einem Intron. Für die Deletion des Gen-Clusters wurden zwei Kombinationen der sgRNAs verwendet. Es wurden je eine der sgRNAs, die in der AtGSTU19 (#1-1 oder #1-2) binden, mit der sgRNA, die in der AtGSTU23 (#2) bindet, kombiniert.

## 6.7 CRISPR/Cas-Analyse der GST-Gen-Cluster-Deletionen

**Tabelle 6-10: Analyse der Deletionen des GSTU1/U7-Clusters mittels PCR**

Mittels PCR wurden sowohl Primärtransformanten als auch Pflanzen der segregierenden Generation der beiden verwendeten CRISPR-Konstrukt Varianten auf die Deletion des Genclusters getestet. Aufgeführt sind die positiv getesteten Pflanzen gegenüber allen getesteten Pflanzen beider Generationen und Varianten.

	T1-Generation		Segregierende Generation	
	Anzahl Pflanzen mit Deletion	Anzahl getestete Pflanzen	Anzahl Pflanzen mit Deletion	Anzahl getestete Pflanzen
GSTU1 – GSTU7 #1	2	32	1	25
GSTU1 – GSTU7 #2	3	40	14	24
GSTU19 – GSTU23 #1	7	16	8	36
GSTU19 – GSTU23 #2	0	35	n.t.	n.t.

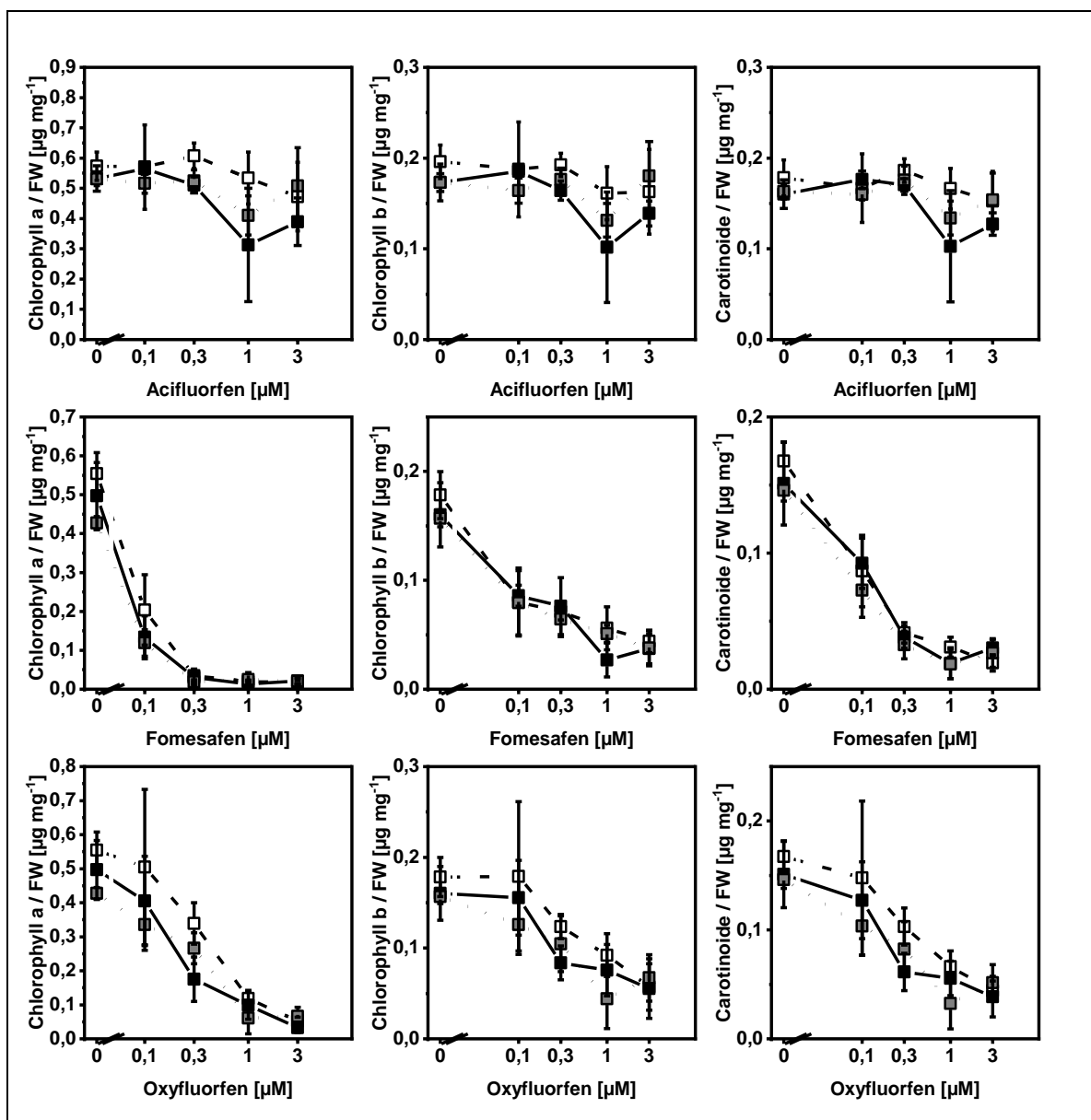
**Abbildung 6-7: T7-Endonuklease I Verdau der CRISPR/Cas-Pflanzen für das Target-Gen AtGSTU1**

Das aus den CRISPR-Linien mittels PCR amplifizierte Gen der AtGSTU1 wurde hybridisiert und mit der T7-Endonuklease I verdaut (2.5.4). Handelt es sich um eine heterozygote Mutante, sind insgesamt drei Banden auf dem Agarosegel zu sehen. Als Größenstandard wurde der Thermo Scientific GeneRuler 1kb Ladder verwendet.

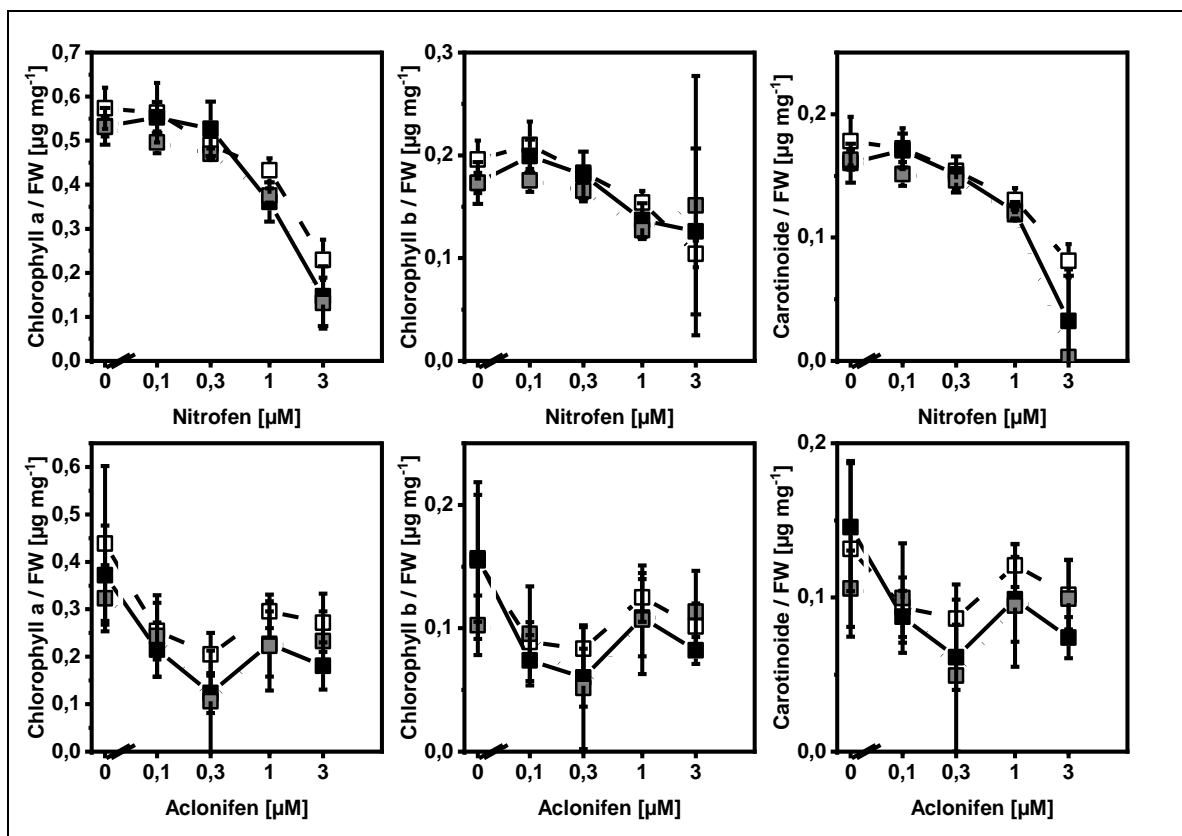
**Tabelle 6-11: Genotypisierung der CRISPR/Cas9 für Teilabschnitte des AtGSTU1-AtGSTU7-Gen-Clusters**  
 In Abhängigkeit der Deletionen und der Analysemethoden sind die Anzahl der positiv getesteten und aller getesteten Pflanzen dargestellt.

<b>Genabschnitt</b>	<b>Cas9-Variante</b>	<b>Analysemethode</b>	<b>Positiv</b>	<b>Getestet</b>
AtGSTU1	pU4:: <i>SaCas9</i>	PCR	4	67
AtGSTU1	pU4:: <i>SaCas9</i>	T7 Endonuklease I	6	8
AtGSTU1	DD45:: <i>SaCas9</i>	PCR	0	54
AtGSTU1	DD45:: <i>SaCas9</i>	T7 Endonuklease I	3	4
AtGSTU1	DD45:: <i>SaCas9</i>	Sequenzierung	2	4
AtGSTU1 bis AtGSTU7	pU4:: <i>SaCas9</i>	PCR	0	22
AtGSTU1 bis AtGSTU7	DD45:: <i>SaCas9</i>	PCR	0	43
AtGSTU1 bis AtGSTU7	DD45:: <i>SaCas9</i>	T7 Endonuklease I	4	12
AtGSTU1 bis AtGSTU6	pU4:: <i>SaCas9</i>	PCR	0	44
AtGSTU1 bis AtGSTU6	DD45:: <i>SaCas9</i>	PCR	0	223
AtGSTU1 bis AtGSTU6	DD45:: <i>SaCas9</i>	T7 Endonuklease I	0	11
AtGSTU5 bis AtGSTU7	DD45:: <i>SaCas9</i>	PCR	0	300
AtGSTU5 bis AtGSTU7	DD45:: <i>SaCas9</i>	T7 Endonuklease I	2	24
AtGSTU2	DD45:: <i>SaCas9</i>	PCR	0	14
AtGSTU2 bis AtGSTU5	DD45:: <i>SaCas9</i>	PCR	0	65
AtGSTU2 bis AtGSTU6	DD45:: <i>SaCas9</i>	PCR	0	56
AtGSTU2 bis AtGSTU7	DD45:: <i>SaCas9</i>	PCR	0	81
AtGSTU3 bis AtGSTU5	DD45:: <i>SaCas9</i>	PCR	0	29
AtGSTU3 bis AtGSTU6	DD45:: <i>SaCas9</i>	PCR	0	154
AtGSTU3 bis AtGSTU6	DD45:: <i>SaCas9</i>	T7 Endonuklease	0	24
AtGSTU3 bis AtGSTU7	DD45:: <i>SaCas9</i>	PCR	0	85
AtGSTU3 bis AtGSTU7	DD45:: <i>SaCas9</i>	T7 Endonuklease	0	36
AtGSTU5	DD45:: <i>SaCas9</i>	PCR	0	46
AtGSTU6 bis AtGSTU7	DD45:: <i>SaCas9</i>	PCR	0	192
AtGSTU6 bis AtGSTU7	DD45:: <i>SaCas9</i>	T7 Endonuklease	0	36

## 6.8 gstu8 CIRPSR u1-u5 #1-9-3 und #1-9-4



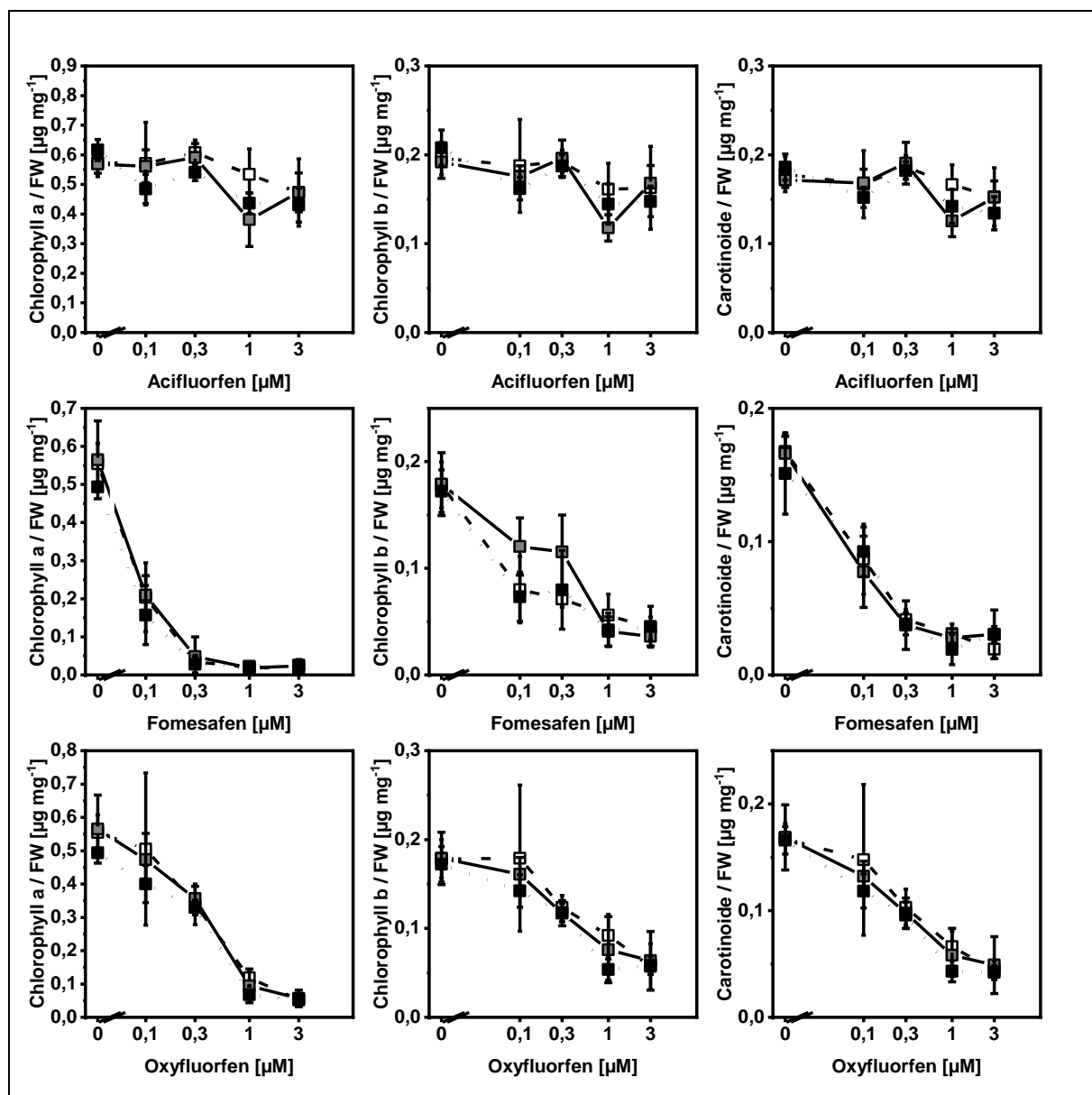
**Abbildung 6-8: Pigmentkonzentration nach Belastung mit Acifluorfen, Fomesafen oder Oxyfluorfen**  
 Fünf Tage alte Keimlinge, die auf  $\frac{1}{4}$  MS bei Dauerlicht angezogen wurden, wurden auf  $\frac{1}{4}$  MS-Platten mit unterschiedlichen Acifluorfen, Fomesafen oder Oxyfluorfen Konzentrationen transferiert. Nach weiteren fünf Tagen wurden die Keimlinge von den Platten genommen, deren Frischgewicht bestimmt und bis zur weiteren Analyse bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Analyse wurden die Pigmente methanolische extrahiert und photometrisch bestimmt. Analysiert wurden Keimlinge der Mehrfachmutante *gstu8* CRISPR U1-U5 #1-9-3 (■) sowie die nicht mutierte Linie #1-9-4 (■) und Col-0 (□).



**Abbildung 6-9: Pigmentkonzentration nach Belastung mit Nitrofen oder Aclonifen**

Auf  $\frac{1}{4}$  MS-Platten mit unterschiedlichen Nitrofen oder Aclonifen Konzentrationen wurden fünf Tage alte Keimlinge, die auf  $\frac{1}{4}$  MS-Platten bei Dauerlicht angezogen wurden, transferiert. Fünf Tage nach dem Transfer bei Dauerlicht wurden die Keimlinge von den Platten genommen, deren Frischgewicht bestimmt und die Pigmente methanolisch extrahiert. Der Extrakt wurde photometrisch analysiert. Dargestellt sind die Pigmentkonzentrationen der unterschiedlichen Belastungen für die CRISPR-Deletionsmutante *gstu8 CRISPR u1+u5 #1-9-3* (■), die nicht mutierte Linie *gstu8 CRISPR U1+U5 #1-9-4* (◐) und *Col-0 Wildtyp* (□).

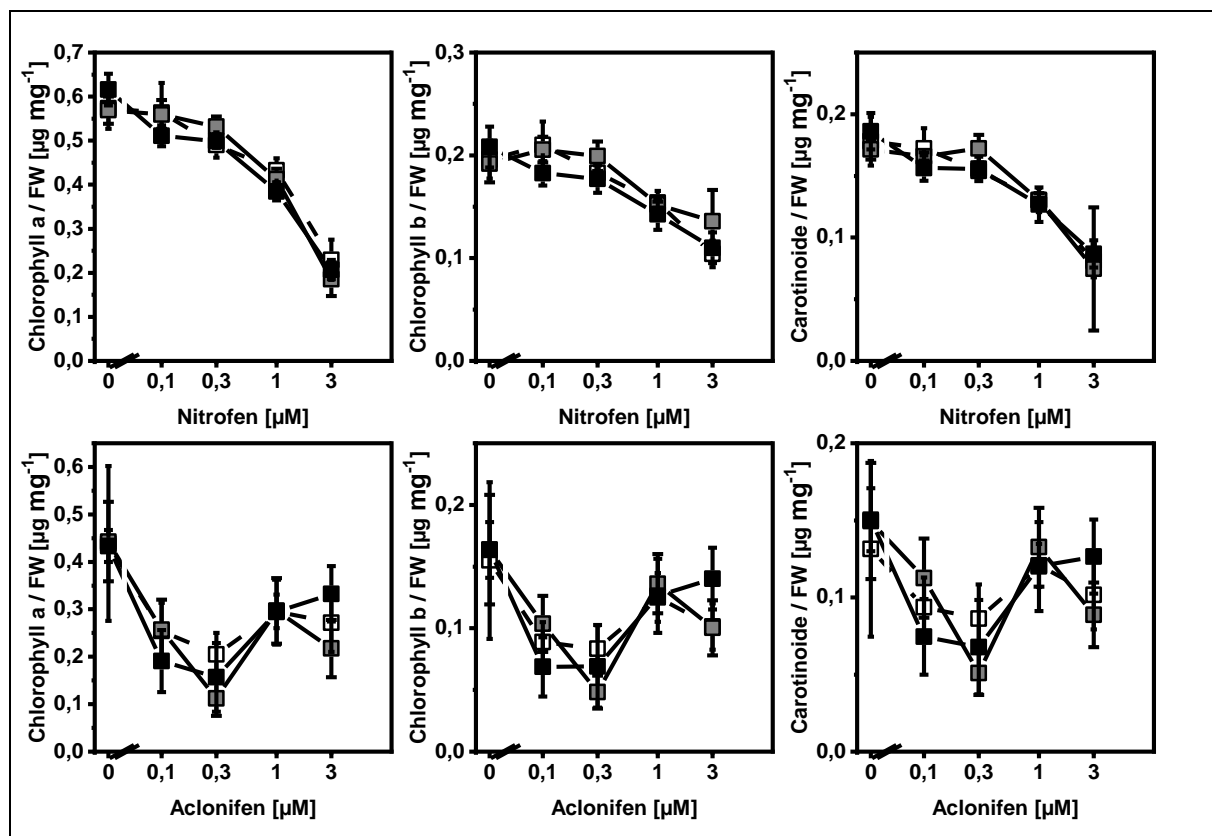
## 6.9 gstu8 CRISPR u1-u7



**Abbildung 6-10: Pigmentkonzentration nach Belastung mit Acifluorfen, Fomesafen oder Oxyfluorfen**

Samen des CRISPR-Linie *gstu8* CRISPR u1-u7 #1-6-2 (■) sowie von deren genetischer Background *gstu8* (■) und von dem Wildtyp *Col-0* (□) wurden auf ¼ MS-Platten ausgebracht und nach zwei tägiger Stratifizierung für fünf Tage bei Dauerlicht zur Keimung gebracht. Daraufhin wurden die Keimlinge auf ¼ MS-Platten mit entsprechenden Konzentrationen an Acifluorfen, Fomesafen oder Oxyfluorfen transferiert und für weitere fünf Tagen mit dem Herbizid exponiert. Anschließend wurden die Keimlinge von den Platten genommen und deren Frischgewicht bestimmt. Von den Keimlingen wurde im Anschluss ein methanolischer Extrakt hergestellt. Die Pigmentkonzentrationen in dem Extrakt wurden photometrisch bestimmt.



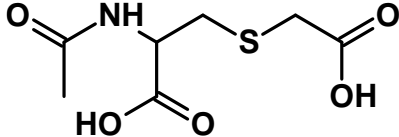
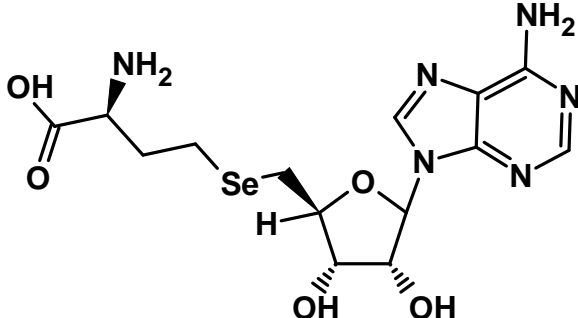
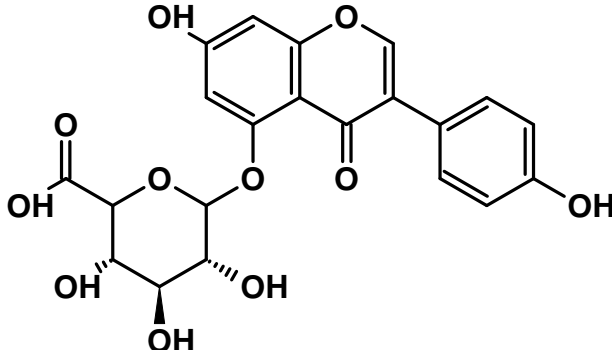


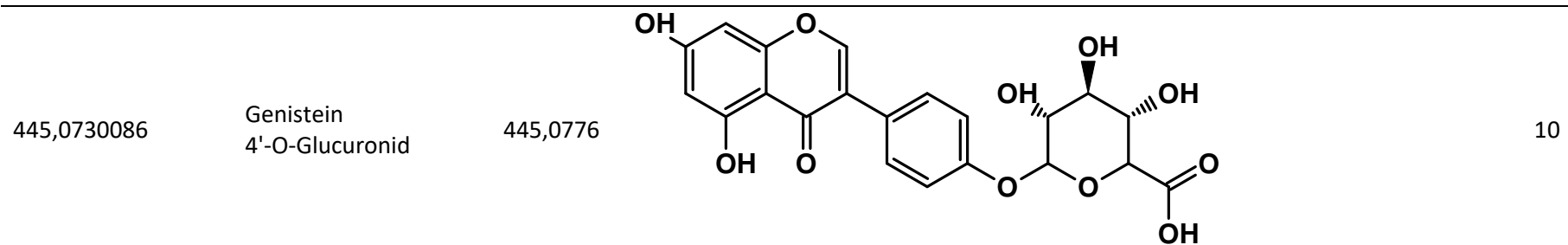
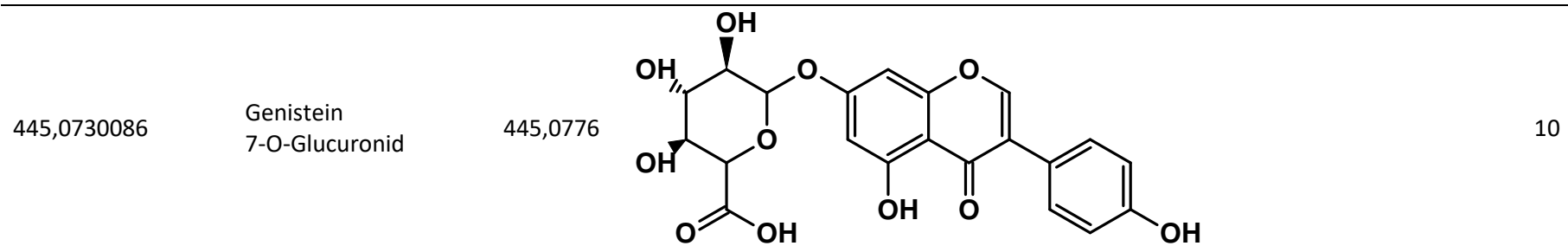
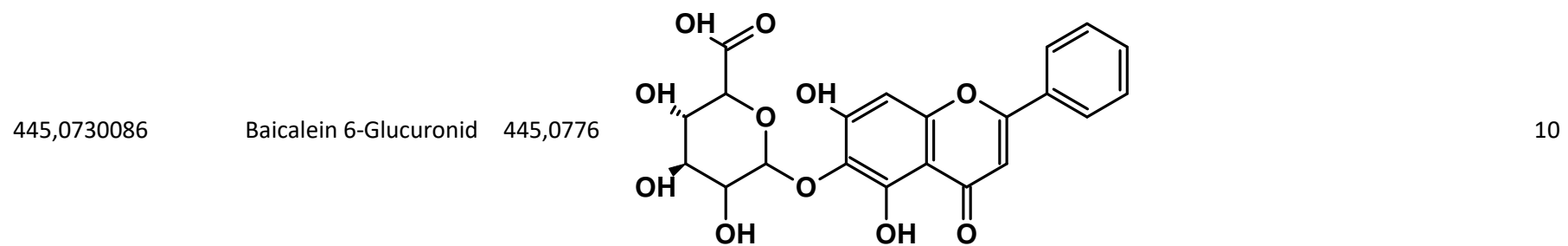
**Abbildung 6-11: Pigmentkonzentration nach Belastung mit Nitrofen oder Aclonifen**

Wie in Abbildung 6-10 wurden die entsprechenden Samen ausgebracht und angezogen. Die Belastung der Keimlinge erfolgt auf ¼-MS-Platten mit der entsprechenden Konzentration an Nitrofen oder Aclonifen. Nach fünf Tagen wurden die Keimlinge von den Platten genommen und deren Frischgewicht bestimmt. Nach methanolischer Extraktion wurden die Pigmentkonzentrationen photometrisch bestimmt.

## 6.10 Massen der Metabolite in CRISPR/Cas-Linien

Tabelle 6-12: Auswahl möglicher Verbindungen für die abgereicherten Massen in der *gstu8* CRISPR u1-u5 #1-9-3 Linie im Vergleich zum genetischen Background *gstu8*

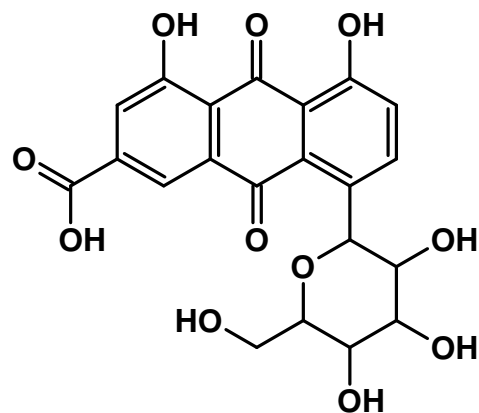
Gemessene Masse [M-H] <sup>-</sup>	Name	Masse [u]	Struktur	Abweichung [ppm]
220,0074779	N-Acetyl-S-Carboxymethyl-Cystein	221,0358		95
445,0730086	Se-Adenosyl-Selenomethionin	446,0817		3
445,0730086	Genistein 5-O-Glucuronid	445,0776		10



445,0730086

Glucorhein

445,0776

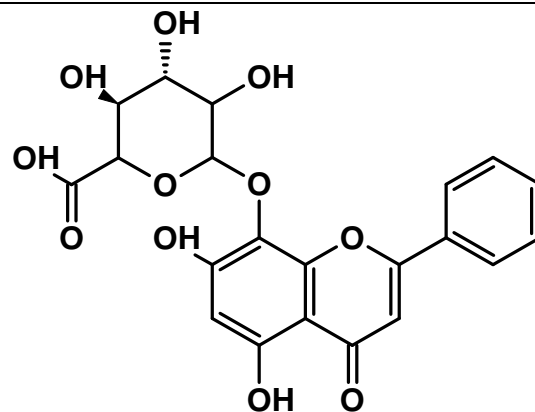


10

445,0730086

Norwogonin  
8-Glucuronid

445,0776

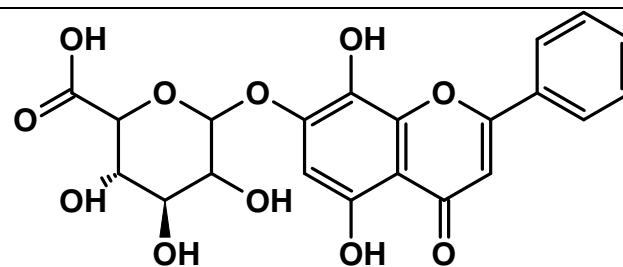


10

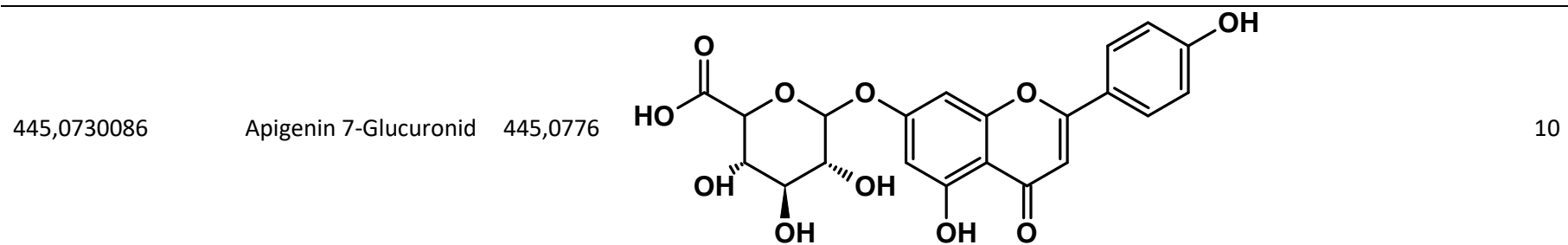
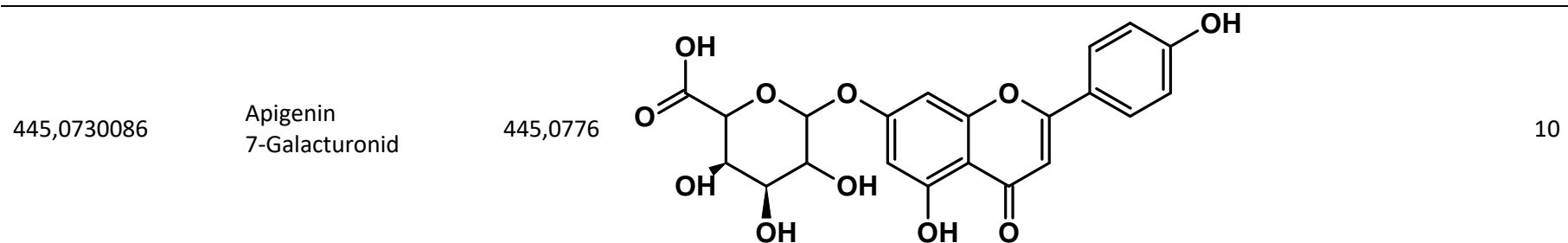
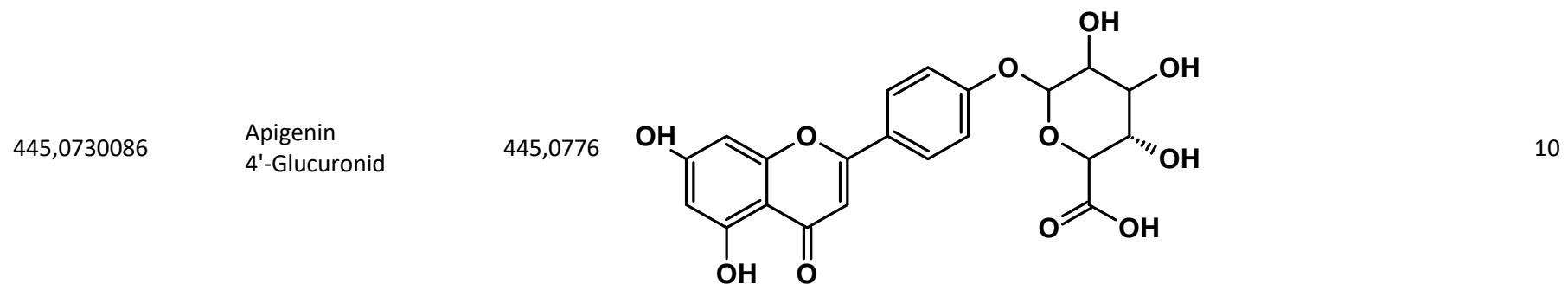
445,0730086

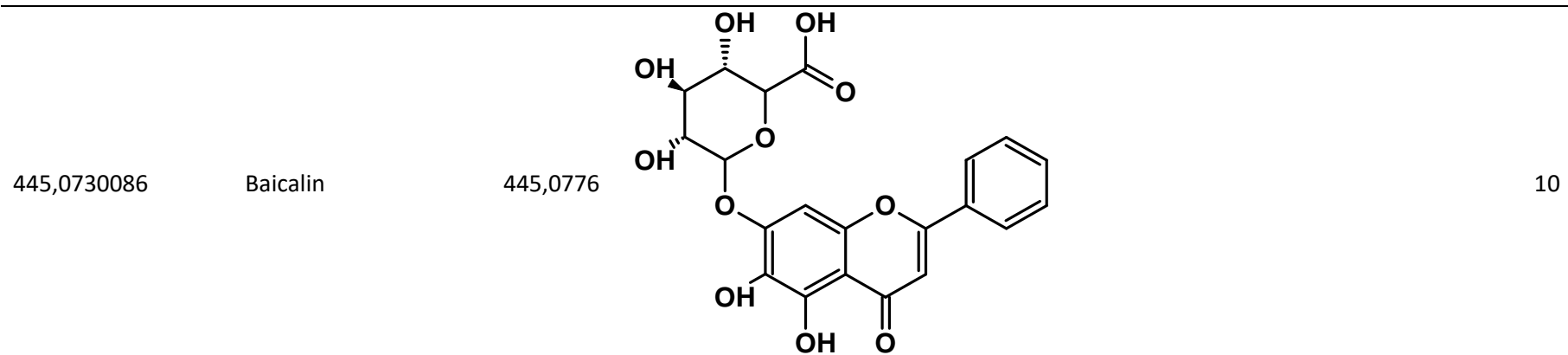
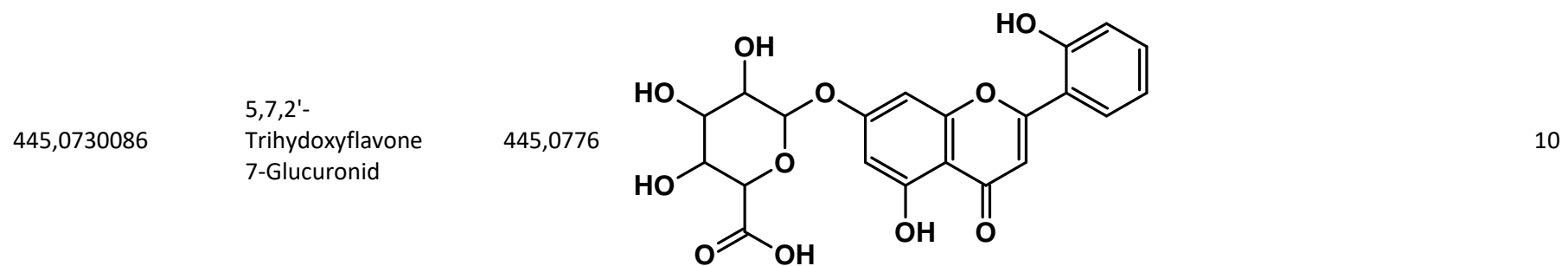
Norwogonin  
7-Glucuronid

445,0776



10

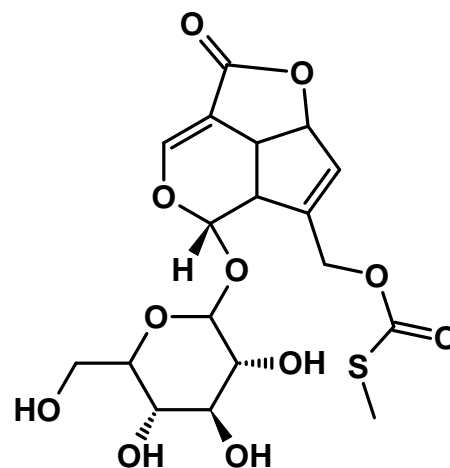




445,0730086

Paederoside

446,0883

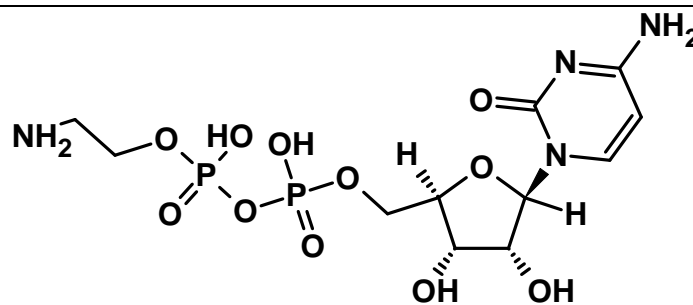


17

445,0730086

CDP-Ethanolamin

446,0604

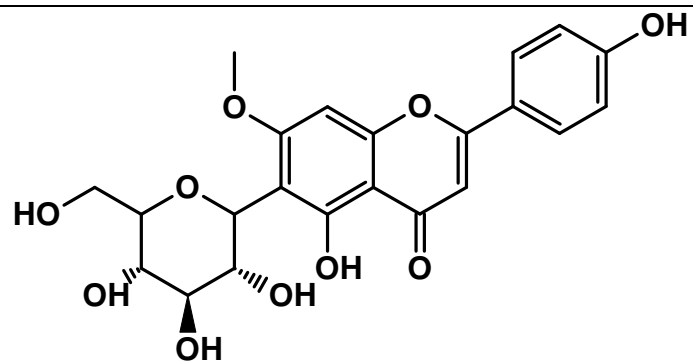


44

445,0730086

Swertisin

446,1213

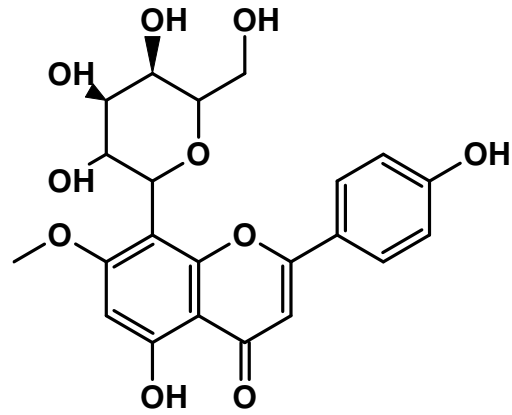


92

445,0730086

Isoswertisin

446,1213

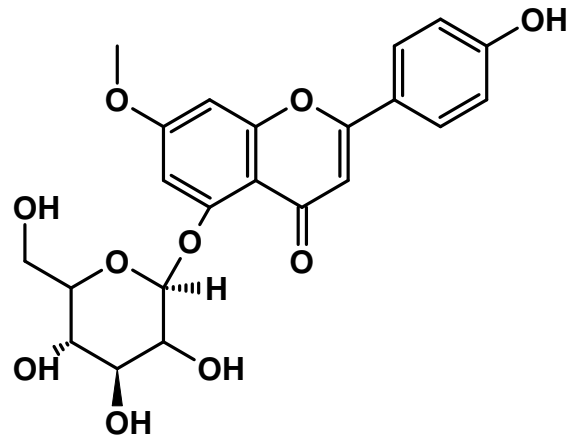


92

445,0730086

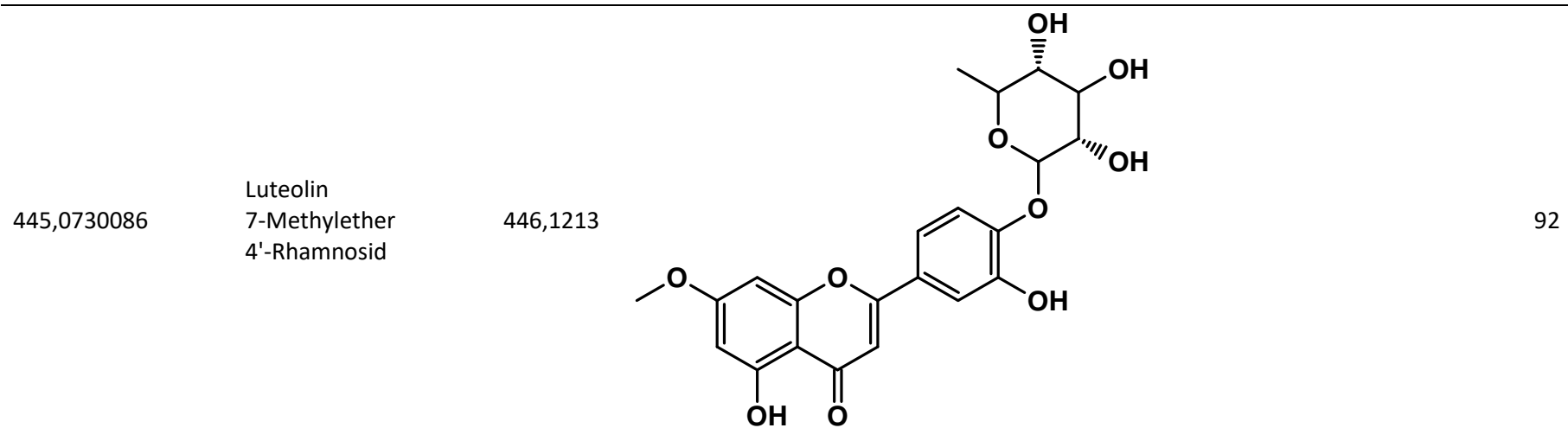
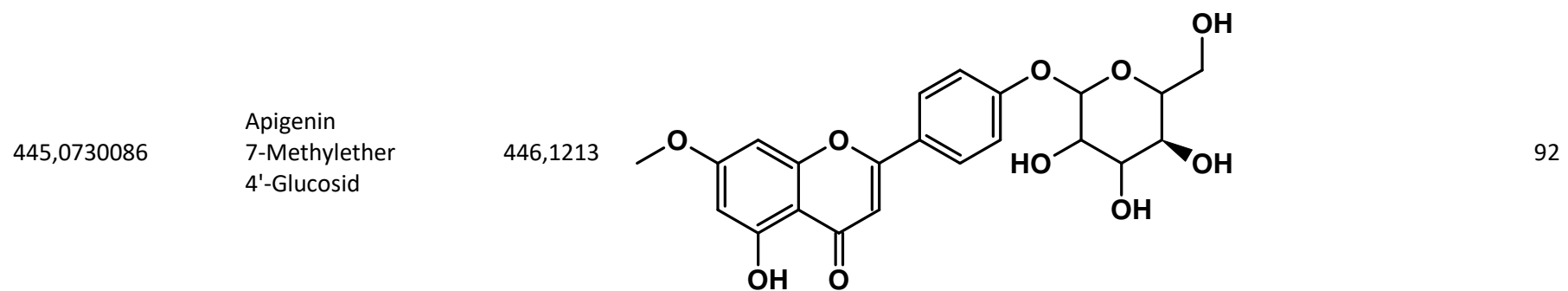
Apigenin  
7-Methylether  
5-Glucosid

446,1213



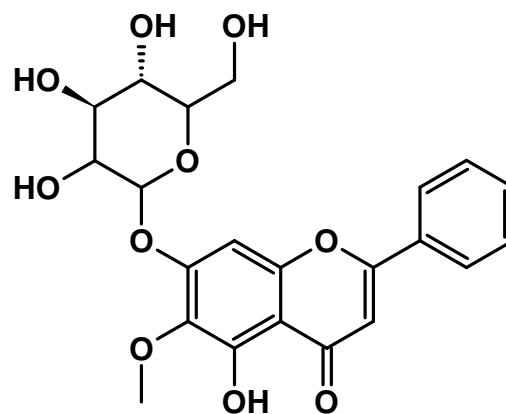
92





445,0730086  
Baicalein  
6-Methylether  
7-Glucosid

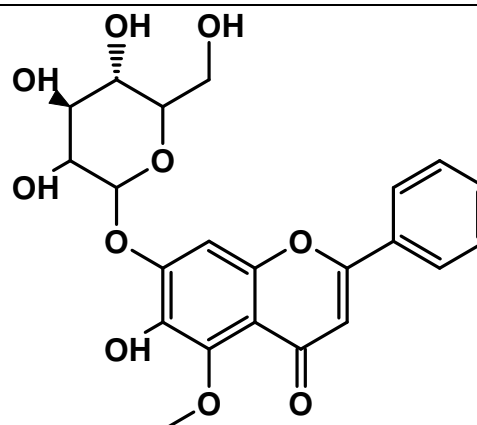
446,1213



92

445,0730086  
6,7-Dihydroxy-  
5-Methoxyflavon  
7-Glucosid

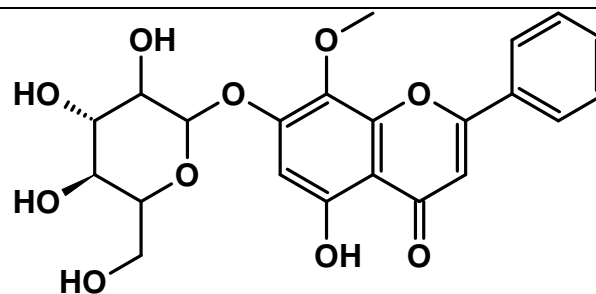
446,1213



92

445,0730086  
Wogonin 7-Glucosid

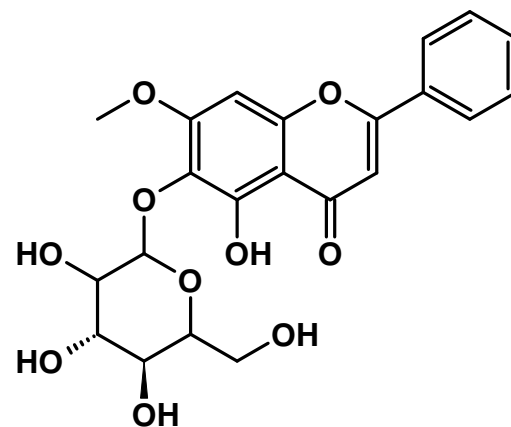
446,1213



92

445,0730086  
5,6-Dihydroxy-  
7-Methoxyflavon  
6-O- $\beta$ -D-  
Glucopyanosid

446,1213

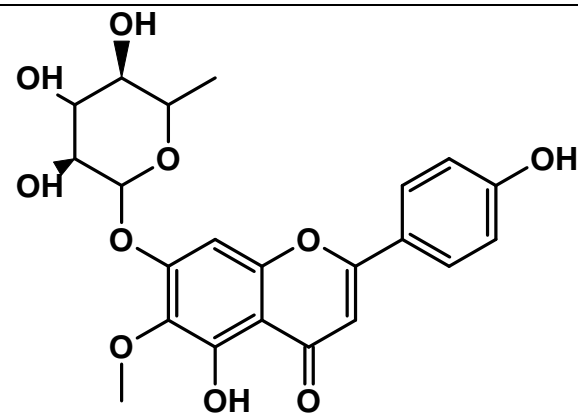


92

445,0730086

Hispidulin  
7-Rhamnosid

446,1213

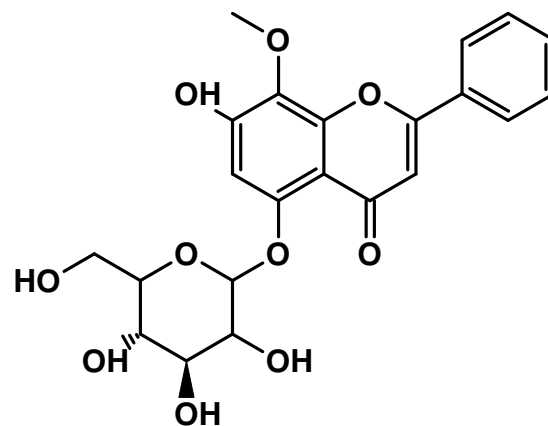


92

445,0730086

Wogonin 5-Glucosid

446,1213

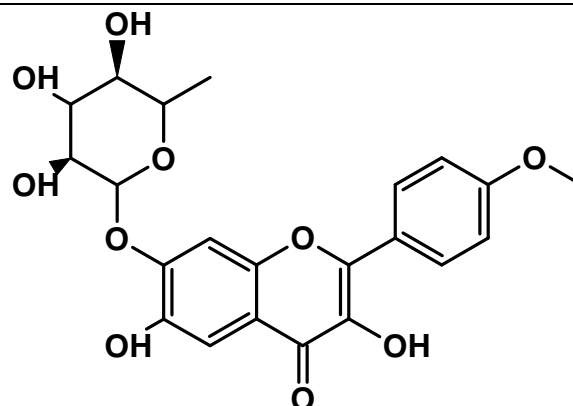


92

445,0730086

3,6,7-Trihydroxy-  
4'-Methoxyflavon  
7-Rhamnosid

446,1213

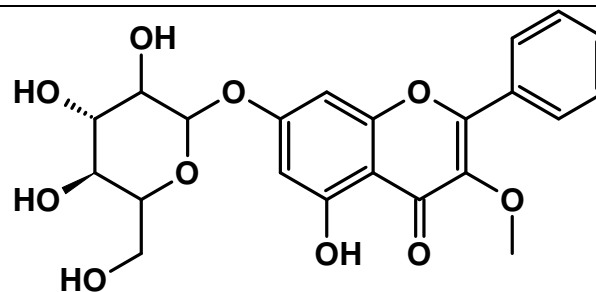


92

445,0730086

Galangin  
3-Methylether  
7-Glucosid

446,1213

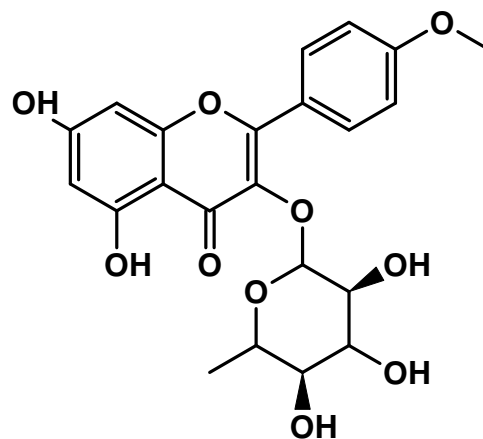


92

445,0730086

Kaempferid  
3-Rhamnosid

446,1213

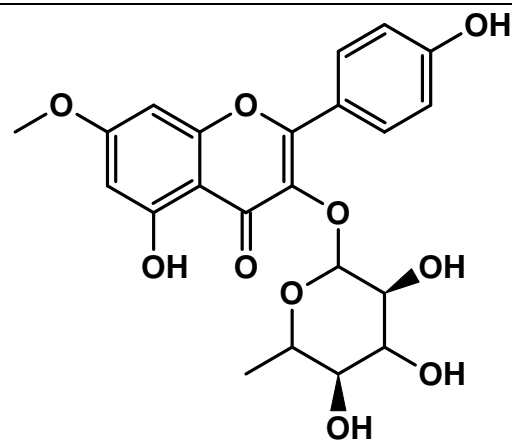


92

445,0730086

Rhamnocitrin  
3-Rhamnosid

446,1213

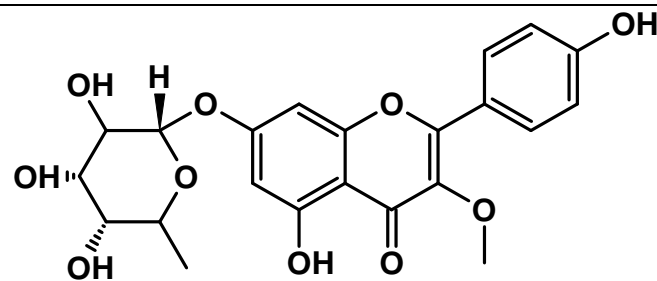


92

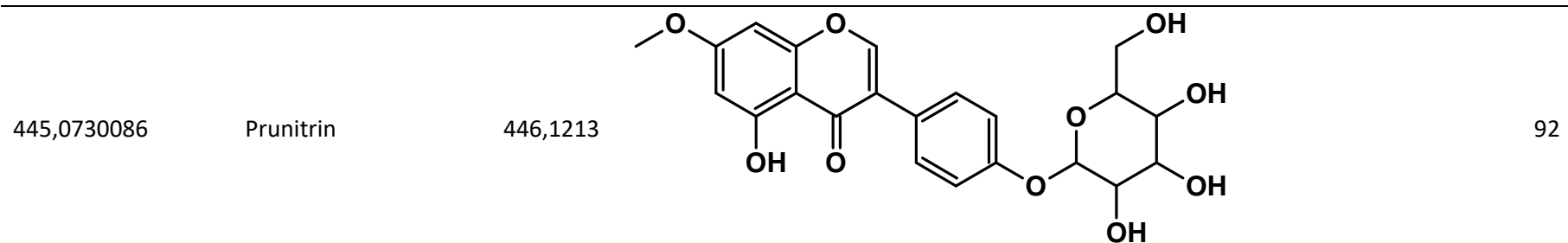
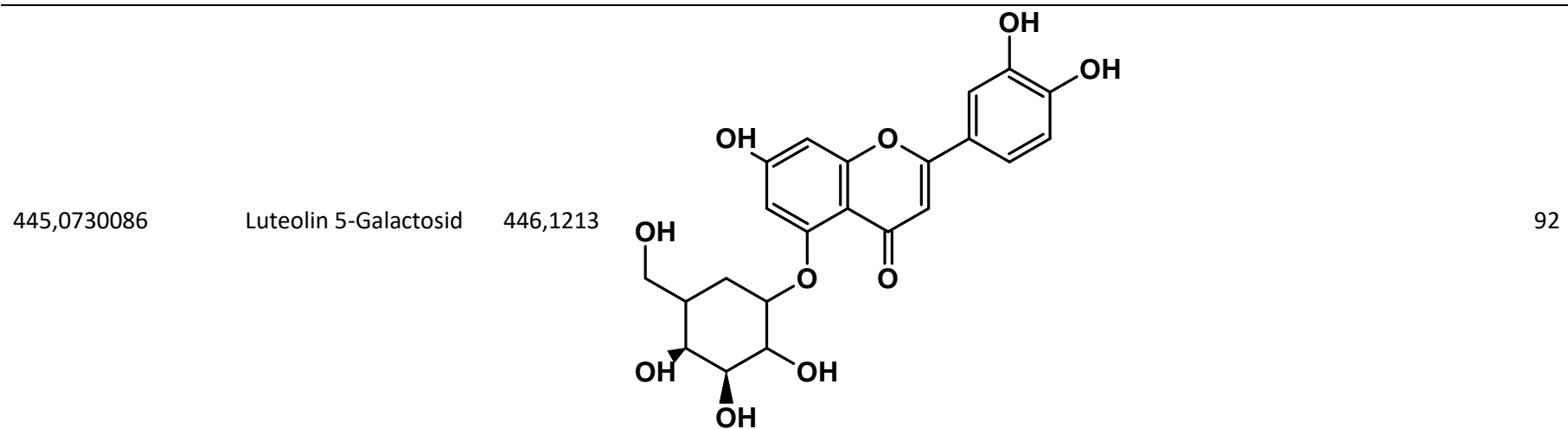
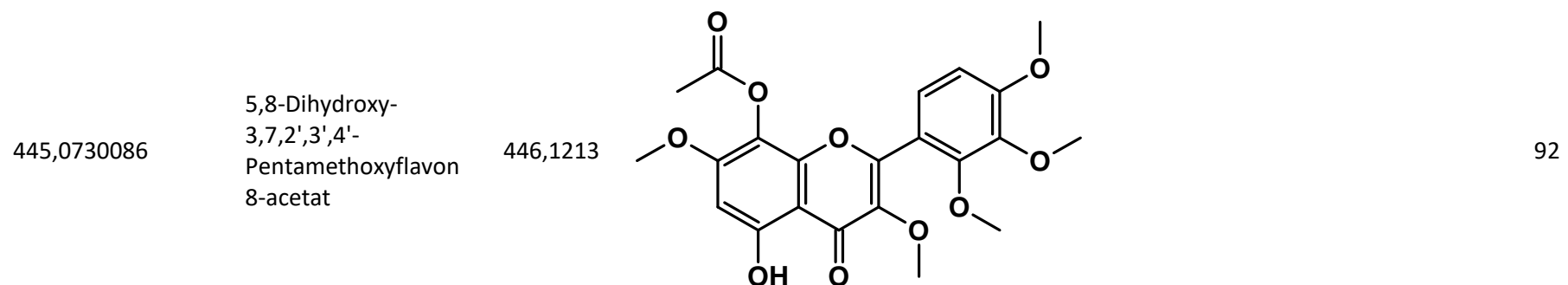
445,0730086

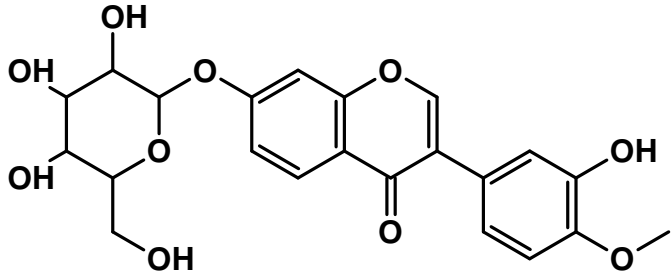
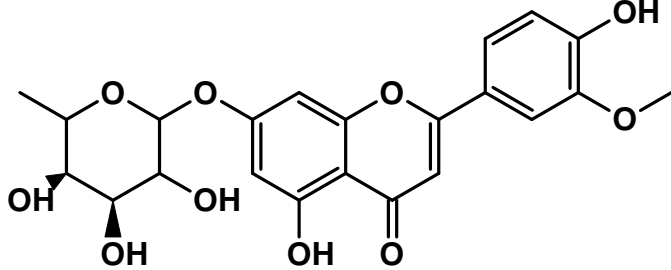
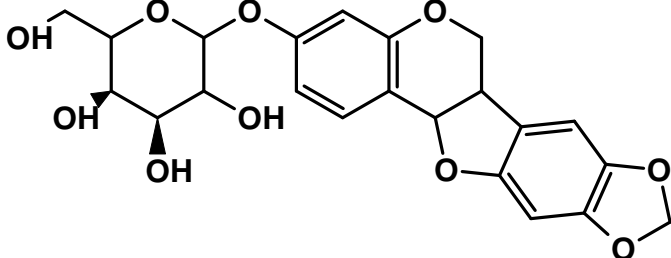
Isokaempferid  
7-Rhamnosid

446,1213



92

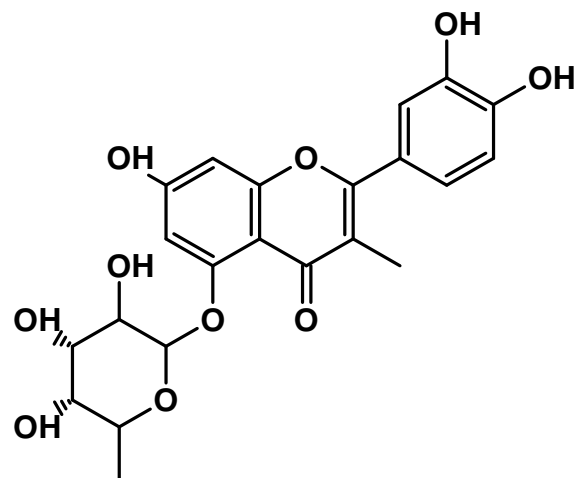


445,0730086	Calycosin 7-Galactosid	446,1213		92
445,0730086	Luteolin 3'-Methylether 7-Rhamnosid	446,1213		92
445,0730086	Maackianin 3-O-Galactosid	446,1213		92

445,0730086

3-C-Methylfluteolin  
5-Rhamnoside

446,1213

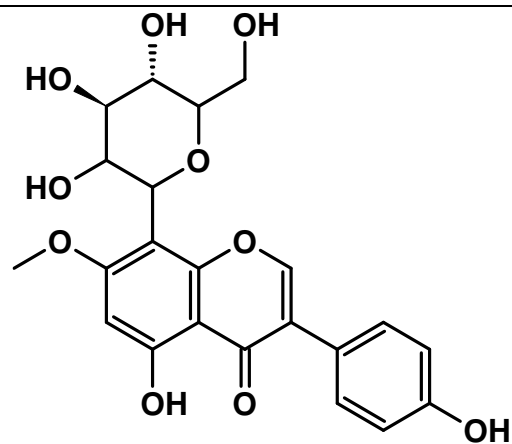


92

445,0730086

Prunetin 8-C-Glucosid

446,1213



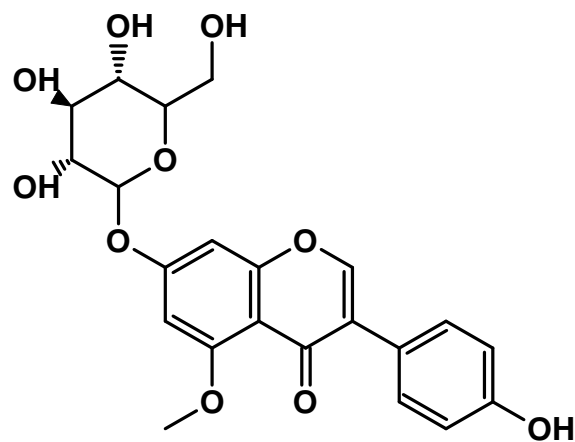
92



445,0730086

Isoprunetin  
7-O-Glucosid

446,1213

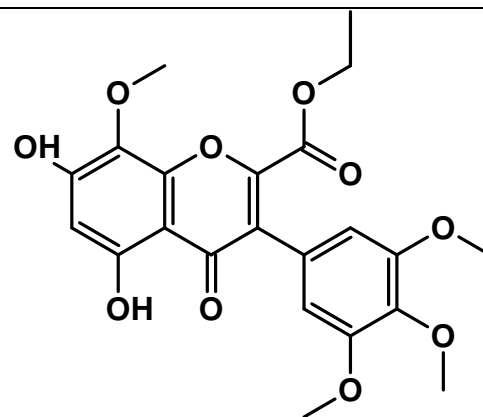


92

445,0730086

2-Ethoxycarbonyl-5,7-  
Dihydroxy-  
8,3',4',5'-Tetra-  
methoxyisoflavone

446,1213

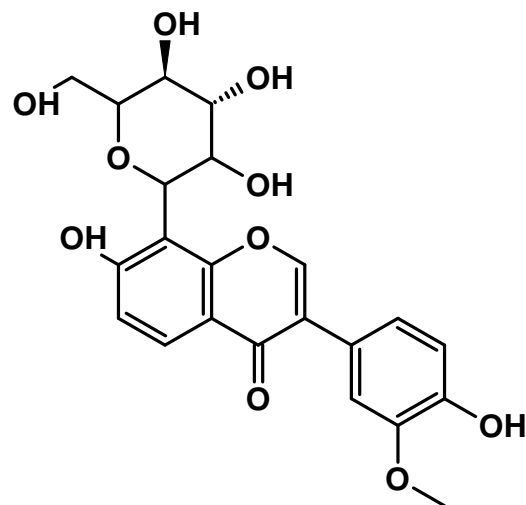


92

445,0730086

Pueraria Glycosid 3

446,1213

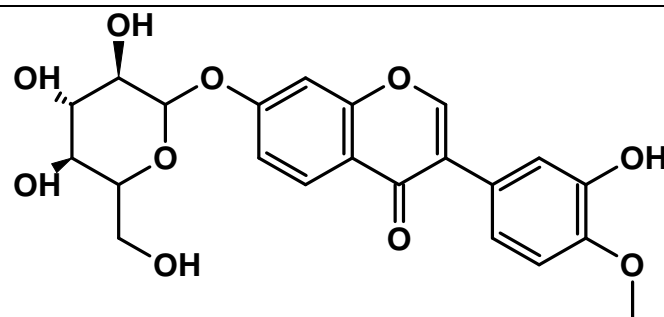


92

445,0730086

Calycosin  
7-O-Glucosid

446,1213

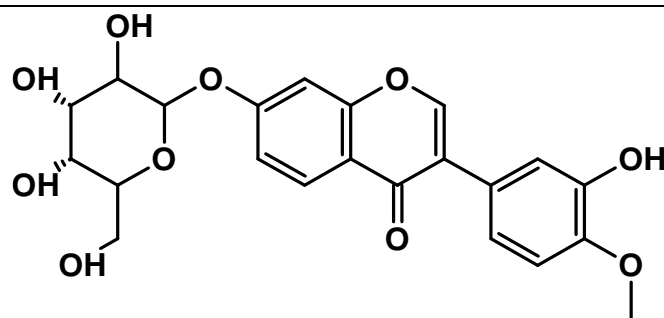


92

445,0730086

Calycosin  
7-O-Galactosid

446,1213

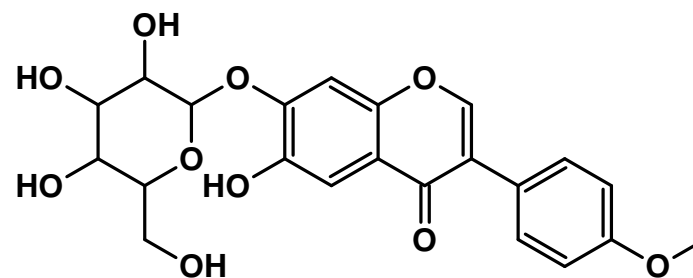


92

445,0730086

Texasin 7-O-Glucosid

446,1213

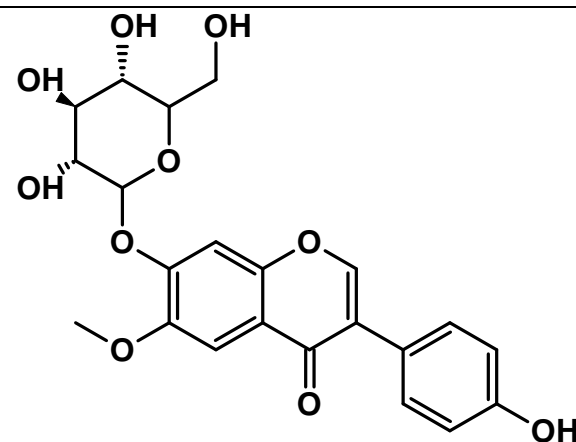


92

445,0730086

Glycitein 7-O-Glucosid

446,1213

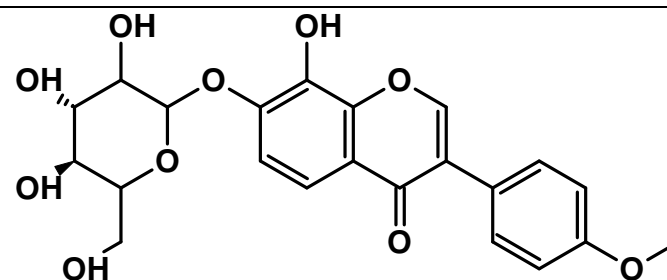


92

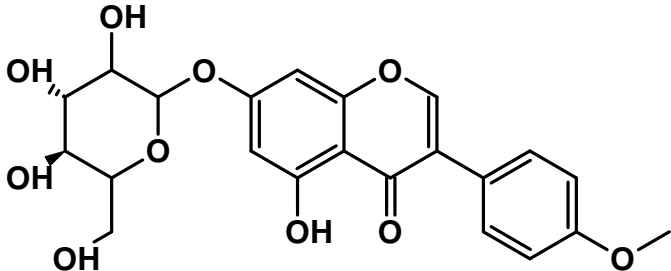
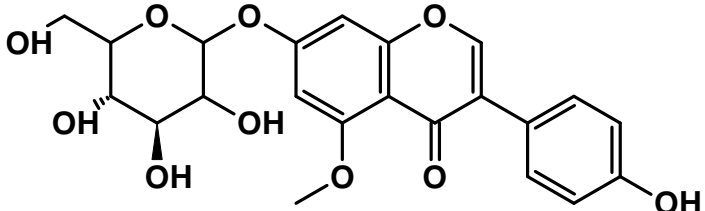
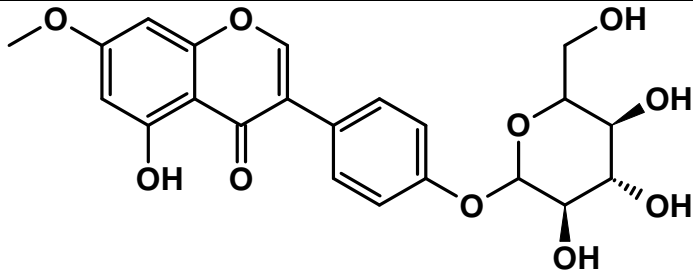
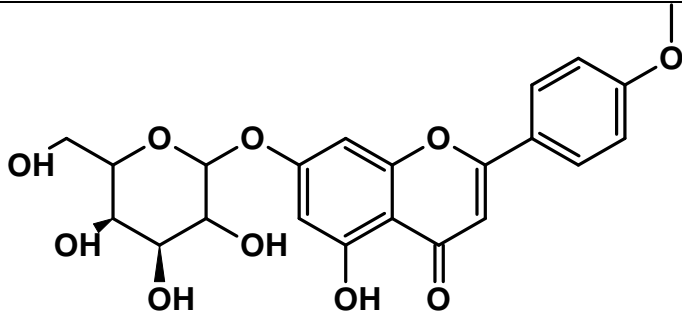
445,0730086

Retusin 7-O-Glucosid

446,1213



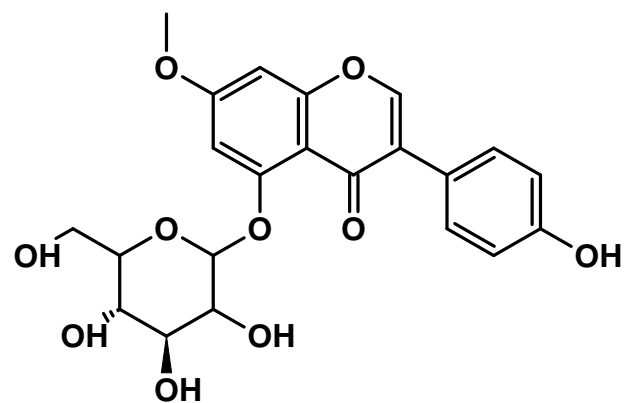
92

445,0730086	Astrosid	446,1213		92
445,0730086	5-O-Methylgenistein 7-O-Glucosid	446,1213		92
445,0730086	Prunetin 4'-O-Glucosid	446,1213		92
445,0730086	Acacetin 7-Galactosid	446,1213		92

445,0730086

Prunetinosid

446,1213

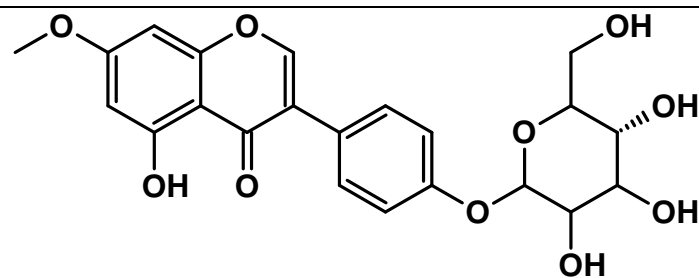


92

445,0730086

Prunetin  
4'-O-Galactosid

446,1213

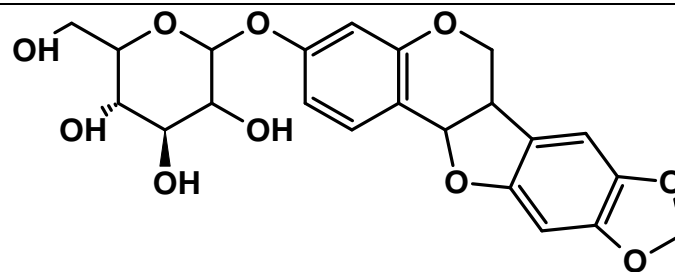


92

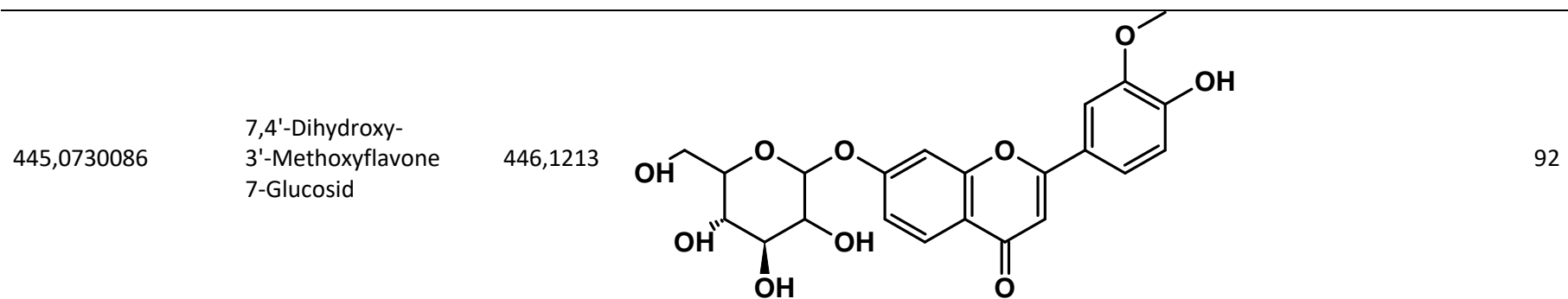
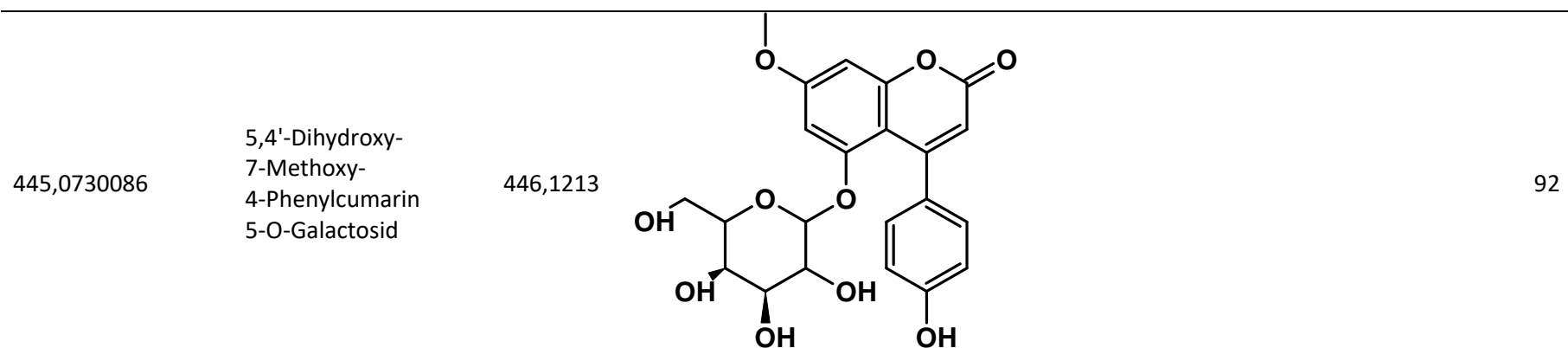
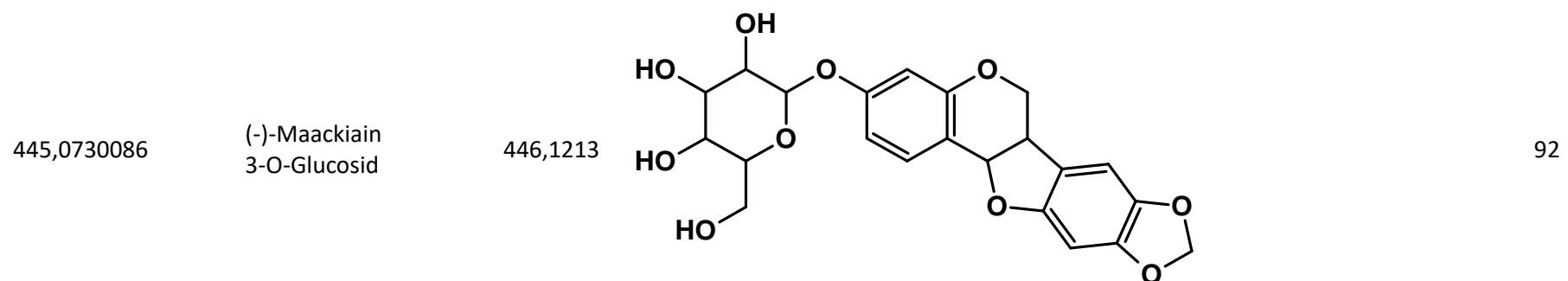
445,0730086

Sophojaponicin

446,1213



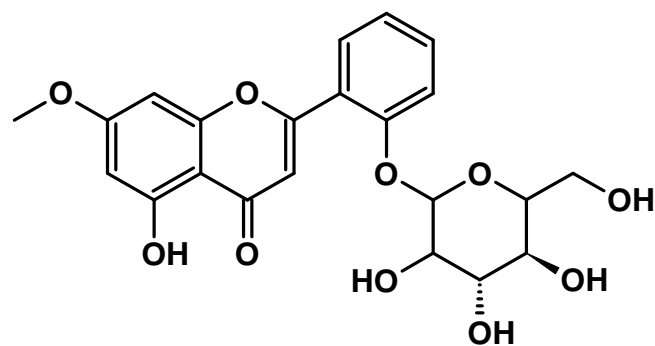
92



445,0730086

Echioidin

446,1213

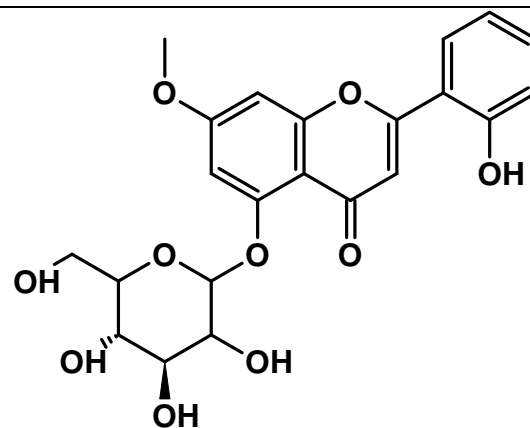


92

445,0730086

Echioidinin  
5-O-Glucosid

446,1213

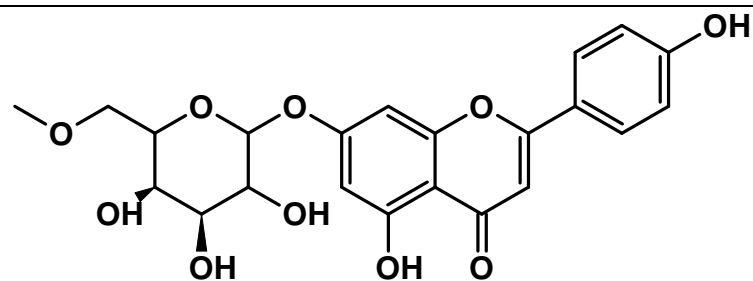


92

445,0730086

Apigenin  
7-(6''-Methyl-  
galacturonid)

446,1213

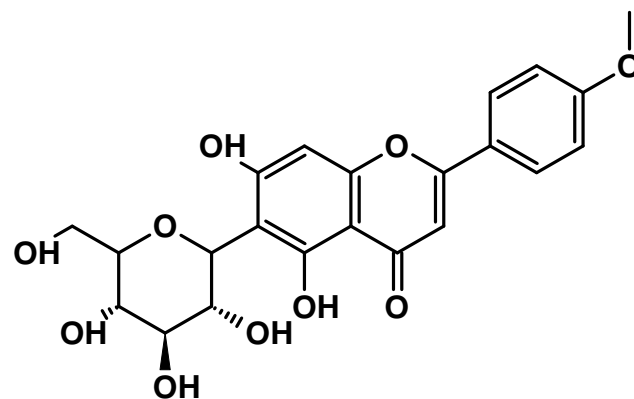


92

445,0730086

Isocytisid

446,1213

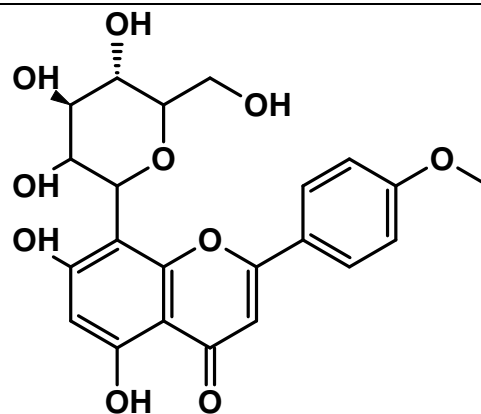


92

445,0730086

Cytisid

446,1213

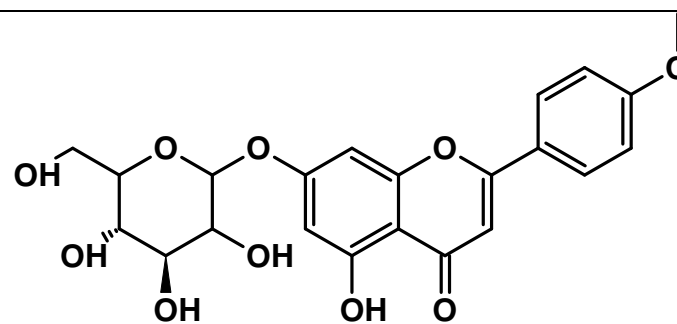


92

445,0730086

Acacetin 7-Glucosid

446,1213



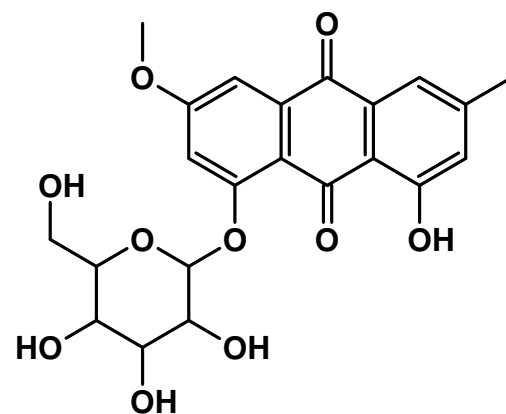
92



445,0730086

Physionin

446,1213

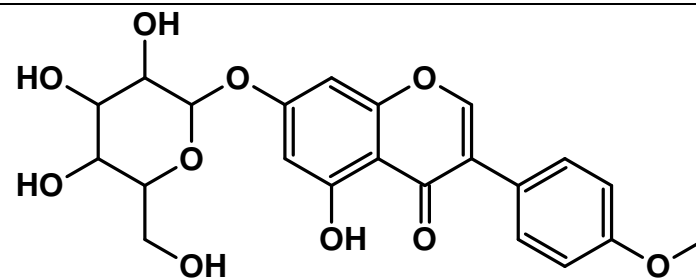


92

445,0730086

Biochanin A-  
 $\beta$ -D-Glucosid

446,1213

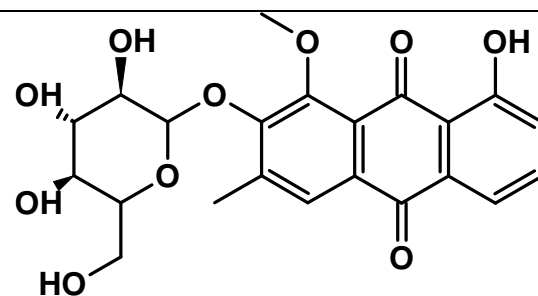


92

445,0730086

Obtusifolin 2-Glucosid

446,1213

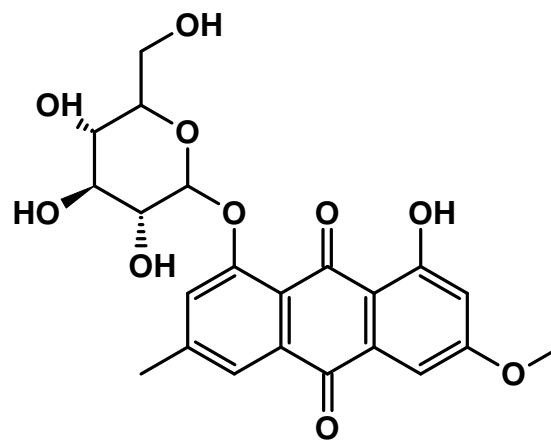


92

445,0730086

Physcion 8-Glucosid

446,1213

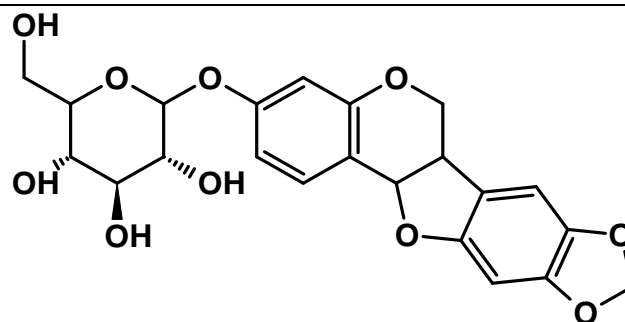


92

445,0730086

Trifolirhizin

446,1213

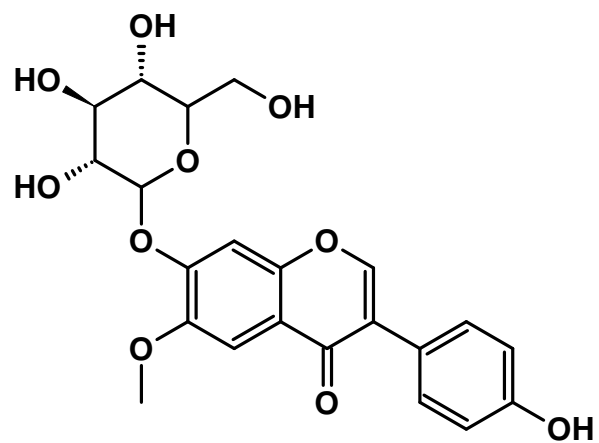


92

445,0730086

Glycitin

446,1213

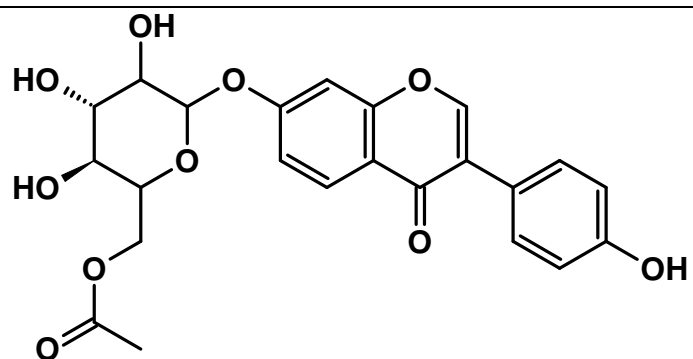


92

457,1198429

Daidzein 6''-O-Acetat

458,1213

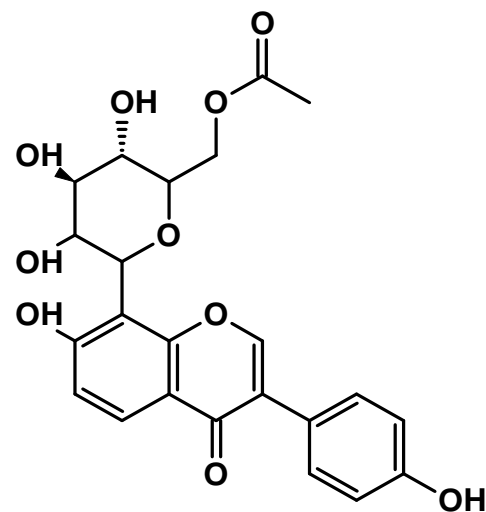


12

457,1198429

Puerarin 6''-Acetat

458,1213

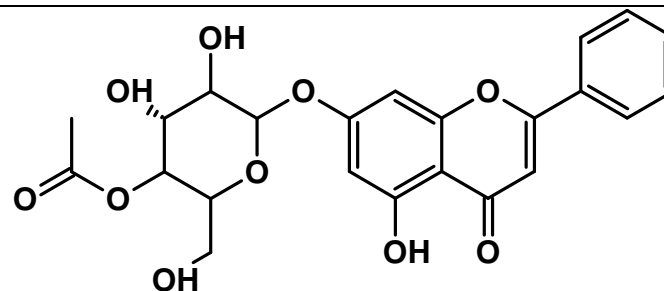


12

457,1198429

Chrysin  
7-(4''-Acetylglucosid)

458,1213

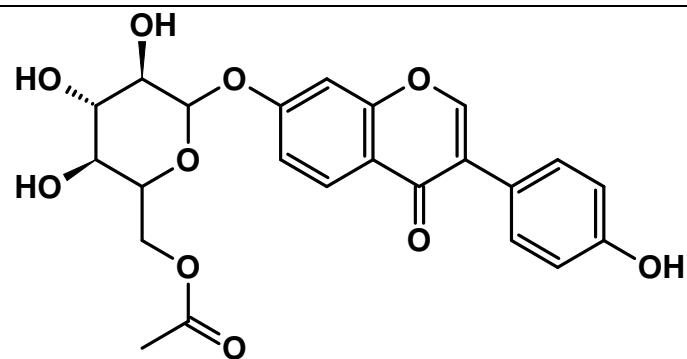


12

457,1198429

6''-O-Acetylaidzin

458,1213

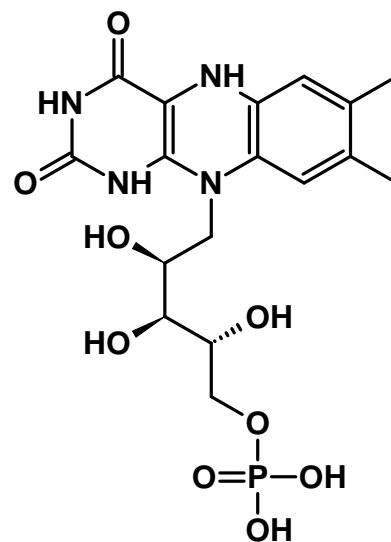


12

457,1198429

Flavinmononukleotid

458,1203

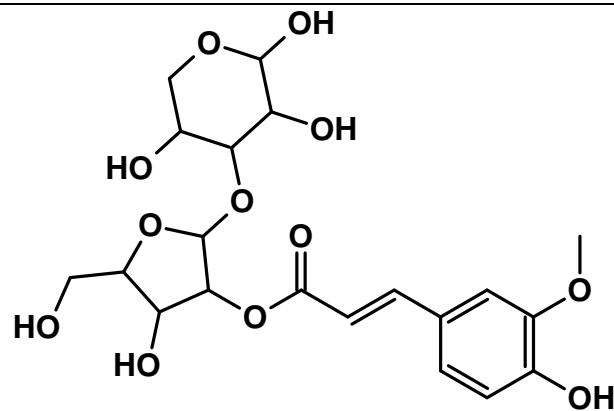


14

457,1198429

2'-(E)-Feruloyl-  
3-Arabinosylxylose

458,1424

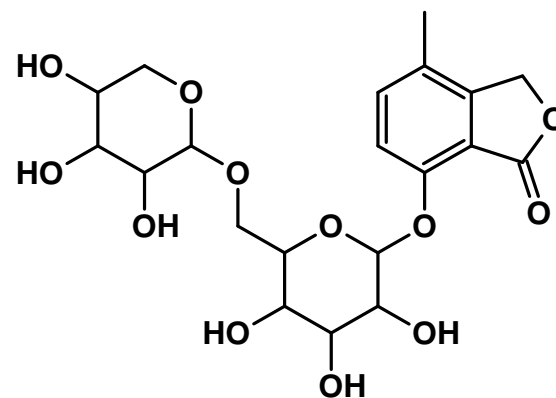


33

457,1198429

7-Hydroxy-  
4-Methylphthalide  
O-[Arabinosyl-(1->6)-  
Glucosid]

458,1424

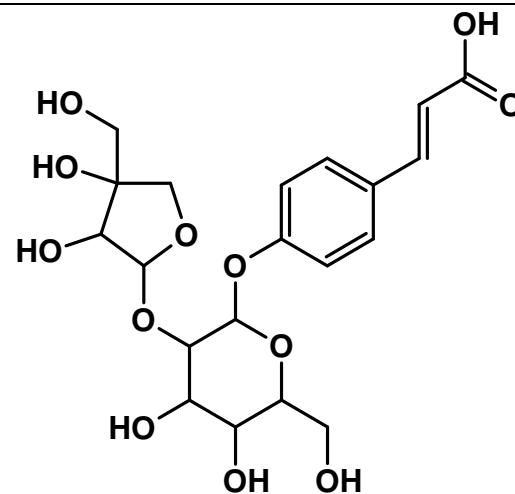


33

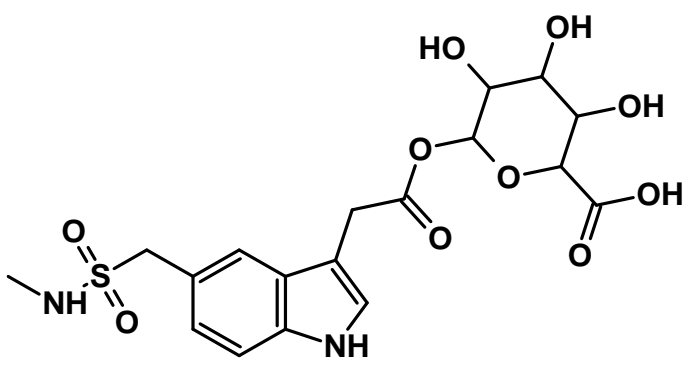
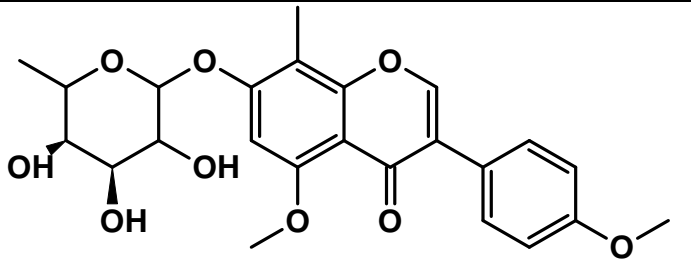
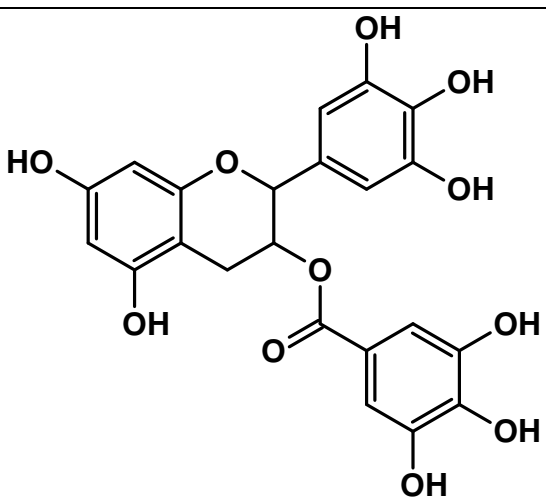
457,1198429

cis-p-Cumarsäure  
4-[Apiosyl-(1->2)-  
Glucosid]

458,1424



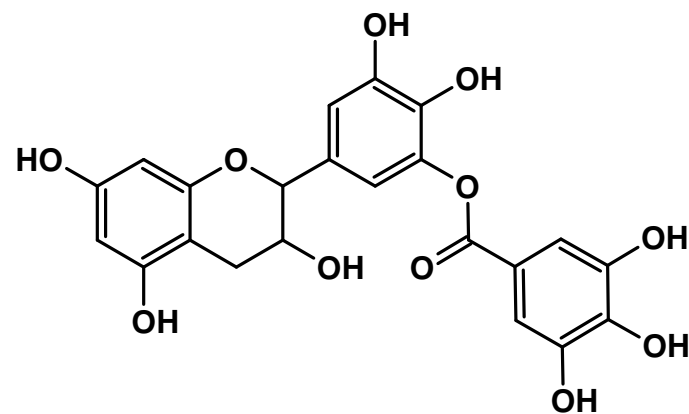
33

457,1198429	1H-Indole-3- Essigsäure, 5-[[[(methylamino)- Sulfonyl]methyl]- Glucuronid	458,0993		60
457,1198429	7-Hydroxy- 5,4'-Dimethoxy- 8-Methylisoflavone 7-O-Rhamnosid	458,0993		60
457,1198429	Gallocatechin 3-O-Gallat	458,0849		92

457,1198429

Galocatechin  
3'-O-gallat

458,0849

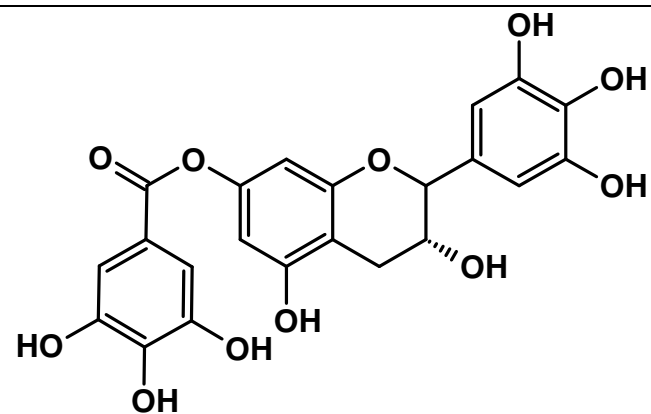


92

457,1198429

Epigallocatechin  
7-O-Gallat

458,0849



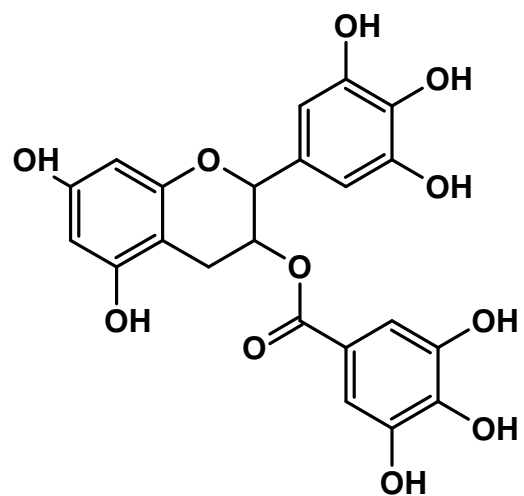
92



457,1198429

Epigallocatechin  
Gallat

458,0849

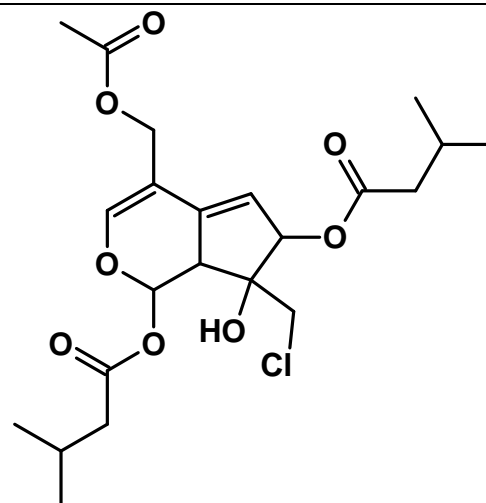


92

457,1198429

Valechlorin

458,1707

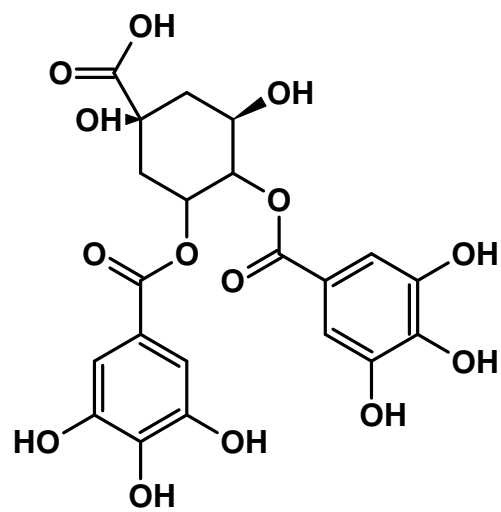


95

495,075865

3,4-Di-O-  
Galloylchinasäure

496,0853

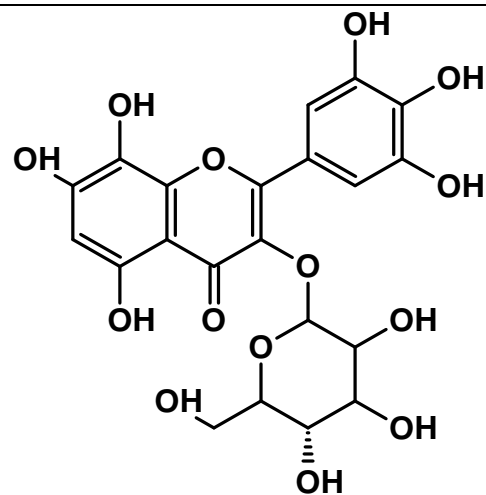


4

495,075865

Hibiscetin 3-Glucosid

496,0853

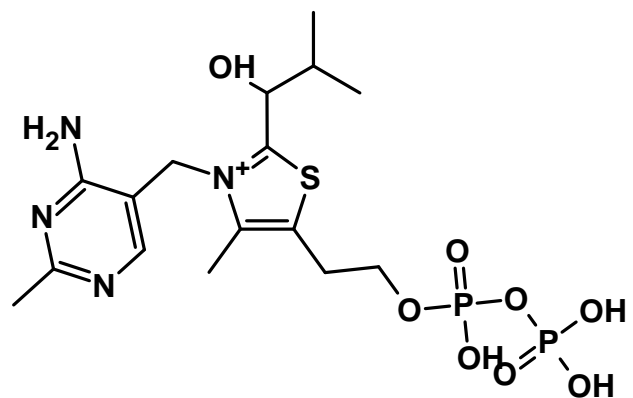


4

495,075865

2-Methyl-1-  
Hydroxypropyl-ThPP

496,0947

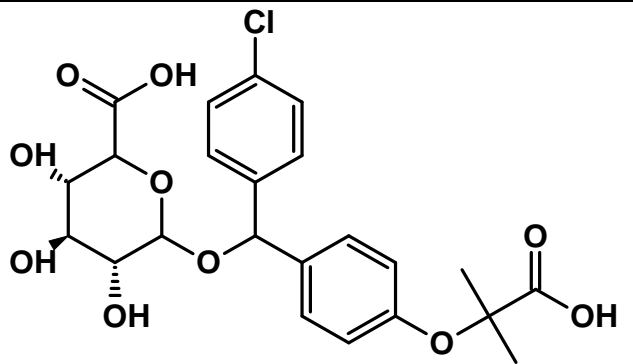


23

495,075865

Fenirofibrate  
Glucuronid

496,1136

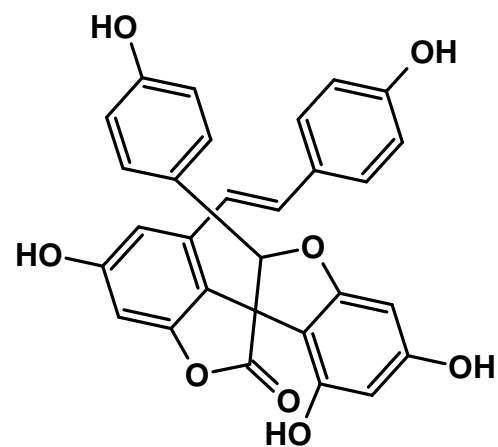


61

495,075865

Yuccaol A

496,1158

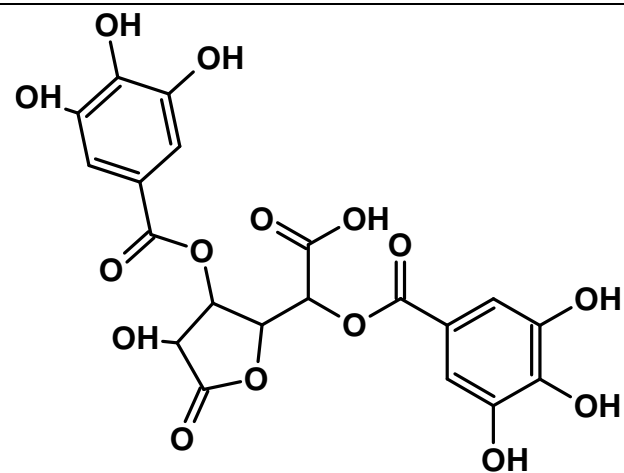


66

495,075865

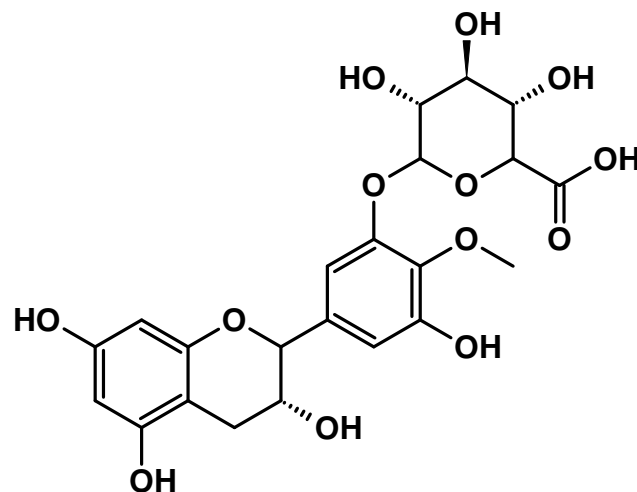
3,5-Di-O-Galloyl-  
1,4-Galactarolactone

495,0416



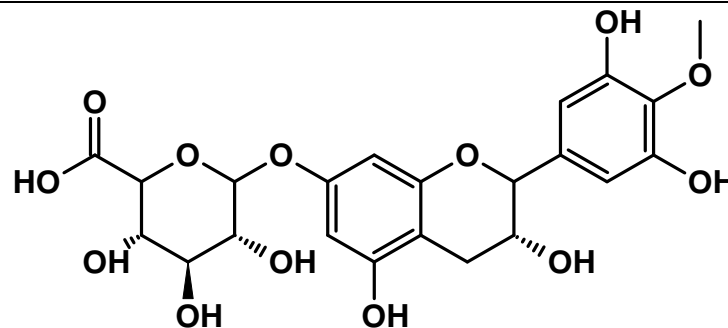
69

495,075865 4'-Methyl-  
Epigallocatechin  
3'-Glucuronid 496,1217



77

495,075865 4'-Methyl-  
Epigallocatechin  
7-Glucuronid 496,1217



77

808,4843021	PE(20:5/22:6)	809,4996	9
808,4843021	PE(22:6/20:5)	809,4996	9
808,4843021	PS(18:0/20:5)	809,5207	36
808,4843021	PS(20:2/18:3)	809,5207	36
808,4843021	PS(18:1/20:4)	809,5207	36
808,4843021	PS(22:4/16:1)	809,5207	36
808,4843021	PS(20:5/18:0)	809,5207	36

808,4843021	PS(20:4/18:1)	809,5207	36
808,4843021	PS(20:3/18:2)	809,5207	36
808,4843021	PS(20:1/18:4)	809,5207	36
808,4843021	PS(20:2/18:3)	809,5207	36
808,4843021	PS(18:4/20:1)	809,5207	36
808,4843021	PS(18:3/20:2)	809,5207	36
808,4843021	PS(18:3/20:2)	809,5207	36
808,4843021	PS(18:2/20:3)	809,5207	36
808,4843021	PS(16:1/22:4)	809,5207	36

Tabelle 6-13: Auswahl möglicher Verbindungen für die angereicherten Massen in der *gstu8* CRISPR u1-u5 #1-9-3 Linie im Vergleich zur Revertante *gstu8* CRISPR u1-u5 #1-9-4

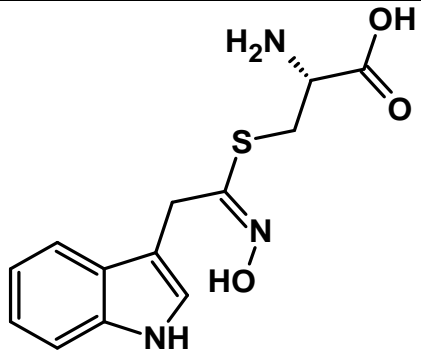
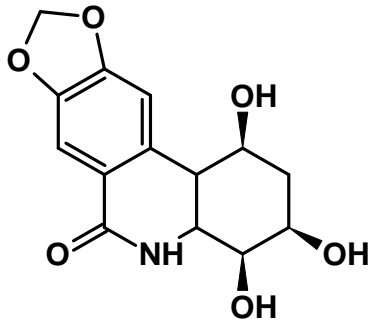
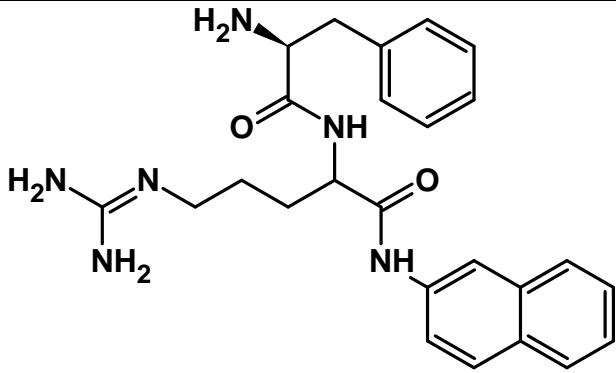
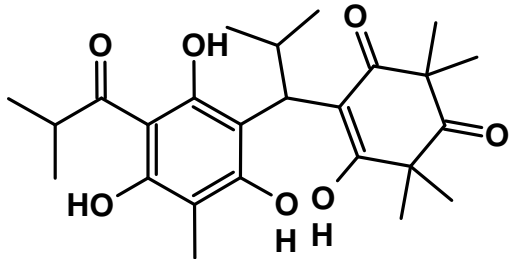
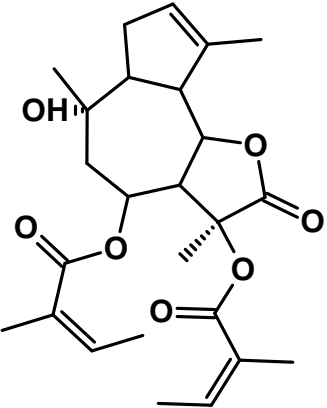
Gemessene Masse [M-H] <sup>-</sup>	Name	Masse [u]	Struktur	Abweichung [ppm]
292,0722214	S-(Indolylmethylthio- hydroximoyl)- L-Cystein	293,0834		13
292,0722214	2,7- Dideoxypancratistatin	293,0899		35

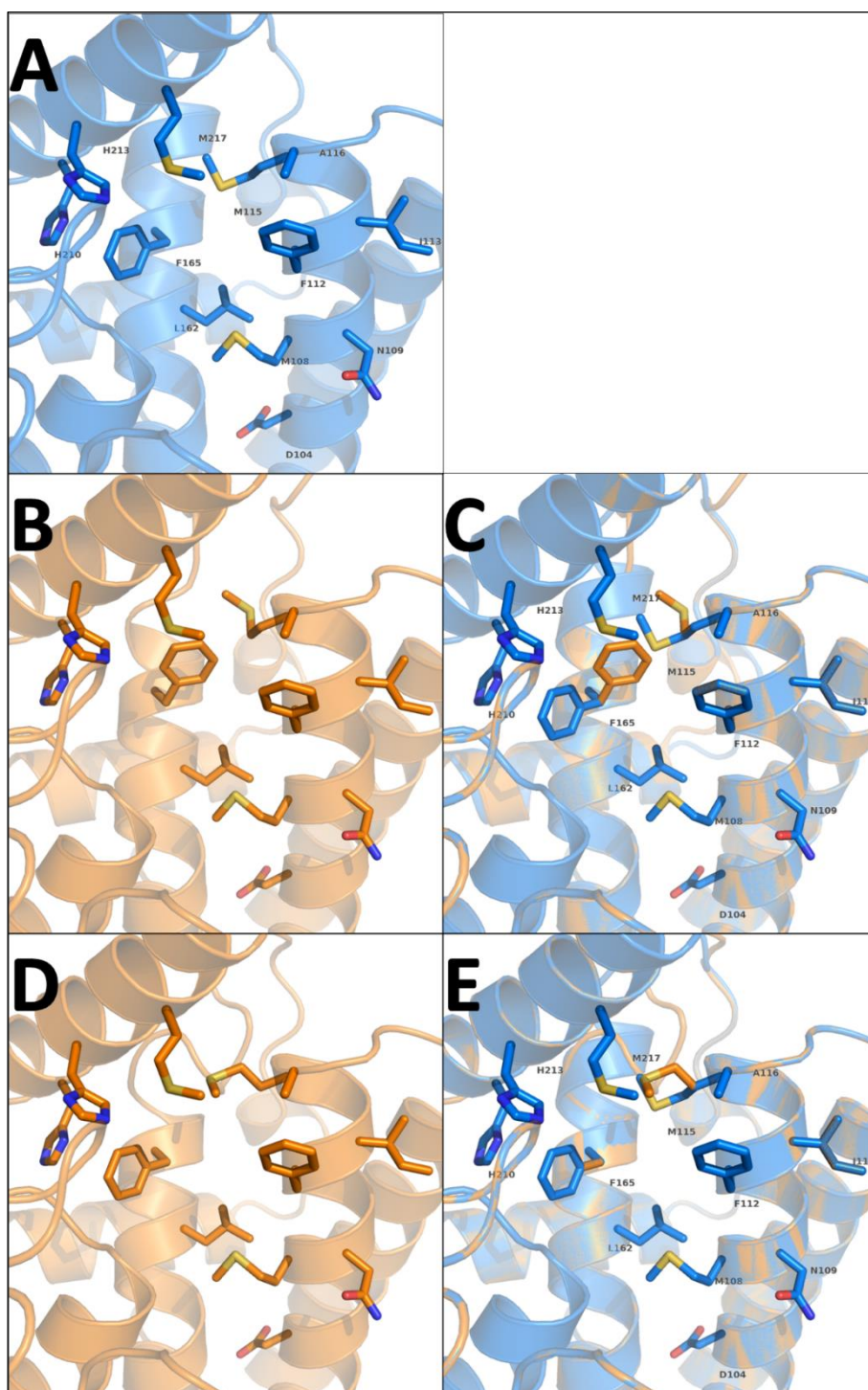
Tabelle 6-14: Auswahl möglicher Verbindungen für die abgereicherten Massen in der *gstu8* CRISPR u1-u7 #1-6-2 Linie im Vergleich zum genetischen Background *gstu8*

Gemessene Masse [M-H] <sup>-</sup>	Name	Masse [u]	Struktur	Abweichung [ppm]
445,2360321	Phenyl-Arginine-β-Naphthylamid	446,243		0
445,2360321	Semimyrtucommulon	446,2304		28

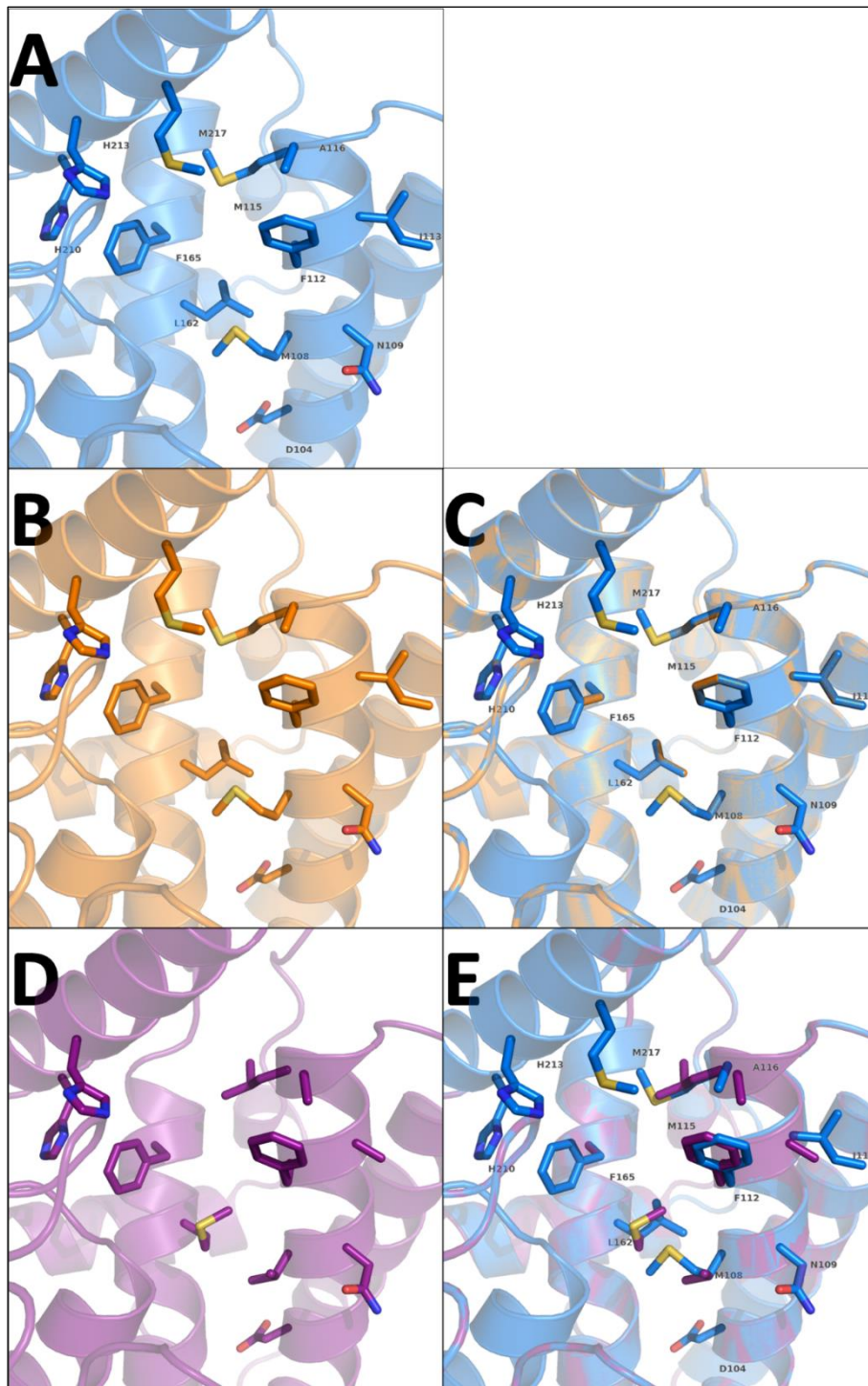


445,2360321	Gradolide	446,2304	 <p>The chemical structure of Gradolide is a complex polycyclic molecule. It features a central seven-membered ring with a hydroxyl group (-OH) attached to one of the carbons. This ring is fused to a five-membered ring containing a double bond and a methyl group. Additionally, there are two five-membered rings containing oxygen atoms, which are part of a cyclic acetal or ketal system. The molecule is further substituted with two side chains, each consisting of a carbon-carbon double bond (alkene) and a methyl group, connected via an oxygen atom to the central ring system. Stereochemistry is indicated with wedged and dashed bonds.</p>	28
-------------	-----------	----------	---	----

## 6.11 nsSNPs der AtGSTs



**Abbildung 6-12: Vergleich der H-Site der AtGSTU5 Q82H- und V130E-Variante mit der Col-0 Variante**  
 Mit Hilfe der Proteinsequenzen wurde die dreidimensionale Struktur der AtGSTU5 Col-0- (A), der Q82H- (B und C) und der V130E-Variante (D und E) mit Phyre<sup>2</sup> simuliert (Kelley et al. 2015). Gezeigt wird der Vergleich der beiden nsSNPs mit dem der Col-0-Variante (C und E)



**Abbildung 6-13: Vergleich der H-Site der AtGSTU5 R192K-Variante und AtGSTU6 mit der AtGSTU5 Col-0-Variante**

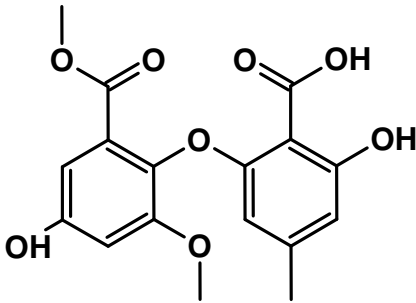
Die dreidimensionale Struktur der AtGSTU5 Col-0- (A) und der R192K-Variante (B und C) sowie der AtGSTU6 (D und E) wurden wie in Abbildung 6-12 mit Phyre<sup>2</sup> simuliert (Kelley et al. 2015). Gezeigt wird mit Fokus auf die H-Site die dreidimensionale Struktur (A, B und D) sowie der Vergleich der R192K-Variante (C) und der AtGSTU5 (E) mit der AtGSTU6.

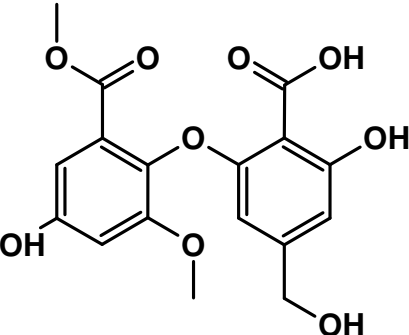
## 6.12 Natürliche Diphenylether

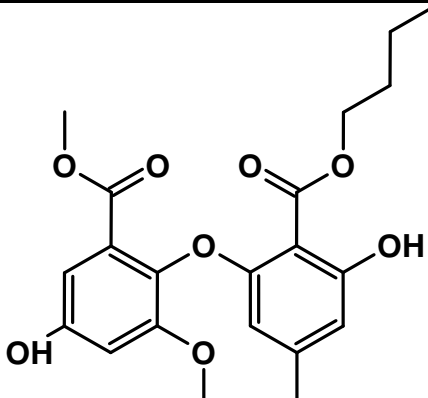
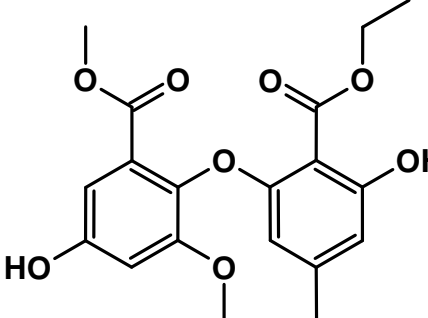
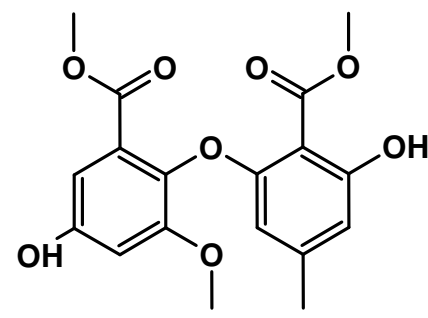
**Tabelle 6-15: Natürliche Diphenylether, deren Ursprungsorganismus und Bioaktivität**

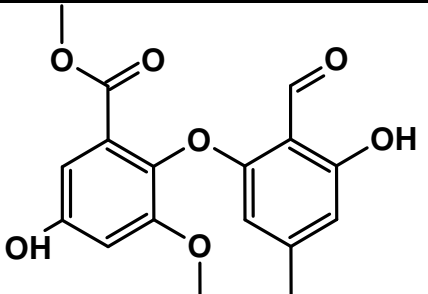
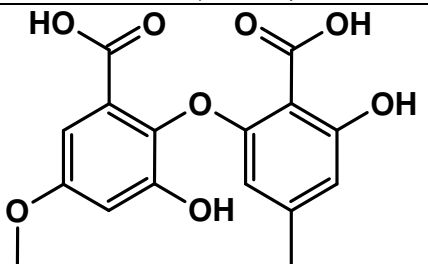
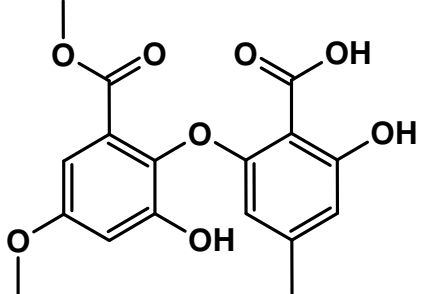
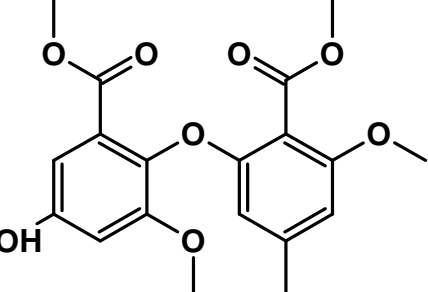
Die natürlichen Diphenylether sind aufgeführt nach deren strukturellen Ähnlichkeit mit deren Trivialnamen und der CID (Compound ID number, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), soweit vorhanden. Der Name und die CID der in dieser Arbeit verwendeten Diphenylether sind Fett-formatiert hervorgehoben. Aufgeführt werden die jeweiligen Organismen aus denen der entsprechende Diphenylether isoliert wurden. Hervorgehoben sind in **Grün Endophyten**, in **Rot Phytopathogene**, in **Orange Mangroven-assoziierte Endophyten**, in **Violett Mykobionten von Flechten** und in **Blau Algen-Endophyten**. Fett-formatiert hervorgehoben sind bei der in der Literatur beschriebenen **Bioaktivitäten auf Pflanzen** mit entsprechender effektiven Konzentrationen und Abweichungen, soweit vorhanden. Zusätzlich sind jene Bioaktivitäten gegenüber **Phytopathogene in Rot** markiert.

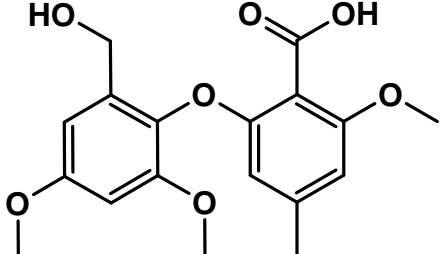
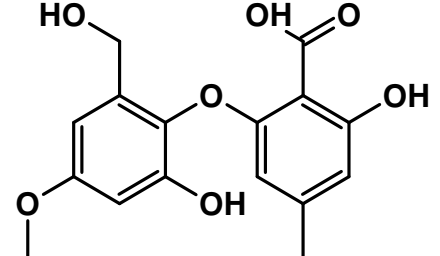
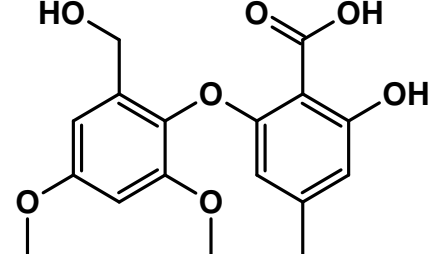
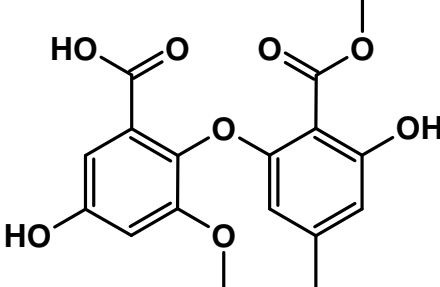

**IC<sub>50</sub>** = mittlere inhibitorische Konzentration; **MIC** = Minimale Hemm-Konzentration (minimum inhibitory concentration); **GI** = Wachstumsinhibierung (growth inhibition); **NA** = nekrotischer Bereich (necrotic area); **IZ** = Inhibierungszone (inhibitory zones); **MTT** = Reduktionstest mit 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid.

Name	CID	Struktur	Organismus	Bioaktivität	Literatur
			<i>Pestalotiopsis sp.</i>	IC <sub>50</sub> = 5,2 µg/ml (ET1/ETA-Inhibierung) IC <sub>50</sub> = 100 µg/ml (ET1/ETB-Inhibierung)	(Ogawa et al. 1995)
			<i>Aspergillus sp.</i>	<b>MIC = 100 µg/ml</b> <b>(Keimung von Kressesamen)</b>	(Hargreaves et al. 2002)
<b>Asterrinsäure</b>	<b>3080568</b>		<b>Dothideomycetes sp. LRUB20</b>	IC <sub>50</sub> > 50 µg/ml (MTT: HeLa, HuCCA-1, HepG2, T47D, MDA-MB231, S102, A549, HL-60, MOLT-3)	(Chomcheon et al. 2009)
			<i>Phoma sp.</i> SHZK-2	GI = 41 % (287,1 µM; MTT: HEPG2)	(Fang et al. 2012)
			<i>Aspergillus flavipes</i> PJ03-11	IC <sub>50</sub> > 2 mM (α-Glucosidase Inhibitor)	(Zhang et al. 2016)
			<b>Penicillium citrinum</b>	IC <sub>50</sub> = 62 µM (MTT: HeLa)	(Zheng et al. 2019)

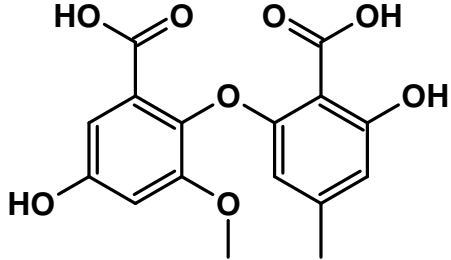
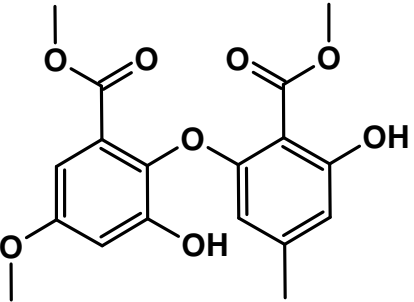
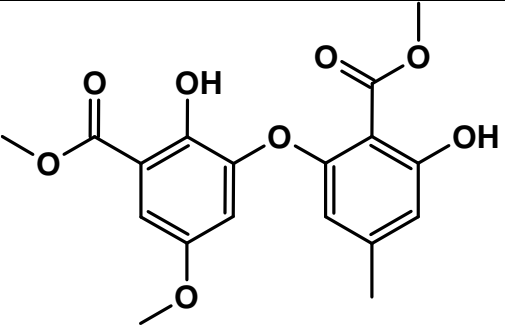
					MIC = 3,13 µg/ml ( <i>E. faecium</i> ATCC35667) MIC > 100 µg/ml ( <i>S. aureus</i> ATCC43300, <i>S. aureus</i> ATCC29213, <i>E. faecalis</i> ATCC51299, <i>V. parahaemolyticus</i> ATCC17802)	(Ji et al. 2020)
				<i>Pleosporales sp.</i> <b>SK7</b>	IC <sub>50</sub> > 50 µM (MDA-MB-435, A549)	(Wen et al. 2020)
5-Hydroxymethyl- asterrinsäure	127037582		<i>Aspergillus flavipes</i> PJ03-11	IC <sub>50</sub> > 2 mM (α-Glucosidase Inhibitor)		(Zhang et al. 2016)
Asterrinsäure- buthylester	25111483		<i>Geomyces sp.</i>	IC <sub>50</sub> > 50 µM ( <i>S. aureus</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>C. albicans</i> , <i>G. candidum</i> , <i>A. fumigatus</i> )		(Li et al. 2008)

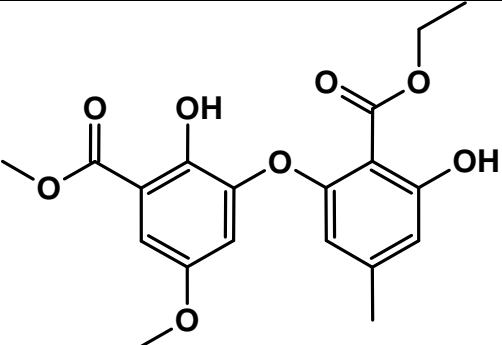
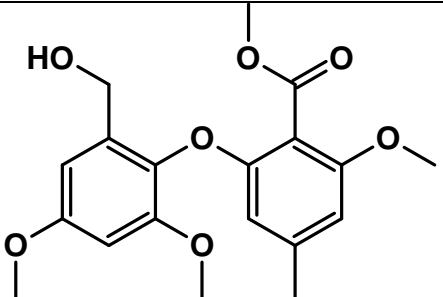
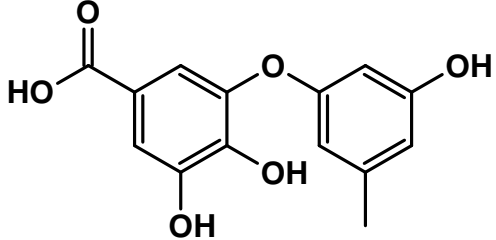
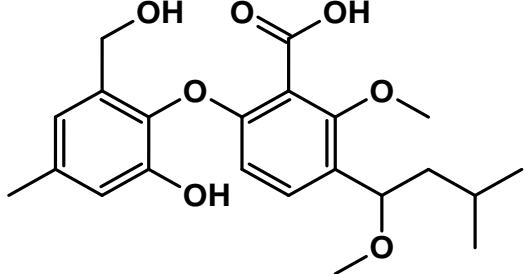
			<i>Aspergillus flavipes</i>	<p>MIC = 6,25 µg/ml (<i>S. aureus</i> ATCC43300, <i>E. faecium</i> ATCC35667)</p> <p>MIC = 12,5 µg/ml (<i>S. aureus</i> ATCC29213, <i>E. faecalis</i> ATCC51299)</p> <p>MIC &gt; 100 µg/ml (<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC17802)</p>	(Ji et al. 2020)
Asterrinsäure- ethylester	44210512		<i>Geomyces sp.</i>	<p>IC<sub>50</sub> &gt; 50 µM</p> <p>(<i>S. aureus</i>, <i>S. pneumoniae</i>, <i>E. coli</i>, <i>C. albicans</i>, <i>G. candidum</i> und <i>A. fumigatus</i>)</p>	(Li et al. 2008)
Asterrinsäure- methylester	5249326		<p><i>Dothideomycete</i> <i>sp. LRUB20</i></p> <hr/> <p><i>Phoma sp.</i> SHZK-2</p> <hr/> <p><i>Pleosporales sp.</i> <i>SK7</i></p>	<p>IC<sub>50</sub> &gt; 50 µg/ml (MTT: HeLa, HuCCA-1, HepG2, T47D, MDA-MB231, S102, A549, HL-60, MOLT-3)</p> <hr/> <p>GI = 22 % (276 µM; MTT: HEPG2)</p> <hr/> <p>IC<sub>50</sub> &gt; 50 µM (MDA-MB-435, A549)</p>	<p>(Chomcheon et al. 2009)</p> <hr/> <p>(Fang et al. 2012)</p> <hr/> <p>(Wen et al. 2020)</p>

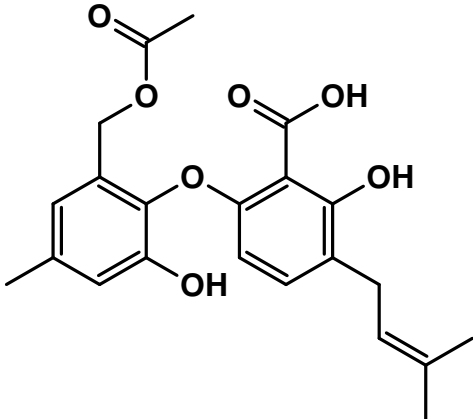
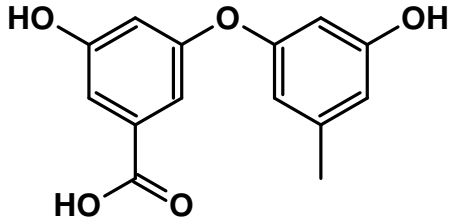
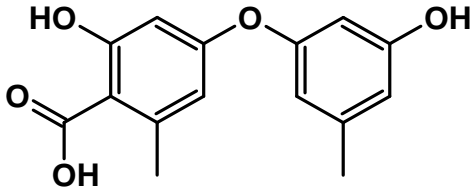
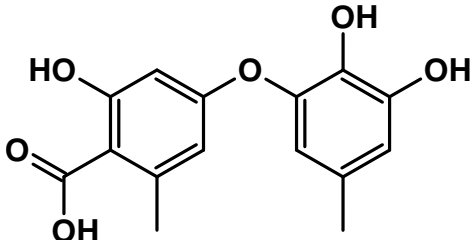
Asterrinsäurealdehyd	139586586		<i>Phoma</i> sp. SHZK-2	GI = 68 %, 300,9 $\mu$ M (MTT: HEPG2)	(Fang et al. 2012)
Barceloneinsäure B	10404622		<i>Phoma</i> sp.	keine FPTase-Inhibitor bis 300 $\mu$ M	(Jayasuriya et al. 1995)
Dechlorodihydro-maldoxin	9896724		<i>Pestalotiopsis</i> sp.	IC <sub>50</sub> = 19,0 $\mu$ g/ml (ET1/ETA-Inhibierung) IC <sub>50</sub> > 100 $\mu$ g/ml (ET1/ETB-Inhibierung)	(Ogawa et al. 1995)
Dimethylsoinsäure-dimethylether	11653696		<i>Aspergillus</i> sp. B-F-2	IC <sub>50</sub> = 76,5 $\mu$ M (MTT: K562)	(Liu et al. 2006)

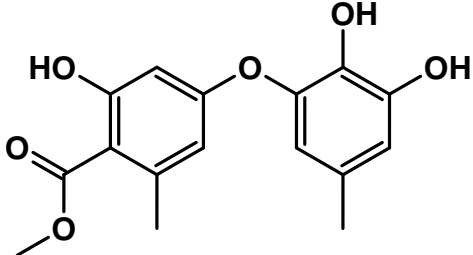
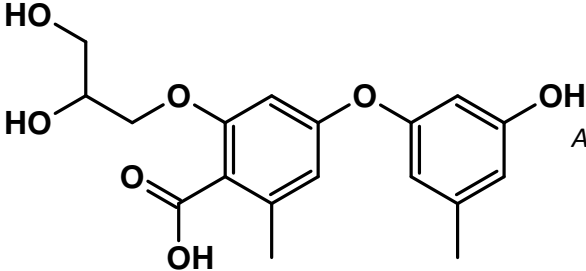
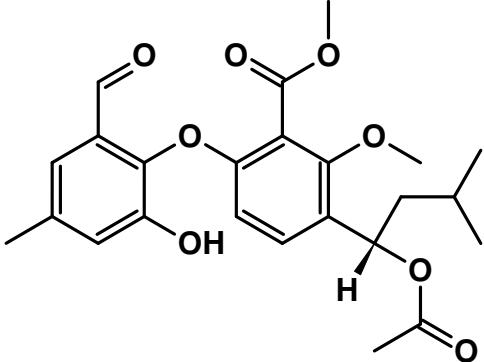
2-[2-(Hydroxymethyl)-4,6-dimethoxyphenoxy]-6-methoxy-4-methylbenzoesäure	44584158		<i>Phoma sp.</i>	keine FPTase Inhibitor bis 300 µM	(Jayasuriya et al. 1995)
Barceloneinsäure A	10358625		<i>Phoma sp.</i>	IC <sub>50</sub> = 40 µM (FPTase Inhibitor)	(Jayasuriya et al. 1995)
5'-O-Methyl-barceloneinsäure A	44584156		<i>Phoma sp.</i>	keine FPTase Inhibitor bis 300 µM	(Jayasuriya et al. 1995)
5-Hydroxy-2-(3-hydroxy-2-methoxycarbonyl-5-methylphenoxy)-3-methoxybenzoesäure	21629518		<i>Pleosporales sp. SK7</i>	IC <sub>50</sub> > 50 µM (MDA-MB-435, A549)	(Wen et al. 2020; Chen et al. 2021)
Monomethylsolin-säure	10042483		<i>Aspergillus flavipes</i> PJ03-11	IC <sub>50</sub> > 2 µM (α-Glucosidase Inhibitor)	(Zhang et al. 2016)



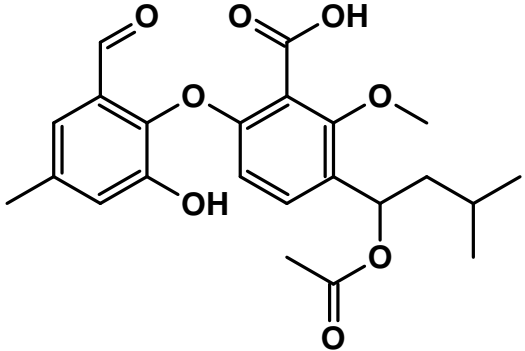
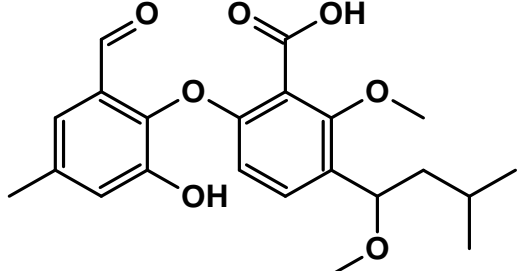
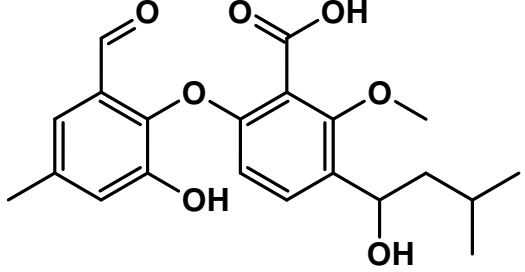
			<p><i>Aspergillus flavipes</i> HN4-13</p> <p>IC<sub>50</sub> = 9,9 ± 0,3 μM (α-Glucosidase Inhibitor) (Wang et al. 2016)</p> <hr/> <p>MIC = 12,5 μg/ml (<i>S. aureus</i> ATCC33591)</p> <p>MIC = 50 μg/ml (<i>S. aureus</i> ATCC29213)</p> <p>MIC &gt; 100 μg/ml (<i>S. aureus</i> ATCC43300, <i>S. aureus</i> ATCC2923, <i>E. faecalis</i> ATCC51299, <i>E. faecium</i> ATCC35667, <i>V. parahaemolyticus</i> ATCC17802) (Ji et al. 2020)</p>
Pestalotether D	44715302		<p><i>Pestalotiopsis</i> sp. PSU-MA69</p> <p>MIC &gt; 200 μg/ml (<i>C. neoformans</i>) (Klaiklay et al. 2012; Chen et al. 2021)</p> <hr/> <p><i>Pestalotiopsis theae</i></p> <p>IC<sub>50</sub> = 60,8 μM (MTT: HeLa) (Guo et al. 2020a)</p> <p>IC<sub>50</sub> = 22,6 μM (MTT: MCF-7)</p>
Pestalotether E	146682477		<p><i>Pestalotiopsis</i> sp.</p> <p>IC<sub>50</sub> &gt; 40 μM (HL-60, U87MG, MDA-MB-231, A549, HEP-3B, SW480, NCM460) (Yang et al. 2019)</p>

Pestalotether F	146682478		<i>Pestalotiopsis sp.</i>	$IC_{50} = 5,05 \mu M$ (HL-60) $IC_{50} = 19,22 \mu M$ (HEP-3B) $IC_{50} > 40 \mu M$ (U87MG, MDA-MB-231, A549, SW480, NCM460)	(Yang et al. 2019)
Methyl 2-[2-(hydroxymethyl)-4,6-dimethoxyphenoxy]-6-methoxy-4-benzoatesäuremethylester	44584155		<i>Phoma sp.</i>	keine FPTase Inhibitor-Aktivität < 300 $\mu M$	(Jayasuriya et al. 1995)
3,4-Dihydroxy-5-(3-hydroxy-5-methylphenoxy)-benzoessäure	139267054		<i>Penicillium chrysogenim</i> MCCC 3A00292	$IC_{50} > 20 \mu M$ (MTT: PANC-1, HeLa-S3)	(Niu et al. 2019)
6-[2-Hydroxy-6-(hydroxymethyl)-4-methylphenoxy]-2-methoxy-3-(1-methoxy-3-methylbutyl)-benzoessäure	45782745		<i>Penicillium aculeatum</i>	$MIC = 50 \mu g/ml$ ( <i>M. tuberculosis</i> ) $IC_{50} = 24,97 \mu M$ (Resazurin KB-Zellen) $IC_{50} = 45,35 \mu M$ (Resazurin: MCF-7) $IC_{50} = 25,02 \mu M$ (GFP Fluoreszenz: Vero)	(Daengrot et al. 2016)

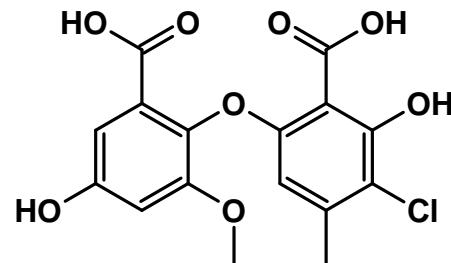
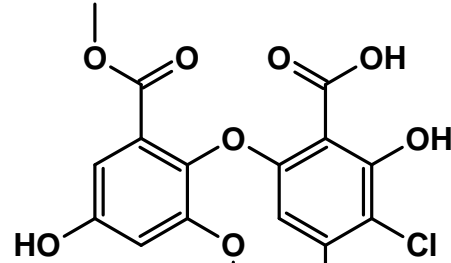
7-O-Acetylsecopenicillid C	71460590		<i>Penicillium sp</i> <i>MA-37</i>	MIC = 64 µg/ml ( <i>M. luteus</i> ) MIC = 16 µg/ml ( <i>E. coli</i> )	(Zhang et al. 2012; Wang et al. 2020; Chen et al. 2021)
3-Hydroxy-5-(3-hydroxy-5-methylphenoxy)-benzoesäure	139584728		<i>Penicillium chrysogenum</i> <i>MCCC 3A00292</i>	IC <sub>50</sub> > 20 µM (MTT: PANC-1, HeLa-S3)	(Niu et al. 2019)
Deoxygerfelin	23786300		<i>Aspergillus versicolor</i>	IC <sub>50</sub> < 0,36 µM (MTT: Maus-Lymphom Zelllinie L5178Y)	(Ebada et al. 2018; El-hawary et al. 2020)
Gerfelin	10149453		<i>Aspergillus versicolor</i>	IC <sub>50</sub> > 30 µM (MTT: Maus-Lymphom Zelllinie L5178Y)	(Ebada et al. 2018; El-hawary et al. 2020)

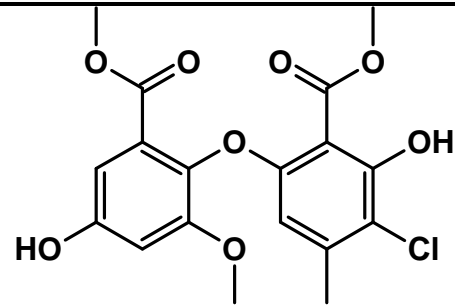
Methylgerfelin	11779786		<i>Aspergillus sydowii</i>	$IC_{50} = 13,33 \pm 0,87 \mu M$ (MTT: HL-60) $IC_{50} = 23,03 \pm 1,34 \mu M$ (MTT: K562)	(Wang et al. 2018b)
Glyceryl-Diorcinolsäure	156582263		<i>Aspergillus sydowii</i>	$IC_{50} = 3,36 \pm 0,68 \mu M$ (MTT: A549) $IC_{50} = 21,22 \pm 1,25 \mu M$ (MTT: HL-60)	(Wang et al. 2018b)
Secopenicilide B	102251594		<i>Penicillium aculeatum</i>	$IC_{50} = 32,71 \mu M$ (Resazurin: KB-Zellen) $IC_{50} = 56,65 \mu M$ (Resazurin: MCF-7) $IC_{50} = 25,96 \mu M$ (GFP-Fluoreszenz: Vero)	(Daengrot et al. 2016)

---

Tenellic acid C	10836384		<i>Penicillium aculeatum</i>	MIC = 50 µg/ml ( <i>M. tuberculosis</i> )	(Daengrot et al. 2016)
Tenellic acid A	10573163		<i>Penicillium aculeatum</i>	MIC = 50 µg/ml ( <i>M. tuberculosis</i> ) IC50 = 45,99 µM (GFP-Fluoreszenz: Vero)	(Daengrot et al. 2016)
Tenellic acid B	10834132		<i>Penicillium sp.</i> <b>MA-37</b>	MIC = 256 µg/ml ( <i>M. luteus</i> ) MIC = 32 µg/ml ( <i>E. coli</i> )	(Zhang et al. 2012; Chen et al. 2021)

---

4'-Chloroasterrinsäure	156582485		<i>Aspergillus flavipes</i>	<p>MIC = 25 µg/ml (<i>S. aureus</i> ATCC29213)</p> <p>MIC = 12,5 µg/ml (<i>S. aureus</i> ATCC33591)</p> <p>MIC = 12,5 µg/ml (<i>S. aureus</i> ATCC2923)</p> <p>MIC &gt; 100 µg/ml (<i>S. aureus</i> ATCC43300, <i>E. faecalis</i> ATCC51299, <i>E. faecium</i> ATCC35667, <i>V. parahaemolyticus</i> ATCC17802)</p>	(Ji et al. 2020)
Chloroasterrinsäure	24175292		<i>Aspergillus flavipes</i>	<p>IC<sub>50</sub> &gt; 2 mM (α-Glucosidase Inhibitor)</p> <p>MIC = 50 µg/ml (<i>S. aureus</i> ATCC29213, <i>S. aureus</i> ATCC33591)</p> <p>MIC &gt; 100 µg/ml (<i>S. aureus</i> ATCC43300, <i>S. aureus</i> ATCC2923, <i>E. faecalis</i> ATCC51299, <i>E. faecium</i> ATCC35667, <i>V. parahaemolyticus</i> ATCC17802)</p>	(Zhang et al. 2016)
Chloroasterrinsäure-methylester	10475888		<i>Aspergillus sp.</i>	<p>IC<sub>50</sub> &gt; 25,96 ± 0,32 µM (MDA-MB-435)</p> <p>IC<sub>50</sub> &gt; 50 µM (A549)</p> <p>MIC = 10 µg/ml <b>(Keimung von Kressesamen)</b></p>	(Wen et al. 2020)
					(Hargreaves et al. 2002)



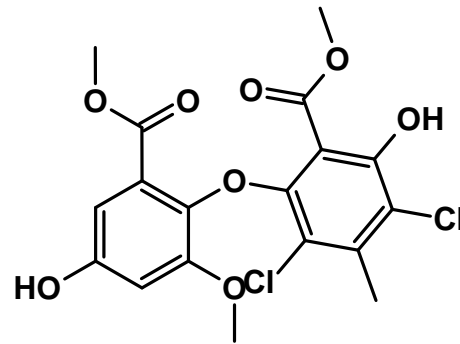
*Aspergillus flavipes*  
PJ03-11

IC<sub>50</sub> > 2 mM  
(α-Glucosidase Inhibitor  
Aktivität)

(Zhang et al.  
2016)

Dichloroasterrinsäure-  
methylester

637419



*Aspergillus sp.*

MIC = 12 µg/ml  
(Keimung von  
Kressesamen)

(Hargreaves et  
al. 2002)

*Aspergillus flavipes*  
PJ03-11

IC<sub>50</sub> = 1,45 ± 0,07 mM  
(α-Glucosidase Inhibitor)

(Zhang et al.  
2016)

*Aspergillus flavipes*  
HN4-13

IC<sub>50</sub> = 90 ± 3 µM  
(α-Glucosidase Inhibitor)

(Wang et al.  
2016)

IC<sub>50</sub> = 9,33 ± 1,66 µg/ml  
(*B. cinerea*)

IC<sub>50</sub> = 30,43 ± 1,87 µg/ml  
(*M. fructicola*)

IC<sub>50</sub> = 35,15 ± 8,41 µg/ml  
(*S. sclerotiorum*)

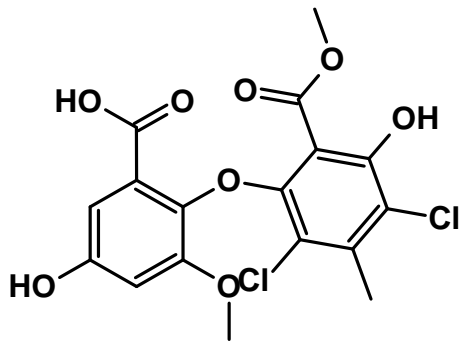
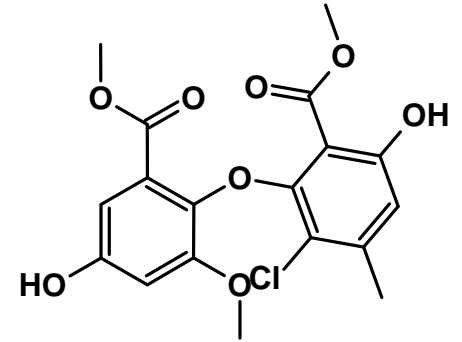
IC<sub>50</sub> = 63,17 ± 7,41 µg/ml  
(*S. trifoliorum*)

*Aspergillus*  
*capensis*

(Qin et al.  
2019; El-  
hawary et al.  
2020; Xu et al.  
2021)

			MIC = 12,5 µg/ml ( <i>S. aureus</i> ATCC43300) MIC = 50 µg/ml ( <i>E. faecium</i> ATCC35667)	
			MIC > 100 µg/ml ( <i>S. aureus</i> ATCC29213, <i>E. faecalis</i> ATCC51299, <i>V. parahaemolyticus</i> ATCC17802)	(Ji et al. 2020)
<b>Geodinhydrat</b>	<b>23757113</b>		<i>Aspergillus flavipes</i> PJ03-11	IC <sub>50</sub> = 0,09 ± 0,001 mM (α-Glucosidase Inhibitor) (Zhang et al. 2016)
Neogeodinhydrat	127028293		<i>Aspergillus flavipes</i> PJ03-11	IC <sub>50</sub> = 1,48 ± 0,05 mM (α-Glucosidase Inhibitor) (Zhang et al. 2016)
			<i>Aspergillus flavipes</i> HN4-13	IC <sub>50</sub> = 55 ± 2 µM (α-Glucosidase Inhibitor) (Wang et al. 2016)

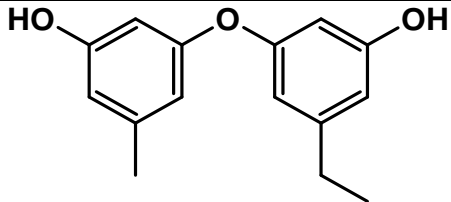
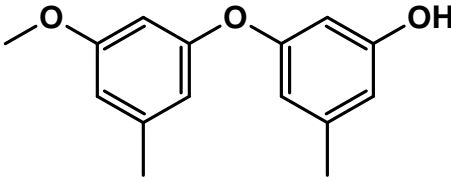
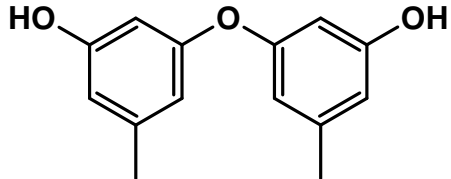


			<p>MIC = 3,13 µg/ml (<i>S. aureus</i> ATCC33591)</p> <p>MIC = 25 µg/ml (<i>S. aureus</i> ATCC29213)</p> <p>MIC = 50 µg/ml (<i>S. aureus</i> ATCCC2923)</p> <p>MIC &gt; 100 µg/ml (<i>S. aureus</i> ATCC43300, <i>E. faecalis</i> ATCC51299, <i>E. faecium</i> ATCC35667, <i>V. parahaemolyticus</i> ATCC17802)</p>	(Ji et al. 2020)
			<p><math>IC_{50} = 36,25 \pm 1,44 \mu\text{g/ml}</math> (<i>B. cinerea</i>)</p> <p><math>IC_{50} = 65,00 \pm 4,27 \mu\text{g/ml}</math> (<i>M. fructicola</i>)</p> <p><math>IC_{50} = 17,51 \pm 0,79 \mu\text{g/ml}</math> (<i>S. sclerotiorum</i>)</p> <p><math>IC_{50} = 9,93 \pm 1,97 \mu\text{g/ml}</math> (<i>S. trifoliorum</i>)</p>	(Qin et al. 2019; El-hawary et al. 2020; Xu et al. 2021)
Penicilithier	26183523		<p>MIC = 12,5 µg/ml (<i>S. aureus</i> ATCC43300)</p> <p>MIC = 50 µg/ml (<i>S. aureus</i> ATCC29213, <i>E. faecium</i> ATCC35667)</p> <p>MIC &gt; 100 µg/ml (<i>E. faecalis</i> ATCC51299, <i>V. parahaemolyticus</i> ATCC17802)</p>	(Ji et al. 2020)

Pestalotether A	57342094		<i>Pestalotiopsis sp.</i> PSU-MA69	MIC = 200 µg/ml ( <i>C. neoformans</i> )	(Klaiklay et al. 2012; Chen et al. 2021)
Pestheinsäure	9842980		<i>Pestalotiopsis sp.</i>	IC <sub>50</sub> = 5,2 µg/ml (ET1/ETA-Inhibierung) IC <sub>50</sub> = 100 µg/ml (ET1/ETB-Inhibierung)	(Ogawa et al. 1995)
			<i>Pestalotiopsis theae</i>	<b>Wurzelwachstum bei</b> <b>100 µg/ml</b> <b>Salat: 1,61-fach</b> <b>Reis: 1,32-fach</b>	(Shimada et al. 2001)
			<i>Pestalotiopsis sp.</i> PSU-MA69	MIC = 200 µg/ml ( <i>C. neoformans</i> )	(Klaiklay et al. 2012; Chen et al. 2021)
Pestalotether B	57342095		<i>Pestalotiopsis sp.</i> PSU-MA69	MIC = 200 µg/ml ( <i>C. neoformans</i> )	(Klaiklay et al. 2012; Chen et al. 2021)

Aspergillusether C	139590215		<i>Aspergillus unguis</i> PSU-RSPG204	<p>MIC = 64 µg/ml (<i>S. aureus</i>, Methicillin resistente <i>S. aureus</i>, <i>C. neoformans</i>, <i>P. marneffii</i>)</p> <p>MIC = 128 µg/ml (<i>C. albicans</i>, (Phainuphong <i>M. gypseum</i>,) et al. 2017)</p> <p>IC<sub>50</sub> = 63,74 µM (Resazurin: KB)</p> <p>IC<sub>50</sub> = 51,27 µM (Resazurin: MCF-7)</p> <p>IC<sub>50</sub> = 36,02 µM (GFP-Fluoreszenz: Vero)</p>
Aspergillusether D	139590216		<i>Aspergillus unguis</i> PSU-RSPG204	<p>MIC = 8 µg/ml (<i>C. neoformans</i>)</p> <p>MIC = 16 µg/ml (<i>C. albicans</i>, <i>P. marneffii</i>)</p> <p>MIC = 64 µg/ml (<i>S. aureus</i>)</p> <p>MIC = 128 µg/ml (Methicin resistente <i>S. aureus</i>) (Phainuphong et al. 2017)</p> <p>keine Aktivität (<i>M. gypseum</i>)</p> <p>IC<sub>50</sub> = 37,33 µM (Resazurin: KB-Zellen)</p> <p>IC<sub>50</sub> = 111,26 µM (GFP-Floreszenz: Vero)</p>

Aspergillusether E			<i>Aspergillus unguis</i> PSU-MF16	MIC = 16 µg/ml ( <i>S. aureus</i> , Methicillin resistente <i>S. aureus</i> , <i>M.</i> <i>gypseum</i> ) MIC = 32 µg/ml ( <i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i> )	(Saetang et al. 2021)
Aspergillusether F			<i>Aspergillus unguis</i> PSU-MF16	MIC = 64 µg/ml ( <i>S. aureus</i> , Methicillin resistente <i>S. aureus</i> )	(Saetang et al. 2021)
Buellin	44614015		<i>Diplocicia canescens</i>	IC <sub>50</sub> = 0,25 ± 0,1 µM (MTT: B16 Zelllinie) IC <sub>50</sub> > 10 µM (MTT: HaCaT Zelllinie)	Millot et al. 2009
1-Methoxy-3-(3-methoxy-5-methylphenoxy)-5-methylbenzol	155521460		<i>Trichoderma erinaceum</i>	IC <sub>50</sub> = 12,5 µM (MTT: MDA-MB-435)	(Guo et al. 2020b)

7-Ethyldiorcinol	156581840		<i>Aspergillus sydowii</i>	IC <sub>50</sub> = 16,13 ± 1,24 µM (MTT: A549)	(Wang et al. 2018b)
Cordyol E	71665371		<i>Penicillium expansum</i>	IC <sub>50</sub> > 100µM (MTT: HL-60)	(Wang et al. 2012; Chen et al. 2021)
			<i>Trichoderma erinaceum</i>	IC <sub>50</sub> = 41,4 µM (MTT: MDA-MB-435)	(Guo et al. 2020b)
Diorcinol	23396613		<i>Aspergillus sp.</i>	IC <sub>50</sub> = 20,1 µM (ThT Assay: Aβ42 Aggregationsinhibierung)	(Zhao et al. 2014)
			<i>Aspergillus versicolor</i>	Kein Effekt auf PC3, A549, A2780, MDA-MB-231, HEPG2 sowie auf <i>C. albicans</i>	(Li et al. 2015)

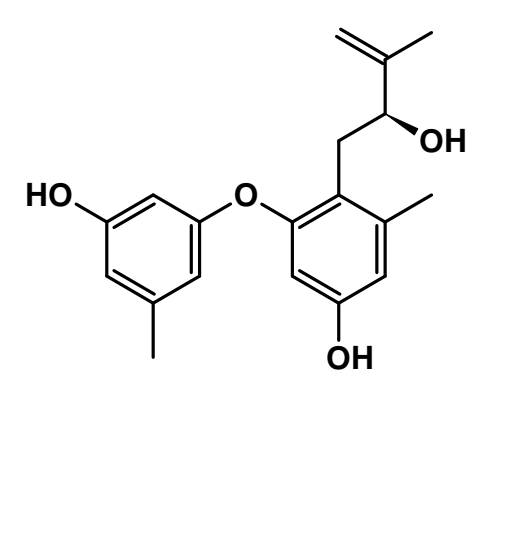
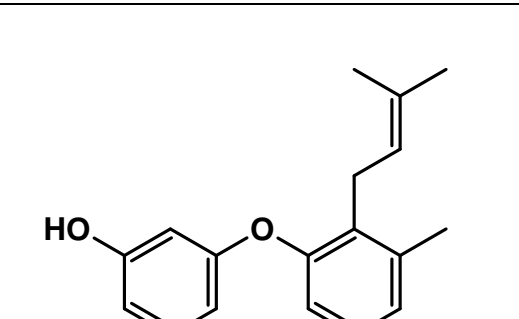
	MIC = 25 µg/ml ( <i>B. cereus</i> )	
	MIC > 25 µg/ml ( <i>C. capsici</i> , <i>C. gloeosporioides</i> )	
<i>Gibellula sp.</i> BCC36964	MIC > 50 µg/ml ( <i>A. brassicicola</i> )	(Bunbamrung et al. 2015)
	IC <sub>50</sub> = 18,47 (Resazurin: NCI-H187)	
	IC <sub>50</sub> = 18,59 µg/ml (Resazurin: MCF-7)	
	IC <sub>50</sub> > 50 µg/ml (Resazurin: KB, Vero)	
<i>Aspergillus austroafricanus</i>	MIC = 34,8 µM ( <i>B. subtilis</i> 168 trpC2)	(Ebrahim et al. 2016)
<i>Aspergillus flavus</i> QQSG-3	IC <sub>50</sub> = 165,2 µM (α-Glucosidase-Inhibitor)	(Wu et al. 2018)
<i>Aspergillus sydowii</i>	IC <sub>50</sub> = 15,51 ± 1,59 µM (MTT: A549)	(Wang et al. 2018b)
<i>Aspergillus flocculus</i>	MIC = 108 µM ( <i>T. brucei</i> )	(Tawfike et al. 2019; El- hawary et al. 2020)
<i>Penicillium chrysogenim</i> MCCC 3A00292	IC <sub>50</sub> = 16,41 µM (MTT: BIU-87)	(Niu et al. 2019)
	IC <sub>50</sub> > 20 µM (MTT: ECA109, BEL-7402, PANC-1, HeLa-S3)	

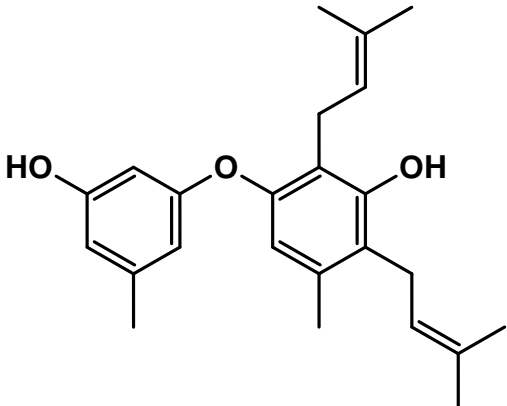
9-Acetyldiorcinol B	139584153		<i>Aspergillus tennesseensis</i>	<p>MIC = 8 µg/ml (<i>R. solanacearum</i>)</p> <p>MIC = 16 µg/ml (<i>B. subtilis</i>, <i>E. coli</i>)</p> <p>MIC = 32 µg/ml (<i>P. aeruginosa</i>, <i>G. graminis</i>, <i>M. hiemalis</i>)</p> <p>MIC = 64 µg/ml (<i>T. basicola</i>)</p> <p>MIC &gt; 64 µg/ml (<i>A. alternate</i>, <i>C. heterostrophus</i>, <i>G. cingulata</i>)</p>	(Li et al. 2018b)	
		<i>Aspergillus sulphureus</i> co-kultiviert mit <i>Isaria felina</i>			IC <sub>50</sub> > 100 µM (Ehrlich Karzinom)	(Zhuravleva et al. 2016)
Diorcinol E	72696571		<i>Aspergillus tennesseensis</i>	<p>MIC = 8 µg/ml (<i>E. coli</i>)</p> <p>MIC = 32 µg/ml (<i>B. subtilis</i>, <i>G. cingulata</i>)</p> <p>MIC = 64 µg/ml (<i>P. aeruginosa</i>, <i>G. graminis</i>)</p> <p>MIC &gt; 64 µg/ml (<i>R. solanacearum</i>, <i>A. alternate</i>, <i>C. heterostrophus</i>, <i>M. hiemalis</i>, <i>T. basicola</i>)</p>	(Li et al. 2018b)	

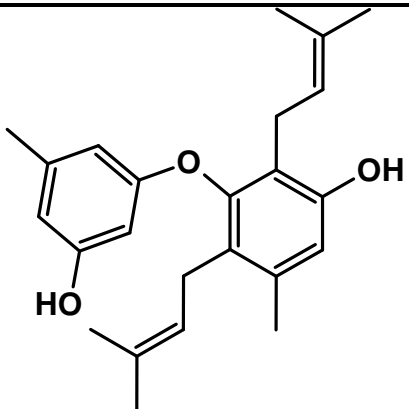
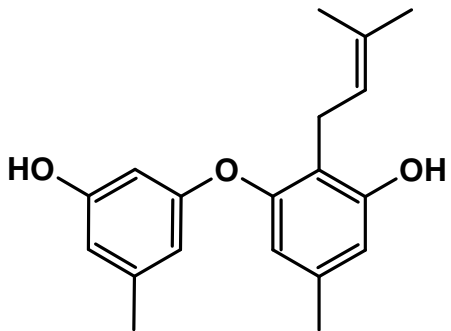
Diorcinol L	146684192		<i>Aspergillus tennesseensis</i>	<p>MIC = 8 µg/ml (<i>E. coli</i>, <i>R. solanacearum</i>)  MIC = 16 µg/ml (<i>P. aeruginosa</i>,  <i>A. alternate</i>, <i>G. graminis</i>)  MIC = 32 µg/ml (<i>C. heterostrophus</i>,  <i>G. cingulata</i>)  MIC &gt; 64 µg/ml (<i>B. subtilis</i>, <i>M. hiemalis</i>,  <i>T. basicola</i>)</p>	(Li et al. 2018b)
S-Diorcinol B	72696568		<i>Aspergillus sulphureus</i> co-kultiviert mit <i>Isaria felina</i>	<p>IC<sub>50</sub> = 95,1 ± 3,7 µM (Ehrlich Karzinom)</p> <p>MIC = 16 µg/ml (<i>P. aeruginosa</i>)  MIC = 32 µg/ml (<i>R. solanacearum</i>,  <i>G. graminis</i>)  MIC = 64 µg/ml (<i>G. cingulata</i>,  <i>M. hiemalis</i>, <i>T. basicola</i>)  MIC &gt; 64 µg/ml (<i>B. subtilis</i>, <i>E. coli</i>,  <i>A. alternate</i>,  <i>C. heterostrophus</i>)</p>	(Zhuravleva et al. 2016)

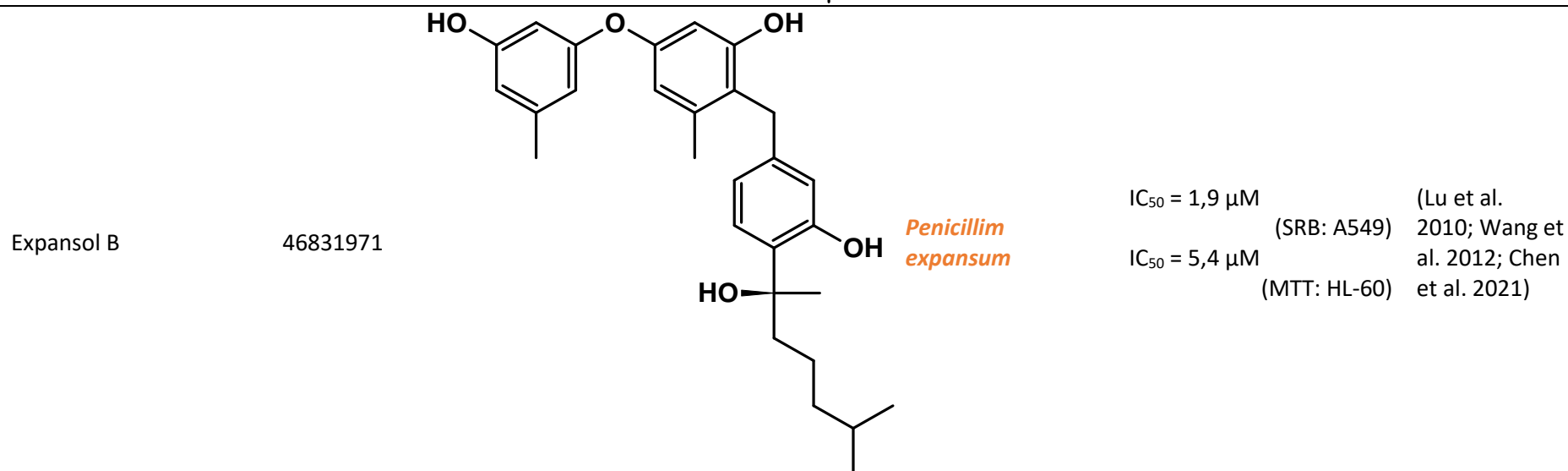
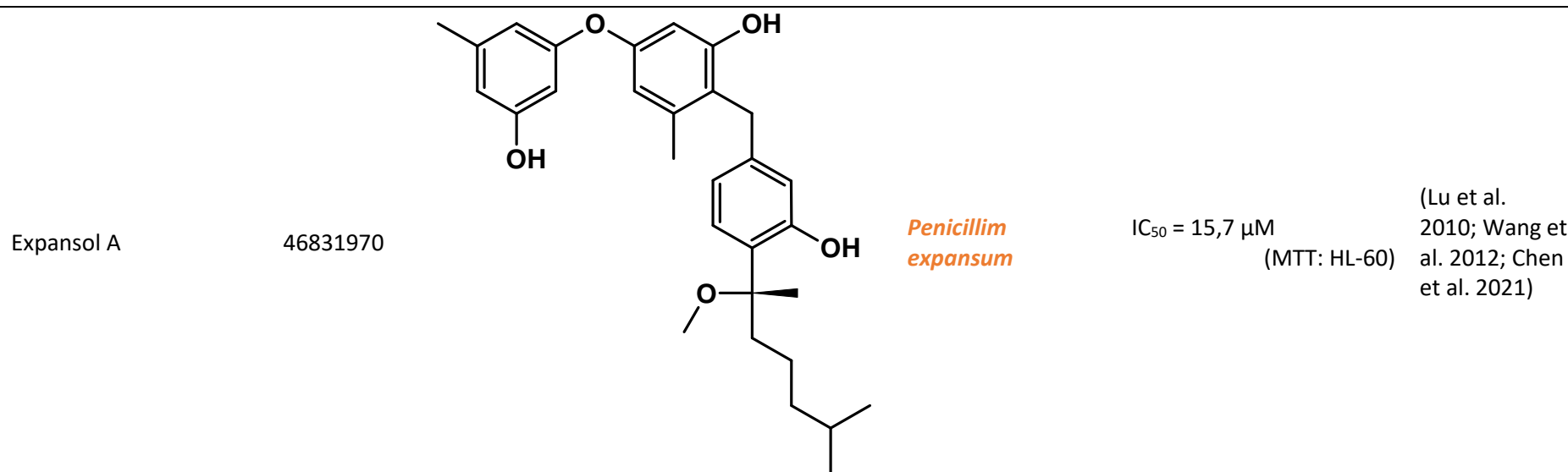


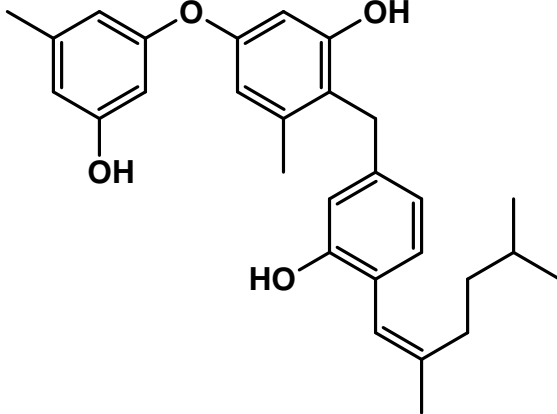
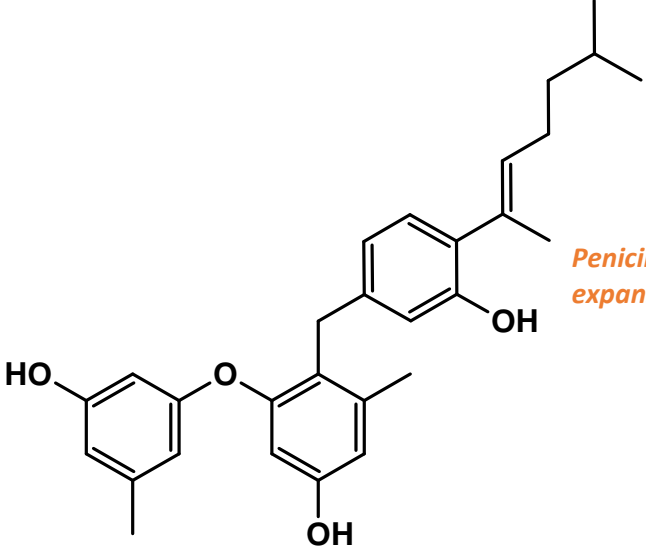
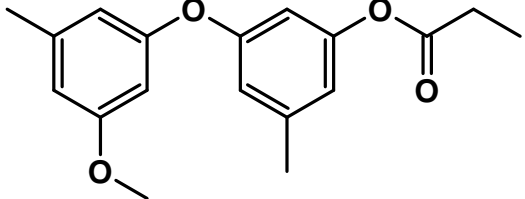
R-Diorcinol B	146684193		<i>Aspergillus tennesseensis</i>	<p>MIC = 4 µg/ml (<i>E. coli</i>, <i>C. heterostrophus</i>)</p> <p>MIC = 8 µg/ml (<i>B. subtilis</i>)</p> <p>MIC = 16 µg/ml (<i>P. aeruginosa</i>, (Li et al. <i>R. solanacearum</i>, 2018b) <i>G. graminis</i>)</p> <p>MIC = 32 µg/ml (<i>M. hiemalis</i>)</p> <p>MIC = 64 µg/ml (<i>A. alternate</i>, <i>G. cingulata</i>, <i>T. basicola</i>)</p>
Diorcinol C	72696569		<i>Aspergillus sulphureus</i> co-kultiviert mit <i>Isaria felina</i>	<p>IC<sub>50</sub> &gt; 100 µM (Ehrlich Karzinom) (Zhuravleva et al. 2016)</p> <p>MIC = 8 µg/ml (<i>B. subtilis</i>)</p> <p>MIC = 16 µg/ml (<i>M. hiemalis</i>)</p> <p>MIC = 32 µg/ml (<i>P. aeruginosa</i>, (Li et al. <i>G. cingulata</i>) 2018b)</p> <p>MIC &gt; 64 µg/ml (<i>E. coli</i>, <i>R. solanacearum</i>, <i>A. alternate</i>, <i>C. heterostrophus</i>, <i>G. graminis</i>, <i>T. basicola</i>)</p>

			<i>Aspergillus sulphureus</i> co-kultiviert mit <i>Isaria felina</i>	$IC_{50} = 37,6 \pm 1,4 \mu M$ (Ehrlich Karzinom)	(Zhuravleva et al. 2016)
Diorcinol J	122368707		<i>Aspergillus tennesseensis</i>	$MIC = 2 \mu g/ml$ ( <i>G. graminis</i> ) $MIC = 8 \mu g/ml$ ( <i>B. subtilis</i> ) $MIC = 16 \mu g/ml$ ( <i>M. hiemalis</i> ) $MIC = 32 \mu g/ml$ ( <i>R. solanacearum</i> ) $MIC = 64 \mu g/ml$ ( <i>E. coli</i> ) $MIC > 64 \mu g/ml$ ( <i>P. aeruginosa</i> , <i>A. alternate</i> , <i>C. heterostrophus</i> , <i>G. cingulata</i> , <i>T. basicola</i> )	(Li et al. 2018b)
Diorcinol D	72696570		<i>Aspergillus versicolor</i>	$IC_{50} = 29,8 \pm 1,0 \mu M$ (HEPG2) $IC_{50} = 31,6 \pm 0,8 \mu M$ (PC3) $IC_{50} > 50 \mu M$ (A549, A2780, MDA-MB-231) $MIC = 8 \mu g/ml$ ( <i>C. albicans</i> )	(Li et al. 2015)
			<i>Aspergillus sulphureus</i> cokultiviert mit <i>Isaria felina</i>	$IC_{50} = 98,1 \pm 2,7 \mu M$ (Ehrlich Karzinom)	(Zhuravleva et al. 2016)

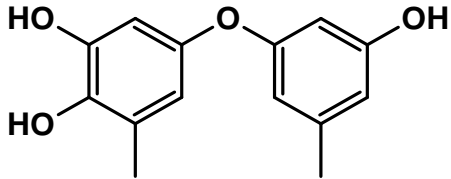
		<i>Aspergillus sp.</i> CUGB-F046	MIC = 8,5 $\mu$ M ( <i>S. aureus</i> )	(Xu et al. 2018)	
		<i>Aspergillus tennesseensis</i>	MIC = 8 $\mu$ g/ml ( <i>E. coli</i> , <i>R. solanacearum</i> ) MIC = 16 $\mu$ g/ml ( <i>P. aeruginosa</i> , <i>A. alternata</i> , <i>G. graminis</i> ) MIC = 32 $\mu$ g/ml ( <i>C. heterostrophus</i> , <i>G. cingulata</i> ) MIC > 64 $\mu$ g/ml ( <i>B. subtilis</i> , <i>M. hiemalis</i> , <i>T. basicola</i> )	(Li et al. 2018b)	
Diorcinol G	139586231		<i>Aspergillus versicolor</i>	IC <sub>50</sub> = 24,0 $\pm$ 0,5 $\mu$ M (PC3) IC <sub>50</sub> = 23,9 $\pm$ 1,8 $\mu$ M (A549) IC <sub>50</sub> = 31,0 $\pm$ 0,6 $\mu$ M (A2780) IC <sub>50</sub> = 19,0 $\pm$ 1,1 $\mu$ M (MDA-MB-231) IC <sub>50</sub> = 24,3 $\pm$ 0,9 $\mu$ M (HEPG2) MIC > 64 $\mu$ g/ml ( <i>C. albicans</i> )	(Li et al. 2015)

Diorcinol K	139591683		<i>Aspergillus sp.</i> CUGB-F046	MIC = 20,9 $\mu$ M ( <i>S. aureus</i> )	(Xu et al. 2018)
Diorcinol I	51136319		<i>Aspergillus versicolor</i>	IC <sub>50</sub> = 24,7 $\pm$ 1,4 $\mu$ M (PC3) IC <sub>50</sub> = 26,2 $\pm$ 3,6 $\mu$ M (A549) IC <sub>50</sub> = 36,3 $\pm$ 2,1 $\mu$ M (A2780) IC <sub>50</sub> = 23,2 $\pm$ 2,1 $\mu$ M (MDA-MB-231) IC <sub>50</sub> = 27,3 $\pm$ 1,7 $\mu$ M (HEPG2) MIC = 32 64 $\mu$ g/ml ( <i>C. albicans</i> )	(Li et al. 2015)
			<i>Aspergillus sp.</i> CUGB-F046	MIC > 181 $\mu$ M ( <i>S. aureus</i> )	(Xu et al. 2018)



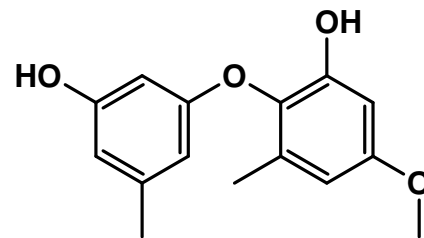
Expansol C			<i>Penicillim expansum</i>	$IC_{50} = 18,2 \mu M$ (MTT: HL-60)	(Wang et al. 2012; Chen et al. 2021)
Expansol E			<i>Penicillim expansum</i>	$IC_{50} = 20,8 \mu M$ (MTT: HL-60)	(Wang et al. 2012; Chen et al. 2021)
Trichoderolide B	155516562		<i>Trichoderma erinaceum</i>	$IC_{50} = 31,9 \mu M$ (MTT: MDA-MB-435)	(Guo et al. 2020b)

---

3-Hydroxydiorcinol	156581841		<i>Aspergillus flavus</i> <b>QQSG-3</b>	IC <sub>50</sub> = 165,2 μM (α-Glucosidase-Inhibitor)	(Wu et al. 2018)
			<i>Aspergillus sydowii</i>	IC <sub>50</sub> = 11,98 ± 0,73 μM (MTT: HL-60) IC <sub>50</sub> = 18,89 ± 1,14 μM (MTT: K562)	(Wang et al. 2018b)

Cyperin

182142

*Phoma sorghina*NA = 51 mm<sup>2</sup>*(Phytolacca americana)*NA = 46 mm<sup>2</sup>*(Senna obtusifolia)*NA = 64 mm<sup>2</sup>*(Sida spinosa)*NA = 47 mm<sup>2</sup>*(Sorghum halepense)*NA = 56 mm<sup>2</sup>*(Sorghum bicolor)*NA = 7 mm<sup>2</sup>*(Ipomoea tricolor)*NA = 6 mm<sup>2</sup>*(Datura stramonium)*NA = 16 mm<sup>2</sup>*(Chenopodium album)*NA = 78 mm<sup>2</sup>*(Nasturtium officinale)*

(Venkatasubbaiah et al. 1992)

Inhibierung des  
Wurzelwachstums von  
*Sorghum bicolor* bei 1000  
µg/Platte

IZ = 13 mm

*(A. tumefaciens, 0,5 mg)*

IZ = 35 mm

*(E. coli, 0,5 mg)*

IZ = 30 mm

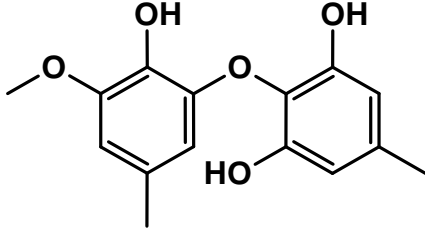
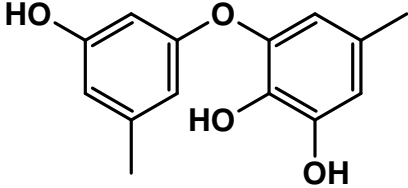
*(C. flacufaciens, 0,5 mg)*

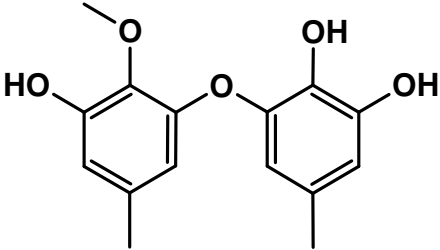
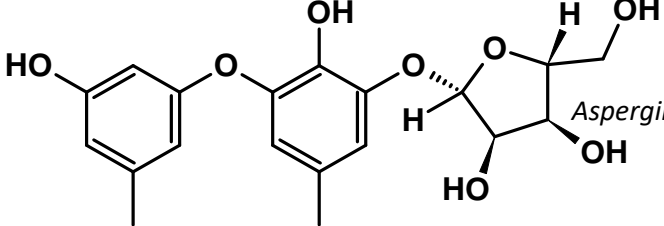
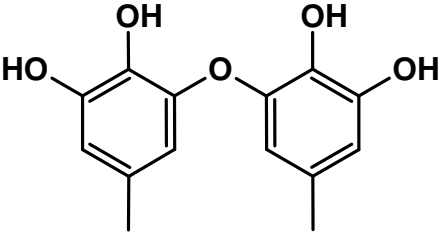
IZ = 18 mm

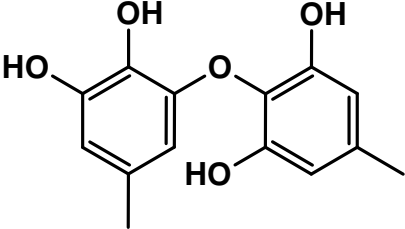
*(E. carotovora, 0,5 mg)*

IZ = 15 mm



			( <i>A. flavus</i> , 0,5 mg) IZ = 15 mm ( <i>P. notatum</i> , 0,5 mg) IZ = 24 mm ( <i>C. acutatum</i> , 0,5 mg)
			<i>Preussia fleischhakii Phoma sorghina Ascochyta cypericola</i> IC <sub>50</sub> = 38,4 ± 3,8 µM (Wurzelwachstum <i>A. thaliana</i> ) (Dayan et al. 2008) IC <sub>50</sub> = 89,0 ± 15,1 µM ( <i>AtENR</i> -Inhibierung)
3-Methoxyviolaceol II	139587620		<i>Aspergillus versicolor</i> Kein Effekt auf PC3, A549, A2780, MDA-MB-231 und HEPG2 Zelllinien sowie auf <i>C. albicans</i> (Li et al. 2015)
Cordylol C	16204067		<i>Aspergillus versicolor</i> MIC = 8 µg/ml ( <i>C. albicans</i> ) IC <sub>50</sub> > 50 µM (Li et al. 2015) (PC3, A549, A2780, MDA-MB-231, HEPG2)
			<i>Aspergillus sydowii</i> IC <sub>50</sub> = 16,52 ± 0,99 µM (HL-60, MTT) (Wang et al. 2018b) IC <sub>50</sub> = 23,03 ± 1,34 µM (K562, MTT)

Diorcinol F	139587783		<i>Aspergillus versicolor</i>	Kein Effekt auf PC3, A549, A2780, MDA-MB-231 und HEPG2 Zelllinien sowie auf <i>C. albicans</i>	(Li et al. 2015)
			<i>Aspergillus sp.</i> CUGB-F046	MIC = 20,9 µM	(Xu et al. 2018)
				<i>(S. aureus)</i>	
Cordylol C-3-α-D-ribofuranoside	156581837		<i>Aspergillus sydowii</i>	IC <sub>50</sub> = 8,97 ± 0,48 µM (MTT: A549) IC <sub>50</sub> = 4,64 ± 0,35 µM (MTT: U937)	(Wang et al. 2018b)
			<i>Aspergillus sydowii</i>	MIC = 50 µg/ml <i>(B. subtilis, S. aureus, M. lysodeikticus)</i> MIC = 200 µg/ml <i>(A. sydowii)</i>	(Taniguchi et al. 1978)
Violaceol I	100615		<i>Aspergillus sp.</i> SG-5044	G-Aktin-Polymerase-Inhibitor F-Aktin Aggregation	(Asami et al. 2012)
			<i>Aspergillus sp.</i>	IC <sub>50</sub> = 5,1 µM (ThT Assay: Aβ42 Aggregationsinhibierung)	(Zhao et al. 2014)
			<i>Aspergillus versicolor</i>	MIC = 8 µg/ml <i>(C. albicans)</i> IC <sub>50</sub> > 50 µM (PC3, A549, A2780, MDA-MB-231, HEPG2)	(Li et al. 2015)

		<i>Aspergillus ausroafricanus</i>	MIC = 25 $\mu$ M ( <i>S. aureus</i> ATCC700699)	(Ebrahim et al. 2016)
		<i>Penicillium chrysogenim</i> MCCC 3A00292	IC50 > 20 $\mu$ M (MTT: PANC-1, HeLa-S3)	(Niu et al. 2019)
		<i>Trichoderma polyalthiae</i>	MIC < 9,8 $\mu$ g/ml ( <i>C. albicans</i> ) MIC = 19,5 $\mu$ g/ml ( <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. aureus</i> , Methicillin- resistente <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. cereus</i> ) MIC = 156,3 $\mu$ g/ml ( <i>S. typhimuirum</i> ) MIC = 78,1 $\mu$ g/ml ( <i>S. sonneii</i> )	(Nuankeaw et al. 2020)
		<i>Aspergillus sp.</i> SG-5044	G-Aktin-Polymerase- Inhibitor F-Aktin Aggregation	(Asami et al. 2012)
		<i>Aspergillus sp.</i>	IC50 = 2,3 $\mu$ M (ThT Assay: A $\beta$ 42 Aggregationsinhibierung)	(Zhao et al. 2014)
		<i>Aspergillus versicolor</i>	MIC = 8 $\mu$ g/ml ( <i>C. albicans</i> ) IC50 > 50 $\mu$ M (PC3, A549, A2780, MDA-MB-231, HEPG2)	(Li et al. 2015)
		<i>Aspergillus ausroafricanus</i>	MIC = 25 $\mu$ M ( <i>S. aureus</i> ATCC700699)	(Ebrahim et al. 2016)
Violaceol II	16196968			

---

<i>Penicillium chrysogenim</i> MCCC 3A00292	IC50 > 20 µM (MTT: BIU-87, ECA109, BEL-7402, PANC-1, HeLa-S3)	(Niu et al. 2019)
<i>Trichoderma polyalthiae</i>	MIC < 9,8 µg/ml ( <i>C. albicans</i> und <i>S. saprophyticus</i> ) MIC = 39 µg/ml ( <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> und <i>B. cereus</i> ) MIC = 78,1 µg/ml (Methicillin-resistente <i>S.</i> <i>aureus</i> ) MIC = 312,5 µg/ml ( <i>S. typhimuirum</i> und <i>S. sonneii</i> )	(Nuankeaw et al. 2020)

---

## 7 Danksagung

Vielen Dank an,

Prof. Dr. Erwin Grill für die Betreuung dieser Doktorarbeit. Dank Ihrer Unterstützung und der wissenschaftlichen Diskussion aber auch dem Freiraum, den Sie mir gegeben haben, konnte diese Arbeit gelingen.

Prof. Dr. Philipp Schmitt-Kopplin, der sich bereit erklärt hat sowohl als mein Mentor als auch zweit Prüfer zu fungieren und sich die Zeit genommen hat diese Arbeit zu begutachten.

Dr. Natalie Kowalski, die sich zu Beginn meiner Arbeit die Zeit genommen hat, mir einiges noch beizubringen. Vielen Dank, dass wir über all die Jahre in Kontakt geblieben sind und ich mich jederzeit melden konnte.

Dr. Moritz Ruschhaupt und Dr. Stefanie Mucha, für die vielen Stunden, während denen wir diskutiert und uns über alles Mögliche ausgetauscht haben. Und vielen Dank für die Abende bei Wein oder Bier, an denen wir es uns auch mal gut gehen lassen haben.

Dr. Zhenyu Yang und Liu Jinghui, mit denen die Wochenenden im Labor nicht ganz so einsam waren und die immer offen für eine Diskussion waren.

Lisa Groß, die mich bei Versuchen am Mikroskop unterstützt hat. Für all die Kulturen die sie für mich angeimpft hatte und die Cocktail Abende.

Christoph Heidersberger, der so öfter einspringen musste, um Klonierungen und DNA-Isolierungen zu machen oder auch Keimlinge umzusetzen.

Beate Seeliger, dafür, dass sie alle organisatorischen Probleme und die ganze Bürokratie übernommen hat.

Anna Hogger, für die vielen Pflanzen die sie umgesetzt hat. Danke auch für die Besuche und Gespräche nach deiner Zeit am Lehrstuhl.

Alle anderen Kollegen des Lehrstuhls für Botanik, die mich während meiner Promotion begleitet haben. Für all die Unterstützung und all die mittäglichen Grill-Events. Für die Kaffee-Runden, bei denen häufig diskutiert wurden, den Feierabendgetränken und alle anderen Dinge, die wir zusammen erlebt haben.

Meine Eltern, die mich über die Entfernung bei allem Unterstützt haben. Dafür, dass sie immer für mich da sind und ich weiß, dass ich immer nach Hause zurückkehren kann, egal wohin es mich verschlägt. Und für all die Liebe die sie mir mein Leben lang entgegengebracht haben.