

Entwicklung und Anwendung neuer NMR-Methoden: Orientierungsmedien zur Strukturbestimmung mit anisotropen Parametern und Metabonomics

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
Karlsruher Institut für Technologie (KIT)-Universitätsbereich
genehmigte

DISSERTATION

von
Dipl. Biol. Silke Büchler
aus
Karlsruhe

Dekan:	Prof. Dr. Stephan Bräse
Referent:	Prof. Dr. Burkhard Luy
Korreferent:	Prof. Dr. Anne Ulrich
Tag der mündlichen Prüfung:	23.10.2014

Ich versichere wahrheitsgemäß, die Arbeit selbstständig angefertigt, alle benutzten Hilfsmittel vollständig und genau angegeben und alles kenntlich gemacht zu haben, was aus Arbeiten anderer unverändert oder mit Abänderungen entnommen wurde.

Karlsruhe, 24.10.2014

.....

(**Silke Büchler**)

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	5
2	Metabonomics	7
2.1	Historie	8
2.2	Die Analyse von Metaboliten	9
2.2.1	Methoden	10
2.2.1.1	Hochdruckflüssigkeitschromatographie	10
2.2.1.2	Massenspektrometrie	11
2.2.1.3	Kernspinresonanzspektroskopie	11
2.3	Metabonomics - eine Begriffsklärung	13
2.4	Das Forschungsumfeld von Metabonomics	15
2.4.1	Metabolische Profilerstellung	16
2.4.2	Metabolischer Fingerabdruck	16
2.4.3	Zielanalyse	17
2.4.3.1	Metabolic Engineering	17
2.4.3.2	Funktionelle Genomik	18
2.4.4	Fluxomics	18
2.5	“omics” - Forschung im systembiologischen Kontext	19
2.6	Pflanzen-Metabonomics	22
2.6.1	Die Probenpräparation	24
2.6.2	Anwendungsbeispiele	26
2.6.2.1	Metabotypisierung und Populationsüberprüfung	27
2.6.2.2	Qualitätskontrolle	27
2.6.2.3	Biomarker	27
2.6.2.4	Wesentliche Gleichheit	28
2.7	Bioinformatische Methoden	29
2.7.1	Mustererkennungsmethoden	29

2.7.2	Gesteuerte und ungesteuerte Datenanalyse	30
2.8	NMR-Experimente	33
2.9	Zielsetzung und verwendete Modellorganismen	34
2.9.1	Modellorganismen	35
2.9.2	Tabakflüssigzellkulturen	36
2.9.3	Reis	38
3	Material und Methoden Teil 1	43
3.1	Chemikalien, Geräte, Medien	43
3.2	Tabakflüssigzellkulturen	47
3.2.1	Probenanzucht von VBI-0 und VBI-3	47
3.2.2	Probenernte von VBI-0 und VBI-3	47
3.2.3	Probenextraktion von VBI-0 und VBI-3	47
3.2.4	NMR-Messungen der Metabolite von VBI-0 und VBI-3	48
3.2.5	NMR-Datenanalyse von VBI-0 und VBI-3	49
3.2.6	Spiken der Metabolite von VBI-0 und VBI-3	50
3.3	Salz- und Trockenstress von Reis	50
3.3.1	Probenanzucht von Reis	50
3.3.2	Probenernte von Reis	51
3.3.3	Probenextraktion von Reis	52
3.3.4	NMR-Messungen von Reis	52
3.3.5	NMR-Datenanalyse von Reis	53
3.3.6	Spiken der Metabolite von Reis	53
4	Ergebnisse Metabonomics	55
4.1	Tabakflüssigzellkulturen	55
4.1.1	VBI-0 belichtet/unbelichtet und VBI-3 belichtet/unbelichtet	56
4.1.2	VBI-0 unbelichtet und VBI-0 belichtet	58
4.1.3	VBI-3 unbelichtet und VBI-3 belichtet	59
4.1.4	VBI-0 unbelichtet und VBI-3 unbelichtet	60
4.1.5	VBI-0 belichtet und VBI-3 belichtet	60
4.1.6	Identifizierte Metabolite und Konzentrationen	62
4.1.7	Diskussion	65
4.1.7.1	Ergebnisse der Datenanalyse von VBI	65
4.1.7.2	Identifizierung einzelner Metabolite und Biomarker	66

4.2	Reis	69
4.2.1	48 h Salzbehandlung	69
4.2.1.1	Experimentreihe 1	74
4.2.1.2	Experimentreihe 2	76
4.2.2	24 h Salz- und Trockenstressbehandlung	76
4.2.3	24 h und 48 h Behandlungsdauer im Vergleich	82
4.2.4	Identifizierte Metabolite und Konzentrationen	84
4.2.5	Diskussion	91
4.2.5.1	Ergebnisse der Datenanalyse von Reis	91
4.2.5.2	Identifizierung einzelner Metabolite und Biomarker	92
5	Zusammenfassung Teil 1	95
6	Orientierungsmedien	99
6.1	Grundlagen	99
6.2	Messung von anisotropen NMR-Parametern	100
6.2.1	Orientierungsmedien	101
6.2.2	Chirale Moleküle	101
6.2.3	Biomoleküle	102
6.2.4	Extentionsfaktor	103
6.3	Gellan Gum	103
7	Material und Methoden Teil 2	107
7.1	Chemikalien, Geräte, Medien	107
7.1.1	NMR-Lösungsmittel für Proteine	109
7.1.2	Streckapparatur	109
7.2	Gelpräparationsmethode 1	109
7.3	Gelpräparationsmethode 2	110
7.4	Stäbchenpräparation	113
7.5	Probenpräparation mit Stäbchen	113
7.6	Gellan-Gum-Reinigung	114
7.7	Substanzrückgewinnung am Beispiel von Ubiquitin	114
7.8	NMR-Experimente	115
7.8.1	J -BIRD ^{<i>d,X</i>} -HSQC	115
7.8.2	CLIP-HSQC	116

8	Ergebnisse Orientierungsmedien	119
8.1	Etablierung als Orientierungsmedium	119
8.1.1	Messungen kleiner bis mittelgroßer Moleküle	120
8.1.2	Temperatur- und pH-Wert-Stabilität	122
8.1.3	Lösungsmittleigenschaften	124
8.1.4	Messungen von Makromolekülen	125
8.1.5	Diskussion	128
9	Zusammenfassung Teil 2	131
10	Anhang	133
10.1	Abkürzungsverzeichnis	133
10.2	Aminosäuren	136
10.3	Norcampher	137
10.4	Ubiquitin	138
10.5	Metabonomics	141
	Literaturverzeichnis	149
10.6	Publikationen	163
10.7	Danksagung	164

1. Einführung

Die Suche nach Antworten auf die Funktionsweise und Struktur alles Lebendigen beschäftigt die Menschen seit Jahrtausenden. Dies impliziert, dass mit dem Wissen, wie Leben funktioniert, auch verstanden werden kann, wie Leben gefördert, geheilt oder zu unserem Nutzen verändert werden kann. Die Beantwortung von biologischen Fragestellungen auf molekularer Ebene stellt eines der essentiellen Forschungsgebiete dar, um den Verlauf von Krankheiten oder Stoffwechselfvorgängen zu analysieren. Sowohl Makromoleküle wie z. B. Polysaccharide oder Proteine, aber auch kleine Moleküle wie Aminosäuren sind wichtige, molekulare Komponenten in Organismen. Die Analyse dieser Moleküle ermöglicht es, biologische und biochemische Lebensvorgänge en détail verstehen zu können. Sie üben vielfältige Funktionen wie die Strukturbildung aus oder fungieren als Marker metabolischer Prozesse. Eine Untersuchung solcher Bausteine ist daher von besonderem Interesse, um deren Funktion und Wirkungsweise in das Gesamtgeschehen eines Organismus einzugliedern.

Je nach Molekül und Fragestellung erfolgt die Untersuchung mithilfe verschiedener biologischer, chemischer oder physikalischer Methoden bzw. bioinformatischer Auswertungstechniken. In dieser Arbeit wird sowohl für die Metabonomics-Studien, als auch für die Etablierung und Optimierung eines Orientierungsmediums die Kernspinresonanzspektroskopie (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR) verwendet. Die NMR-Spektroskopie ermöglicht die Messung von Strukturinformationen bestimmter Substanzen in flüssigen, festen oder partiell orientierten Medien. Orientierungsmedien dienen hierbei der Gewinnung von anisotropen Parametern wie chemischer Verschiebungsanisotropie oder dipolarer Kopplung, wodurch Rückschlüsse auf die Struktur eines eingebrachten Moleküls gezogen werden können.

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit Metabonomics-Studien an den beiden Modellorganismen Reis und Tabakflüssigzellkulturen. NMR-basierte Studien ermöglichten es hierbei eine große Bandbreite an Substanzen in Rohextrakten in einem einzigen Experiment zu erfassen und charakteristische Moleküle zu identifizieren bzw. zu quantifizieren. Während bei den Reispflanzen die Auswirkungen von Salz- und Trockenstress erforscht wurden, wurde bei der Tabakzellkultur (*Nicotiana tabacum* L. cv 'Virginia Bright Italia' (VBI)) der Einfluss von Licht in Bezug auf den Metabolismus einer lichtempfindlichen und einer lichtunempfindlichen Zellkultur untersucht. In diesen Arbeiten lagen die Schwerpunkte auf der Erstellung von Standardarbeitsanweisungen (SOPs) und der Kontrolle der Reproduzierbarkeit der Daten. Des Weiteren wurden die für die Unterscheidung relevanten Metabolite identifiziert und quantifiziert, sowie die gewonnenen Daten in das bereits bestehende Wissen über die Modellorganismen eingefügt. Durch die gleichzeitige Erfassung verschiedener Metabolite mithilfe eines einzigen Spektrums konnte eine Vielzahl an Informationen bezüglich des metabolischen Fingerabdrucks der beiden Modellsysteme Reis und VBI gewonnen werden.

Der zweite Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Etablierung des Biopolymers Gellan Gum als Orientierungsmedium zur Messung anisotroper Parameter in der hochauflösenden NMR-Spektroskopie. Die Optimierung der Geleigenschaften hinsichtlich Elastizität, Stabilität und Gelkonzentration für die Messung der eingebrachten Moleküle stand hierbei im Vordergrund. Dabei sollte erstens die Diskriminierung von chiralen Molekülen gewährleistet werden, welche für pharmazeutische Anwendungen bzw. Medikamente von entscheidender Bedeutung sind; zweitens sollte die Einbringung großer Makromoleküle möglich sein, um diese partiell zu orientieren und anisotrope Parameter als Strukturinformationen zu gewinnen.

Durch die unterschiedliche, räumliche Struktur und Größe der untersuchten Moleküle wurden verschiedene Zusammensetzungen von niedrig- und hochacetyliertem Gellan Gum getestet, um die jeweiligen Anforderungen einer Orientierung des entsprechenden Moleküls zu erfüllen. Weiterhin wurde Wasser und Dimethylsulfoxid als Lösungsmittel für Gellan Gum Biopolymergele eingesetzt, um die Bandbreite an zu untersuchenden Substanzen zu erweitern. In diesem Zusammenhang wurde auch die partielle Orientierung mithilfe einer Streckapparatur, mit welcher eine stufenlose Ausrichtung des Gels möglich ist, überprüft.

2. Metabonomics

Die Analyse metabolischer Prozesse ist seit Jahrzehnten ein fester Bestandteil der Biowissenschaften. Dabei war und ist die Untersuchung biochemischer Moleküle im Zusammenhang mit dem Stoffwechselgeschehen eines der wichtigsten Forschungsanliegen.

Zu Beginn stand die Forschung an wenigen Metaboliten bestimmter Biosynthesewege im Vordergrund, wobei vor allem die Extraktionsmethode der Komponenten entscheidend war. Zumeist wurden die Inhaltsstoffe durch Flüssigextraktionen aus den jeweiligen tierischen oder pflanzlichen Proben gewonnen und mithilfe analytischer Verfahren wie der NMR-Spektroskopie oder der Massenspektrometrie untersucht.¹⁻⁴ Dadurch konnten metabolische Fragestellungen erforscht werden. Als Beispiel hierfür sei die Aufklärung hormoneller Funktionen in Pflanzen bzw. des Krebszyklus genannt.^{5,6}

Um die Komplexität der Organismen und deren Interaktionen mit der Umwelt besser zu verstehen, war es notwendig, die Metabolitenanalyse zu spezifizieren und Synergien verschiedener Forschungsrichtungen wie der Biologie, der Chemie und der Bioinformatik zu nutzen.^{7,8} Das Ziel dieser Bemühungen war die systematische Erforschung des Metaboloms. Je nach verwendeter Analysemethode, dem Kontext oder dem untersuchten Modellorganismus wurden vor allem zwei Begriffe geprägt:

1. Metabonomics wurde 1999 von Jeremy Nicholson als die quantitative Messung der dynamischen und von vielen Parametern abhängige, metabolische Antwort lebender Systeme auf pathophysiologische Stimuli oder genetische Modifikation definiert.⁹
2. Im Jahr 2001 definierte Oliver Fiehn den Begriff Metabolomics als den Forschungsbereich, welcher sich mit der umfassenden und quantitativen Analyse aller Metabolite beschäftigt.^{10,11}

Der Metabonomics-Ansatz sollte die unterschiedlichen Forschungsdisziplinen verbinden und sich zu Genomics, Transkriptomics und Proteomics als ähnlich bedeutenden, eigenständigen Forschungsbereich etablieren. Die Unterscheidung der beiden Begriffe findet aufgrund der Betrachtungsweise des zu untersuchenden Systems statt. Metabonomics beabsichtigt die Messung globaler, dynamischer Reaktionen von lebenden Systemen aufgrund von endogenen oder exogenen Faktoren. Der Fokus liegt auf dem Verständnis des Systems, dessen zeitliche Veränderungen sowie der differenzierten Betrachtung multizellulärer Systeme. Durch gezielte Fragestellungen zu Krankheiten oder genetischen Manipulationen wird die Funktionsweise des Metabolismus erforscht.

Metabolomics hingegen sucht nach der analytischen Beschreibung komplex biologischer Proben mit dem Ziel, kleine bis mittelgroße Moleküle (<1 kDa) in einer einzigen Probe zu charakterisieren. Eine qualitative und quantitative Kartierung aller Metabolite soll dabei erreicht werden und diese mit definierten Umständen wie genetischer Manipulation in Verbindung gebracht werden.

In der Praxis jedoch werden die Begriffe nicht immer definitionsgemäß verwendet, da sie sich in ihrem Forschungsziel überschneiden können bzw. dieselben Analyse- und Datenauswertungstechniken verwenden.¹ Gemeinsam ist beiden Definitionen das Ziel, die Komplexität und das Zusammenspiel eines Organismus und dessen Interaktionen mit seiner Umgebung besser zu verstehen, wobei dies durch eine systematische Analyse des Metaboloms erreicht werden soll.^{7,10}

2.1 Historie

Während sich die Genomsequenzierung, die Transkript- und Protein-Analyse (Transkriptomics, Proteomics) rapide in den 1990er Jahren entwickelten, gab es in Bezug auf die systematische Erforschung von Metaboliten nur wenig Ansätze. Erst durch die Entwicklung und Weiterentwicklung der metabolischen Kontrollanalyse, der chemischen Analysetechniken, sowie des Datenanalyseverfahrens konnte sich der Metabonomics-Ansatz neben den bisherigen "omics"-Forschungsbereichen etablieren.²

Die metabolische Kontrollanalyse (metabolic control analysis) ist eine mathematische Methode, welche in den 1960ern als Modell für den Metabolismus in Zellen entwickelt wurde. Im Vordergrund stand die Quantifizierung der Metabolitkonzentrationen mithilfe der gas- (GC) oder flüssigchromatographischen (LC) Massenspektrometrie (MS). Ziel dieser Metabolitenanalyse war die Verfolgung einzelner, bekannter Moleküle durch die jeweiligen Biosynthesewege (Pathways) hindurch, um die kinetischen Eigenschaften eines solchen Systems bestimmen zu können. Diese Methode konnte jedoch nur auf einfache Zellsysteme

angewendet werden, da bei einem multizellulären System die metabolische Kontrolle und Regulierung meist auf viele Zelltypen verteilt stattfindet.^{10,12}

Die zweite Forschungsrichtung beschäftigt sich mit der technischen Weiterentwicklung von analytischen Methoden wie der Massenspektrometrie und der NMR-Spektroskopie. In der Mitte der 1980er Jahren war die NMR-Spektroskopie im Hinblick auf die Empfindlichkeit bereits soweit fortgeschritten, dass die Identifizierung einzelner Metabolite in Biofluiden und Organellen gelang. Mithilfe dieses Fortschritts konnte gezeigt werden, dass veränderte Metabolitprofile bei Krankheiten existieren. Zeitgleich wurden auch metabolische Analysen mithilfe der Massenspektrometrie durchgeführt. Über die Interpretation bzw. den Vergleich der jeweiligen Datensätze konnte eine systematische Metabolitenanalyse realisiert werden. Dazu wurden Mustererkennungsmethoden wie Chemometrics oder multivariate Statistik bzw. die computergestützte Diagnostik eingesetzt.¹³

2.2 Die Analyse von Metaboliten

Während die Forschungsfelder Genomics, Transkriptomics oder Proteomics in den letzten Jahrzehnten finanziell enorm gefördert wurden und zu bahnbrechenden Erkenntnissen z. B. durch die Entschlüsselung des humanen Genoms (human genom project) führten, wurde erst in den letzten zehn Jahren die Erforschung von Metaboliten forciert. Der Fokus wurde zunächst auf die Beantwortung genetischer Fragestellungen gelegt. Anschließend wurden weitere Stoffklassen bzw. deren Moleküle identifiziert und quantifiziert, verbunden mit immer kostengünstigeren und schnelleren Analysemethoden.

Verglichen mit den Analysen für Transkriptomics und Proteomics ist die Detektion und Quantifizierung der Metabolite via NMR spektroskopischer Messungen robuster und ermöglicht einen größeren Probendurchsatz. Die Genauigkeit liegt bei etwa 1% bzgl. der relativen Standardabweichung der Signalintensität bzw. der dynamische Bereich liegt derzeit je nach Probenkopf bei etwa 1:200.000.¹⁴ Allerdings kann sich die Strukturaufklärung von Metaboliten wesentlich komplexer gestalten als die Identifizierung der Basenabfolge eines mRNA Stranges bzw. der Aminosäuresequenz eines Proteins.

Im folgenden werden Methoden und Techniken der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (high pressure liquid chromatography, HPLC), der Massenspektrometrie und der NMR-Spektroskopie vorgestellt, welche für die Detektion von Metaboliten mit einem kleinen und mittelgroßen Molekulargewicht (<1 kDa) eingesetzt werden.¹⁵ Die jeweiligen Daten der metabolischen Profile werden mittels Mustererkennung ausgewertet, wodurch eine effektive Interpretation der metabolischen Momentaufnahme des untersuchten, molekularen Phänotyps ermöglicht wird.¹⁶

2.2.1 Methoden

2.2.1.1 Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (high pressure liquid chromatography, HPLC) ist ein Standardverfahren für die Trennung und Aufreinigung verschiedener Moleküle, welche nebeneinander in einer Mischung vorliegen. Die Anlage besteht aus einer Injektionspule, einem Pumpsystem, einer Mischkammer, einer Trennsäule, gefüllt mit einem meist modifizierten Silicagel, und einer Detektionseinheit. Die Trennung wird entweder isokratisch oder mithilfe eines Lösungsmittelgradienten umgesetzt, wobei definierte Lösungsmittelgemische verwendet werden. Anhand von Tabellen oder Datenbanken, in welchen für die gängigen Substanzklassen entsprechende Vorschläge für die zu verwendende Säule bzw. für die Zusammensetzung der Lösungsmittel und deren Flussraten eingetragen sind, können in kurzer Zeit entsprechende Ablaufprotokolle erstellt werden. Die HPLC stellt daher eine effektive und gleichzeitig simple Methode für die Trennung von Stoffgemischen dar.

Neben konventionellen UV/VIS Detektoren erweist sich die Kopplung von HPLC-Anlagen an MS oder NMR-Systeme bei einer Quantifizierung unbekannter Substanzen als Vorteil (s. Abbildung 2.1).¹⁷

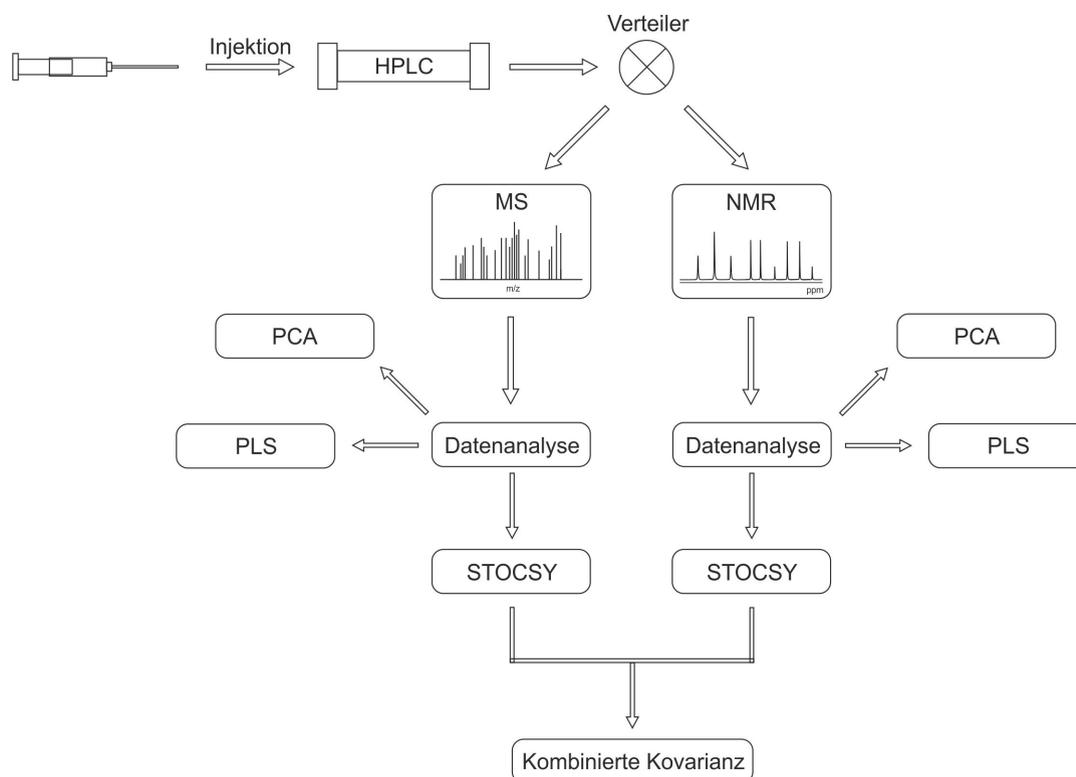


Abbildung 2.1: Gekoppelte LC-NMR-MS Systeme zur Untersuchung von Gemischen aus verschiedenen Substanzen.^{4,17}

2.2.1.2 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit die bis heute am häufigsten verwendete Analytikmethode zur Untersuchung von Pflanzenmetaboliten. Hierfür müssen die zu untersuchenden Moleküle extrahiert und häufig auch derivatisiert werden. Je nach Art der Extrakte, wird die Gaschromatographie oder Flüssigkeitschromatographie zur Trennung der Moleküle vor dem Durchlauf im Massenspektrometer verwendet.² Massenspektrometrische Techniken analysieren die Masse ionisierter Probenmoleküle, wobei die Ionen nach ihrer Masse zu Ladungsverhältnis getrennt werden.¹⁸ Die Ionisation der Substanzen kann thermisch, durch elektrische Felder oder durch Beschuss der Probe mit Elektronen, Ionen oder Photonen erfolgen. Die Iontrennung wird durch elektrische oder magnetische Felder bzw. durch die Flugzeit gewährleistet.

Nachteil der Massenspektrometrie ist, dass sie destruktiv und durch die Probenpräparation zeit- und kostenintensiv ist. Die Detektierbarkeit kann durch die unterschiedliche Ionisierbarkeit von Molekülen schwierig oder gar unmöglich sein. Weiterhin muss für eine Quantifizierung die Zugabe einer Qualitätskontrollmischung mit Metaboliten bekannter Konzentration und mit Komponenten aller vorkommenden Molekülklassen erfolgen. Ergo ist für eine Quantifizierung ein Vorwissen in Bezug auf die Substanzen, welche untersucht werden, notwendig. Schwierig gestaltet sich auch eine einheitliche Probenpräparation im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit von Studien, da jeder zusätzliche Bearbeitungsschritt die Möglichkeit von Fehlern erhöht.^{4,9,17}

2.2.1.3 Kernspinresonanzspektroskopie

Die NMR-Spektroskopie ist seit Jahrzehnten das Standardwerkzeug der chemischen Strukturaufklärung, da die strukturellen Informationen direkt in den Spektren durch die jeweiligen NMR Parameter enthalten sind. Diese Parameter sind in der hochauflösenden NMR-Spektroskopie u. a. die chemische Verschiebung, skalare Kopplung (J), der nukleare Overhauser Effekt (NOE) und die Signalintensität. Mit diesen Informationen kann die Struktur, molekulare Dynamik sowie Interaktionen einer Substanz erfasst werden. Im Gegensatz zur Massenspektrometrie ist sie weder invasiv, noch destruktiv und ermöglicht daher die weitere Analyse der Probe. Zusätzlich ist die NMR Spektroskopie weder an flüchtige Stoffe, noch an die Anwesenheit von Chromophoren oder an polarisierbare Molekülstrukturen gebunden.¹⁹

Die minimale Probenpräparation bzw. die Genauigkeit und Vielseitigkeit der NMR-Spektroskopie ermöglicht eine zeitnahe und umfassende Analyse von komplexen Rohextrakten, Gewebeproben oder auch Körperflüssigkeiten, ohne dass detaillierte Kenntnisse über

die Zusammensetzung einer Probe erforderlich sind. Dieser Vorteil ist allein der NMR-Spektroskopie zuzuordnen.⁷ Ein 1D ¹H-NMR-Spektrum kann z. B. die gesamte Komposition einer Probe erfassen und deckt einen breiten Bereich an aliphatischen oder aromatischen Metaboliten ab. NMR-spektroskopische Studien an Biofluiden oder Extrakten können so zeitnah und kostengünstig (in Bezug auf die Kosten pro gemessener Probe) den funktionellen, metabolischen Status eines Organismus abfragen und gleichzeitig eine überlegene Menge an Informationen von endogenen und exogenen Faktoren sammeln.^{9,16} Außerdem können mithilfe der flow-NMR Methode zusätzliche Informationen über die multiorganen Funktionsweisen *in vivo* erfasst bzw. diese in Echtzeit detektiert und interpretiert werden.²⁰ NMR-basierte Metabonomics-Studien erfüllen damit eine Vielzahl an Kriterien, um komplexe Systeme zu erforschen.

Die wesentlichen Nachteile der NMR-Spektroskopie sind, dass die Empfindlichkeit im Vergleich zur Massenspektrometrie gering ist und, um die Reproduzierbarkeit der metabolischen Studien an verschiedenen Standorten zu gewährleisten, die Spektrometer aufwendig eingestellt bzw. das Personal entsprechend geschult werden muss.¹⁵ Ein Vergleich der bereits beschriebenen Methoden bzw. deren Vorzüge und Schwächen hinsichtlich Empfindlichkeit, Probendurchsatz und -präparation sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tabelle 2.1: Übersichtstabelle über Vor- und Nachteile verschiedener Technologien, welche für die Metabolomics/Metabonomics-Ansätze Verwendung finden.^{21–26}

Technologie	Eigenschaften	Vor- und Nachteile	[Ref]
GC-MS	Genauigkeit: <50 ppm	+ Benutzungsprotokolle	21
	Masse: <350 kDa	– langsam, Derivatisierung	
SPME GC-MS	Genauigkeit: <50 ppm	+ Analyse flüchtiger Stoffe	22
	Masse: <350 kDa	– langsam	
LC-MS	Genauigkeit: <100 ppm	+ großer Messbereich	23
	Masse: <1500 kDa	– lange Analysezeit	24
NMR	Masse: >10 nM	+ nicht destruktiv, quantitativ	25, 27
		– Empfindlichkeit	26

2.3 Metabonomics - eine Begriffsklärung

Da der Metabolismus durch seine molekulare Diversität, seine Dynamik und den Flux ein sehr komplexes System darstellt, existieren für die Erforschung viele unterschiedliche Herangehensweisen und Fragestellungen. Je weiter sich ein Forschungsgebiet erstreckt, desto komplexer und vielfältiger sind die aufkommenden Fragen, welche oft das Zusammenspiel unterschiedlicher Forschungsbereiche notwendig macht. Dies spiegelt sich auch in der Erforschung des Metaboloms wider, so dass die Schwierigkeit darin besteht, bei der Vielzahl an Teilbereichen nicht den Überblick zu verlieren. Nicht nur biochemische oder molekularbiologische Methoden, sondern auch statistische und theoretische Modelle werden eingesetzt, um Veränderungen zu lokalisieren, zu kategorisieren bzw. Zusammenhänge zu ermitteln.¹⁰

Aus dem Bedarf einer systematischen Erforschung der Metabolite entwickelten sich die beiden Begriffe Metabonomics und Metabolomics, weshalb an dieser Stelle nochmals detailliert auf die Definitionen der beiden Begrifflichkeiten eingegangen wird.

Metabolomics ist definitionsgemäß die Erforschung der Gesamtheit der Metabolite. Der Schwerpunkt liegt auf der quantitativen und qualitativen Erfassung aller metabolischen Substanzen des jeweiligen, biologischen Systems. Im Vergleich zu Metabonomics wird dieser Begriff häufig in der Erforschung des Pflanzenmetabolismus verwendet, wobei die vorwiegend verwendete Analysemethode die Massenspektrometrie ist. Die Grundidee ist, dass durch die Erfassung aller Metabolite, einschließlich der jeweils vorkommenden Mengen und Abweichungen, Rückschlüsse auf Krankheiten oder veränderte Umweltbedingungen gezogen werden können. Aus diesen Daten sollen anschließend die Struktur und Funktion des Metabolismus in Form von Hypothesen abgeleitet werden. Dieser Bottom-Up-Ansatz setzt voraus, dass durch die systematische und quantitative Erforschung der Organisationsstruktur wichtige Rückschlüsse auf die Funktionsweise des Systems gezogen werden können. Durch die Erforschung aller im Organismus vorkommenden Metabolite können Theorien und Modelle aufgestellt werden, welche die Reaktionen in einem solchen System vorhersagen.^{1,9,11}

Metabonomics hingegen wird eher der Erforschung tierischer Organismen, deren Körperflüssigkeiten (Blut, Urin), Gewebe oder Zellen zugeordnet, wobei die Analyse häufig durch die NMR-Spektroskopie durchgeführt wird. Hierbei steht vor allem die Dynamik und Komplexität des Metabolismus in Bezug auf Krankheiten oder genetischer Modifikation im Vordergrund. Der Ansatz orientiert sich eher an einer Top-Down-Sicht, da das System im Hinblick auf dessen Komplexität durch bestimmte Fragestellungen erfasst wird. In der Fragestellung selbst sind von vorne herein Hypothesen und bereits erworbenes Wissen ent-

halten, weshalb hierbei nicht vornehmlich eine quantitative oder qualitative Bestimmung des Metaboloms erfolgt, sondern die Fragestellung in einem definierten Kontext beantwortet und damit einhergehend die aufgestellten Hypothesen überprüft werden sollen (s. Abbildung 2.2).^{9,11}

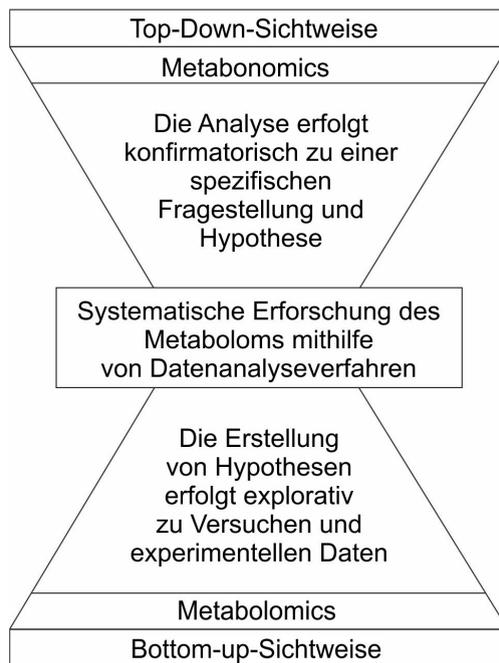


Abbildung 2.2: Mithilfe der Top-Down- bzw. der Bottom-Up-Strategie kann über unterschiedliche Herangehensweisen das Metabolom konfirmatorisch bzw. explorativ analysiert werden.

Beide Forschungsgebiete Metabonomics bzw. Metabolomics befassen sich somit mit der Untersuchung der Metabolite in biologischen Systemen. Klassisch gesehen, handelt es sich beim Metabolom um den Phänotyp des Organismus auf molekularer Ebene. Es ist ein umfassender Begriff, der alle Moleküle in einem Organismus beinhaltet, die nicht dem Genom, dem Transkriptom oder dem Proteom zugehörig sind. Dies verdeutlicht zum einen den Reichtum und die Vielfältigkeit des Metaboloms, macht aber auch die Schwierigkeit von Definitionen, Herangehensweisen und Forschungsabsichten deutlich. Die untersuchten Moleküle stammen aus verschiedenen Stoffklassen und liegen in unterschiedlichen Konzentrationen nebeneinander vor. Dies bedeutet, dass die Untersuchungen der verschiedenen Metabolite unterschiedliche, analytische Herangehensweisen benötigen, je nachdem, welche Substanzklasse in welcher Menge mit ihren jeweiligen, chemischen und physikalischen Eigenschaften untersucht werden soll.

Zudem ist das Vorkommen und die Konzentration von Metaboliten im Organismus örtlich begrenzt, sei es in bestimmten Zelltypen oder auch in Körperflüssigkeiten. Häufig werden deshalb nur Teilaspekte eines Organismus betrachtet, auf welchen dann die jeweiligen

Strategien angepasst werden und spezifische Fragestellungen entwickelt werden müssen. Ähnlich zum Genom, Transkriptom oder Proteom erforschen die Begriffe Metabonomics und Metabolomics das Metabolom in einem bestimmten Kontext, um das System als solches verstehen zu können.^{12,15} Durch den Ansatz, den Phänotyp mittels einer systematischen Erforschung des Metaboloms zu definieren, können auch genetische Modifikationen und deren Auswirkung bzw. die durch die Modifikation eventuell verursachten, biochemischen Veränderungen untersucht und in Beziehung gesetzt werden. So ist auch die Identifizierung von Mutationen ohne morphologischem Phänotyp (stille Mutationen) möglich.¹⁵

Aufgrund der Uneindeutigkeit und Vielschichtigkeit der Definitionen, wird in dieser Arbeit ausschließlich der Begriff Metabonomics verwendet. Er wird als Forschungsrichtung des Detektierens, Identifizierens und Quantifizierens von Metaboliten definiert, wobei dies mit verschiedenen, analytischen Methoden sowohl als Momentaufnahme, als auch über längere Zeiträume erfolgen kann. Dabei werden die gewonnenen Daten in den Kontext von Veränderungen in oder an einem biologischen System gestellt bzw. in den Gesamtzusammenhang des Metabolismus integriert. Wichtig ist, bei aller Notwendigkeit zur speziellen Fragestellung und Herangehensweise, die Erforschung des Metabolismus als Ganzes nicht aus den Augen zu verlieren. Dies bedeutet u. a., dass die jeweiligen, speziellen Methoden wie die Erstellung eines metabolischen Profils oder auch eines metabolischen Fingerabdrucks zwar wichtige Arbeitsweisen repräsentieren, jedoch keine für sich den Metabolismus vollständig erfassen kann (s. Kapitel 2.4.1 und 2.4.2). Außerdem sollten die metabolischen Prozesse immer als Teil eines Organismus betrachtet werden. Für die Deutung der Daten sollte daher nicht nur der Metabolismus an sich, sondern auch alle Erkenntnisse über den Organismus selbst herangezogen werden. Durch die Kombination der Forschungszweige Genomics, Transkriptomics, Proteomics und Metabonomics können so Organismen in ihrer Struktur und Organisation erforscht, beschrieben und eingehender verstanden werden.¹¹

2.4 Das Forschungsumfeld von Metabonomics

Durch die Entwicklung und Implementierung von Automatisierungsprozessen konnte die Quantifizierung, sowie Identifizierung von Molekülen optimiert werden. Die Hürde, reproduzierbare Datensätze zu generieren, um systematische Analysen metabolischer Prozesse durchzuführen, wurde dadurch genommen. Ein Beleg hierfür, ist die wachsende Anzahl an Veröffentlichungen bzw. an neuen Anwendungsbereichen metabolischer Studien, welche zeitgleich mit dem Fortschritt von Instrumenten und Techniken einherging.⁹

Wie bereits erwähnt, gibt der Begriff Metabonomics die Vielseitigkeit der Metabolismusforschung nicht wieder. Das Forschungsfeld wird meist durch die metabolische Profilerstel-

lung (metabolic profiling), den metabolischen Fingerabdruck (metabolic fingerprinting) oder durch die Zielanalyse (target analysis) ergänzt. Diese Methoden befassen sich entweder mit Teilaspekten des Metabolismus oder betrachten das Metabolom unter bestimmten Fragestellungen.²⁰

2.4.1 Metabolische Profilerstellung

Die metabolische Profilerstellung (metabolic profiling) steht für die Erforschung von selektiven, biochemischen Biosynthesewegen und stellt laut Fiehn die klassische Metabolomics Analyse dar.¹¹ Dabei wird häufig die analytische Prozedur auf eine kleinere Menge zuvor festgelegter Metabolite fokussiert, wobei bei der Probenvorbereitung spezifischer auf chemische Eigenschaften der selektierten Komponentengruppe eingegangen werden kann.

Bei pleiotropen Effekten stößt die metabolische Profilerstellung jedoch an ihre Grenzen. Dieser Effekt, bei welchem eine einzelne Mutation zu Veränderungen in den Metabolitkonzentrationen führen kann, welche dem Anschein nach einem unbeteiligten Biosyntheseweg angehören, erschwert die Analyse. In diesem Fall müssen auch diese Biosynthesewege untersucht bzw. eine quantitative Analyse aller Metabolite durchgeführt werden. Dies ist insbesondere dann gegeben, wenn Gene konstitutiv überexprimiert oder anti-sense inhibiert wurden.²

2.4.2 Metabolischer Fingerabdruck

Im Gegensatz zur metabolischen Profilerstellung ermöglicht die Methode des metabolischen Fingerabdrucks (metabolic fingerprinting) mithilfe der NMR Spektroskopie eine umfassende Analyse, bei welcher Veränderungen charakteristischer Signalmuster untersucht werden können. Sie beinhaltet die Messung von Rohextrakten, welche unter standardisierten Bedingungen hergestellt wurden, ohne die primäre Absicht bestimmte Metabolite zu identifizieren. Nicht einzelne Metabolite oder Molekülgruppen wie bei der metabolischen Zielanalyse oder Profilerstellung, sondern alle Metabolite einer entsprechenden Probe werden detektiert. Hierbei können Veränderungen im Gesamtmuster der Metabolite ihren jeweiligen Ursachen wie genetischer Modifikation, Alter oder auch Entwicklungsstand zugeordnet werden. Diese Art der Untersuchung kann auch vor einer metabolischen Profilerstellung durchgeführt werden, um die für die Fragestellung wichtigen Biosynthesewege zu ermitteln.²

Die Identifizierung relevanter Metabolite findet erst durch die bioinformatische oder statistische Analyse statt. Dies kann z. B. durch eine Hauptkomponentenanalyse erfolgen.²⁶ Mithilfe solcher, multivariater Analysen können die Datensätze der Spektren verglichen

bzw. die metabolische Zusammensetzung des Organismus oder auch Gewebes als Signalmuster für deren Gruppierung verwendet werden. Die Gruppierungen anhand relevanter NMR Signale werden auch für die Untersuchung unterschiedlicher Modellorganismen wie z. B. Reis oder Tabakzellkulturen in dieser Arbeit eingesetzt (s. Kapitel 4.1 und 4.2).

Die Methode des metabolischen Fingerabdrucks bzw. die Auswertung der Daten kann jedoch zu einer Überinterpretation im Bezug auf deren Bedeutung führen. Beispielsweise können zwar Signale zur Probenunterscheidung gefunden worden sein, diese müssen jedoch nicht notwendigerweise biologisch relevant sein bzw. können auf Einzelaspekte, spezielle Situationen oder Spezies hinweisen. Ein Beispiel hierfür ist die Untersuchung, ob Konzentrationserhöhungen von Glukose, Citrat und Succinat Biomarker für eine Toxizität sein könnten.²⁸ Diese Moleküle aus dem Krebszyklus sind bei unterschiedlichen Bedingungen erhöht, so dass generalisierte Aussagen über die Fähigkeit toxische oder krankheitsbedingte Effekte über diese Metabolite identifizieren zu können, vermieden werden sollten.¹¹

2.4.3 Zielanalyse

Die Identifizierung und Quantifizierung der Metabolite in einem Organismus werden oft aus praktischen Gründen auf wenige Komponenten begrenzt.² Bei einer solchen Zielanalyse (target analysis) wird daher das Metabolom gezielt nach bestimmten Stoffen untersucht.²⁰ Des Weiteren befasst sie sich mit Primäreffekten, welche durch Mutationen hervorgerufen werden können und untersucht diese direkt in dem Bereich, in welchem die Mutation ihre Auswirkungen am wahrscheinlichsten zeigt. Beispielsweise wird eine Analyse zum betreffenden Substrat und/oder dem direkten Produkt des entsprechenden Enzyms durchgeführt. Für eine solche Analyse wird je nach Organismenreich und Fragestellung eine hohe Empfindlichkeit benötigt, um Stoffe auch in geringsten Konzentrationen detektieren zu können. Mithilfe dieser Methode konnten viele Stoffwechselwege wie der bereits benannte Krebszyklus aufgeklärt werden.^{2,11}

2.4.3.1 Metabolic Engineering

Metabolic Engineering strebt die Verbesserung zellulärer Eigenschaften entweder durch die Veränderung bestehender oder die Einbringung zusätzlicher Biosynthesewege unter Benutzung z. B. von rekombinanten DNA-Technologien an. Die Methode wird vor allem zur Optimierung biotechnologischer Produktionsorganismen verwendet und zielt auf die Manipulation enzymatischer oder regulatorischer Funktionen ab. Die komplexe Natur des Metabolismus verursacht jedoch Schwierigkeiten, da für den Eingriff Kenntnisse über die Stoffwechselphysiologie und die Genetik des Organismus Voraussetzung sind. Deshalb ist

für diesen Ansatz die Analyse des metabolischen Gesamtsystems wünschenswert. Damit ist aber auch der Metabonomicseinsatz an dieser Stelle mit einer der lukrativsten, da der Schwerpunkt der biotechnologischen Nutzung, insbesondere in der pharmazeutischen bzw. lebensmitteltechnischen Industrie liegt.^{15,29}

2.4.3.2 Funktionelle Genomik

Die funktionelle Genomik erforscht die Umsetzung und Regulation der genetischen Information. Sie benötigt dabei eine exakte Definition des Phänotyps, um unterscheiden zu können, welche Veränderungen durch Regulierungen oder exogene Faktoren ausgelöst werden. Der Phänotyp kann aufgrund von morphologischen und physiologischen Kriterien ebenso wie durch biochemische und chemische Analysen erfolgen.

In den letzten Jahren wurde der chemischen Charakterisierung des Phänotyps immer mehr Beachtung geschenkt. Erfolgt diese z. B. in Bezug auf das Metabolom, so handelt es sich um Moleküle des Primär- oder Sekundärmetabolismus.³⁰ Die Daten aus einer solchen Studie können nicht nur zu einem tieferen Verständnis der interaktiven Natur des metabolischen Netzwerks verhelfen, sondern auch Zusammenhänge genetischer Veränderung aufzeigen. Weiterhin können fundamentale Einblicke in die Natur des Phänotyps gerade auch in Beziehung zur Genetik, wie auch der Entwicklung, der Physiologie oder der Umwelt erhalten werden.²⁶

2.4.4 Fluxomics

Unter dem Begriff Fluxomics wird ein Forschungsbereich zusammengefasst, welcher sich mit den Flusseigenschaften des Metaboloms befasst. Hierbei werden die Flüsse einzelner oder mehrerer Metabolite untersucht, sowie deren Dynamik erforscht. Der Fluss durch einen Biosyntheseweg (Pathway) ist u. a. über kinetische Konstanten aller Enzyme festgelegt und meist nicht allein von einem einzigen Syntheseschritt abhängig. Die Erforschung von Eckpunkten, Verbindungen oder auch Kontrollen eines metabolischen Systems ist hier von besonderem Interesse. Um die erwünschten Daten zu erhalten, werden einzelne Metabolite isotoopenmarkiert über die Zeit mittels NMR-Spektroskopie oder Massenspektrometrie untersucht.

Vor der Begriffsfindung Fluxomics wurden Arbeiten mit diesem Forschungsziel auch unter "metabolischer Kontrollanalyse" veröffentlicht.^{12,31,32}

2.5 "omics" - Forschung im systembiologischen Kontext

Die Systembiologie ist ein aktueller Forschungsbereich, welcher sich durch eine interdisziplinäre Zusammenarbeit auszeichnet. Fachbereiche, welche an systembiologischen Fragestellungen beteiligt sein können sind u. a. die Biologie, Biotechnologie, Biochemie, Biophysik, Bioinformatik, Systemtheorie oder auch die theoretische Biologie. Ein wesentliches Interesse liegt darin, einzeln erforschte Komponenten in Beziehung zueinander setzen zu können und so dem Verständnis der Funktionsweise des ganzen Systems näher zu kommen. Hierfür existieren viele Herangehensweisen, je nachdem, welche Forschungsbereiche involviert sind. Jedes Fachgebiet erzeugt dabei Unmengen an Daten, welche unter bestimmten Gesichtspunkten zu einem Modell zusammengefügt werden. So können z. B. die experimentellen "omics" - Daten qualitativer oder quantitativer Art in einem mathematischen Modell in Bezug auf die jeweilige Fragestellung bzw. nach dem experimentellen Aufbau verarbeitet werden. Dieses Modell kann letztendlich hinsichtlich seiner Robustheit mithilfe weiterer, experimenteller Daten überprüft werden. Bei der Modellerstellung üben die Theorien der verwendeten Bereiche Einfluss auf das Modell aus. Das Modell selbst wird mithilfe z. B. der Systemtheorie überprüft und durch weitere experimentelle Daten untermauert. So können durch die mathematische Integration der Daten von Genomics, Transkriptomik, Proteomik und Metabonomik die Funktionen auf unterschiedlichen Stufen der biomolekularen Organisation erforscht werden. Dies bietet die Möglichkeit, zukünftig auch Modelle für die Funktionsweise von Krankheitsursachen oder Heilungsprozessen zu erstellen (s. Abbildung 2.3).¹⁰

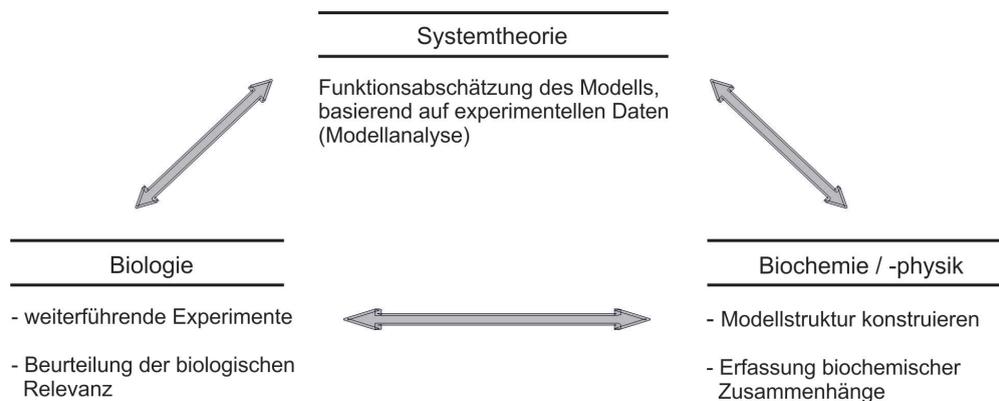


Abbildung 2.3: Systembiologie: Die Systemtheorie, Biologie und Biochemie bzw. -physik ergänzen sich gegenseitig, um das System Organismus detailliert zu erforschen.

Ein Problem der Systembiologie ist jedoch, dass jede Ebene der biologischen Organisation und Kontrolle wie der Genexpression, der Proteinexpression oder des Metabolismus in sehr unterschiedlichen Zeitspannen agieren, so dass kausale Zusammenhänge schwierig zu iden-

tifizieren sein können. Des Weiteren wirken Umwelteinflüsse auf die Organisationsebenen ein und erschweren es, die einzelnen Effekte den jeweiligen, endogenen oder exogenen Faktoren bzw. den strukturellen Ebenen zuzuordnen. So schränken exogene Einflüsse, welche auf die Genexpression wirken, die Interpretation genomischer Daten wie z. B. die Vorhersage der Wahrscheinlichkeit einer möglichen Erkrankung ein.¹

Wichtig für die Erstellung von Modellen bzw. für die Interpretation der Daten ist es, sowohl Informationen über die einzelnen Komponenten wie dem Metabolom, als auch das Zusammenwirken der Einzelkomponenten mit einfließen zu lassen. Andernfalls sind Forschungen an komplexen Systemen wie Organen oder einem Organismus nicht zielführend. Die Aufteilung der Forschungsgebiete in Teilbereiche ist wichtig, insbesondere wenn grundlegende Aspekte verschiedener Organismenreiche aufgeklärt werden. Allerdings besteht die Gefahr, dass bei komplexen Forschungszielen die Erkenntnisse einzelner Forschungsgebiete nicht mehr im Blick auf die Funktionsfähigkeit im System hin überprüft werden und somit Artefakte beschrieben bzw. Zusammenhänge dargestellt werden, die nicht existieren.^{10,33}

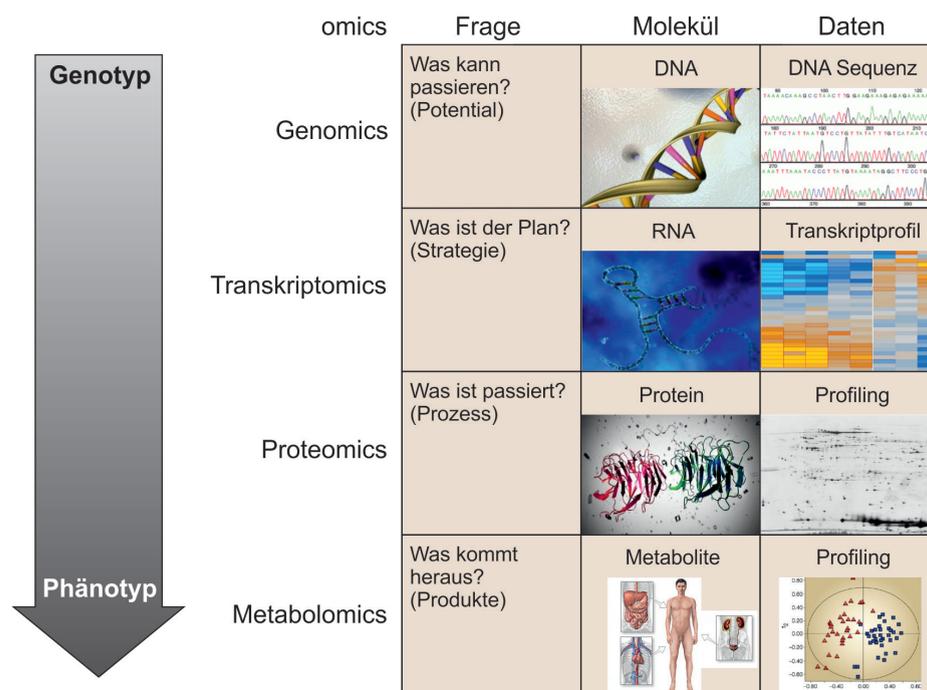


Abbildung 2.4: Übersicht der vier “omics” - Forschungsbereiche Genomics, Transkriptomics, Proteomics und Metabolomik. Je nachdem welche “omics” - Methode verwendet wird, ist die Fragestellung, das zu untersuchende Molekül bzw. die gemessenen Daten anders und können entsprechend für die Charakterisierung von Genotyp oder Phänotyp verwendet werden.^{25, 34–39}

Der Fortschritt der biologischen Arbeitsmethoden in den letzten 20 Jahren hat das Verständnis über die Organisation des Genoms erweitert, so dass sich daraus ein unabhängi-

ger Wissenschaftszweig, die Genomforschung (Genomics), entwickelte. Bis dahin ungeahnte Datenmengen konnten nun in Form von Genomsequenzierungen gewonnen werden. Nichtsdestotrotz sind viele Zusammenhänge zwischen der Genregulation, der Genexpression und der Funktion bzw. Kontrolle zellulärer Systeme (funktionelle Genomics) nicht geklärt. Die Forschung ist nach vielen Jahren der Sequenzierung von Organismengenomen nach wie vor mit grundlegenden Fragestellungen beschäftigt.⁹ So wurden multiparallele, analytische Ansätze wie die Transkript- und Proteinanalyse entwickelt, um die Auswirkungen der Genexpression zu analysieren. Die zugrunde liegende Idee dabei ist, für eine bestimmte Fragestellung relevante Organisationsstufen zu identifizieren und die Zusammenhänge und Gesetzmäßigkeiten zu erforschen.⁴⁰ Trotz Kombination sind Genomics, Transkriptomics und Proteomics nur begrenzt fähig Informationen zu liefern, welche für das Verständnis zellulärer Funktionen in lebenden Systemen benötigt werden, da sie die Dynamik des metabolischen Status des Organismus außer Acht lassen. Metabonomics könnte die bereits bestehenden Methoden dahingehend ergänzen, globale Ergebnisse aller Einflussfaktoren im Metabolismus aufzuzeigen.^{1,9,33,41}

2.6 Pflanzen-Metabonomics

Die Idee einer umfassenden Metabolomanalyse bei Pflanzen stieß bis vor wenigen Jahren noch auf Skepsis. Der Grund für diese Vorbehalte gegenüber einer systemweiten Erforschung liegt in der Komplexität des zu untersuchenden Systems. Im Gegensatz zum Genom, Transkriptom oder Proteom besteht das Metabolom aus einer Vielzahl chemischer Substanzen mit unterschiedlichen Eigenschaften, Konzentrationen, örtlichen Vorkommen und Synthesezeitpunkten.⁴² Da bis heute jedoch viele Moleküle mit den zugehörigen Synthesewegen und Funktionen in Pflanzen unerforscht sind bzw. das Interesse an pflanzlichen Molekülen z. B. für pharmazeutische Anwendungen stetig ansteigt, sinken diese Vorbehalte und erste Metabonomics-Studien wurden durchgeführt.^{11,42,43} Die Kombination aus hochentwickelten Analysemethoden, großem Probendurchsatz, sowie der Auswertung mithilfe statistischer oder bioinformatischer Methoden ermöglicht es, die heutigen Kenntnisse in Bezug auf die Struktur und Organisation von Pflanzen zu erweitern. Dadurch wird ein tieferes Verständnis für die kontroversen Eigenschaften des Metabolismus, nämlich einerseits der starken Regulierung, andererseits dem hohen Maß an Flexibilität, gewonnen.² Pflanzen sind komplexe Organismen, welche sich in vielen ihrer morphologischen Merkmalen von Tieren abgrenzen. Im Gegensatz zu tierischen Organismen, bei welchen die Oberfläche im Inneren stark vergrößert vorliegt, sind Pflanzen photosynthetische Organismen, die sich durch eine externe Oberflächenvergrößerung über Wurzeln und Blätter auszeichnen. Eine Zunahme der externen Oberfläche wiederum erfordert eine spezielle Architektur stabilisierung, welche die Evolution rigider Zellwände stimulierte. Der strukturelle Aufbau und die sessile Lebensweise regulieren die meisten Aspekte der Pflanzenentwicklung. Im Gegensatz zu Tieren, bei welchen die übergeordnete Struktur sehr früh in der Entwicklung definiert wird, wird die Pflanzengestalt typischerweise nicht in diesem Maße genetisch festgelegt, sondern wird auch durch die Umwelt bestimmt (offene Morphogenese). Daher ist das Wachstum nicht auf die erste Entwicklungszeit begrenzt, sondern findet tendenziell im gesamten Lebenszyklus statt. Hierbei besteht die Möglichkeit die Wachstumsphasen in Antwort auf Umweltreize anzupassen. Diese Plastizität der Entwicklung spiegelt sich auch auf der zellulären Ebene wieder. So können Pflanzenzellen ihre Form, in Antwort auf exogene und endogene Signale, ändern.⁴⁴ Ein exogenes Signal, auf welches Pflanzen so schnell wie möglich reagieren müssen, ist ihre Hauptenergiequelle das Licht.⁴⁵ Die Flexibilität zeigt sich gerade auch im Sekundärmetabolismus von Pflanzen. Der Pflanzenmetabolismus ist im hohen Maße dynamisch und vielfältig an Stoffklassen und Molekülstrukturen. So können unterschiedliche Syntheserouten dasselbe metabolische Molekül erzeugen. Beispielsweise kann Stärke aus Glucose-6-phosphat mittels Amylase und Hexo-

kinase oder durch α -Glucan-Phosphorylase und Phosphoglucomutase konvertiert werden. Dies bedeutet, dass eine genetische Manipulation durch eventuell andere Pathways kompensiert werden kann.¹²

Weiterhin sind Pflanzen sessil, obligat photoautotroph und dazu gezwungen eine komplexe Struktur mit divergierenden Funktionen zu entwickeln, um in einer ständig wechselnden und gefährlichen Umwelt überleben zu können. Daher besitzen Pflanzen einen Sekundärmetabolismus, welcher schätzungsweise 200.000 verschiedene Metabolite in unterschiedlichen Konzentrationen umfasst. Sie können sowohl auf saisonale, als auch auf lokale Umweltveränderungen reagieren und ihren Metabolismus gegenüber abiotischen und biotischen Stressoren anpassen bzw. Abwehrmechanismen einsetzen (s. Abbildung 2.5).

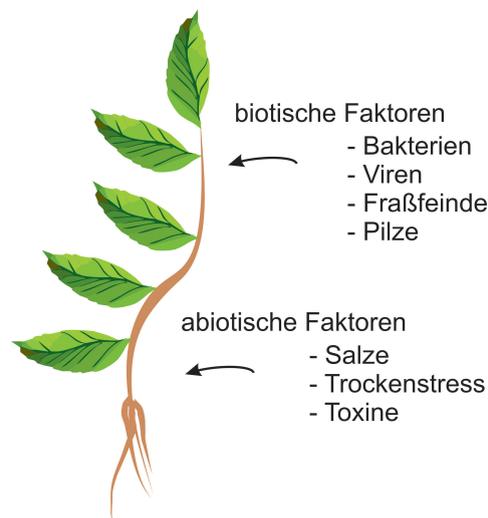


Abbildung 2.5: Biotische und abiotische Faktoren können bei Pflanzen Stress hervorrufen. Gegen diese Faktoren kann sie sich durch Anpassungsstrategien oder molekulare Abwehrstrategien wie ätherischen Ölen schützen.

Die Unterscheidungsmerkmale von Pflanzen betreffen alle Organisationsebenen. Mit Organisationsebenen sind hierbei z. B. Funktionseinheiten wie das Organ oder Gewebe, sowie Einteilungen in Genotyp oder Phänotyp gemeint. Diese können aufgrund ihrer einzigartigen Struktur zur genaueren Definition und Erforschung von Pflanzen dienen.² Sie zeigt sich u. a. in morphologischen Ausprägungen wie dem äußeren Phänotyp, dem Zellaufbau, der funktionellen Struktur, sowie den Lebens- und Überlebensmechanismen. Morphologische Eigenschaften wie der Zellaufbau oder der strukturelle Aufbau aus Wurzel, Blatt und Sprossachse sind klassische Unterscheidungsmerkmale, zu denen auch die Stoffwechsellistung, sprich der Metabolismus gehört. Die strukturellen Gegebenheiten bedingen die Lebens- und Überlebensweise, d. h. um die Funktionsweise zu verstehen, muss auch der strukturelle Aufbau erforscht werden.

2.6.1 Die Probenpräparation

Der erste Schritt einer Pflanzen-Metabolomics-Analyse beinhaltet die Probenanzucht. Mit der Versuchsanordnung, welche meist während der Anzucht durchgeführt wird, werden im übertragenen Sinn Fragen an den Organismus gestellt. Durch eine unpräzise Fragestellung liefert die Pflanze eine diffuse Antwort. Daraus lassen sich zwei Empfehlungen für eine Versuchsanordnung aufstellen: Erstens sollte das System vor allem hinsichtlich Anzucht und Probenpräparation hinreichend erforscht sein. Zweitens muss die Fragestellung auf das System abgestimmt und eindeutig sein. Es dürfen i.d.R. keine Abweichungen oder Änderungen der Versuchsanordnung stattfinden und es müssen klar strukturierte Experimente durchgeführt werden. Dabei kann es hilfreich sein, nicht zu viele Präparationsschritte einzubringen, sondern eine möglichst kurze Standardarbeitsanweisung aufzusetzen, um mögliche Fehlerquellen zu vermeiden. Ein hoher Probendurchsatz mit standardisierten Protokollen ist eine wichtige Voraussetzung für eine systematische Untersuchung von Metaboliten, wobei die Reproduzierbarkeit und Selektivität gewährleistet sein muss.⁴⁶

Die Probenpräparation beinhaltet je nach Studie unterschiedliche Schritte. Sie beginnt jedoch immer mit der Ernte oder Abnahme der Proben. Als erster Schritt muss dabei die enzymatische Aktivität sofort gestoppt werden, um weitere metabolische Prozesse zu verhindern. Dies wird hauptsächlich durch das Schockgefrieren oder auch durch die Zugabe von Additiven wie Perchlorsäure oder andere Säuren gewährleistet. Hierbei sollten Säuren jedoch nur bedingt wegen der nicht einschätzbaren Probenveränderung eingesetzt werden.¹² Das Schockgefrieren wird durch Zugabe von flüssigem Stickstoff durchgeführt. Nachdem die Proben tiefgefroren wurden, muss darauf geachtet werden, dass diese nicht teilweise wieder auftauen. Entweder werden sie bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert oder lyophilisiert. Anschließend erfolgt die Zerkleinerung mit Mörser und Pistill, einem Tissue Lyser, oder in hartnäckigen Fällen wie verholzten Teilen auch einem Waring Blendor. Um relative Metabolitmengen zu erhalten, werden für die Extraktion häufig getrocknete Proben verwendet, da es vor allem im Zusammenhang mit pflanzlichem Material aufgrund von sehr unterschiedlichen Zellgrößen zu Konzentrationsunterschieden der Extrakte kommen kann.⁴⁷ Die Extraktion von Metaboliten unterscheidet sich deutlich von anderen biologischen Aufarbeitungsmethoden. Für die Extraktion von DNA z. B. existieren je nach Ausgangssubstanz zwar unterschiedliche Gewebe- bzw. Zellaufschlußverfahren, insgesamt ist der Extraktionsschritt jedoch wenig variabel. Der Grund hierfür ist, dass die für DNA typischen Eigenschaften wie Löslichkeitsverhalten oder Stabilität über Organismenreiche hinweg gleich bleibend sind. Im Gegensatz hierzu muss für eine Extraktion von Metaboliten bedacht werden, dass das Löslichkeitsverhalten verschiedener Metabolite

divergiert und sie einen dynamischen Konzentrationsbereich aufweisen. Je nachdem, ob es sich um Pflanzen, Pflanzenteile oder auch Zellkulturen handelt, muss die Probenpräparation entsprechend variiert werden (s. Abbildung 2.6).⁴⁸

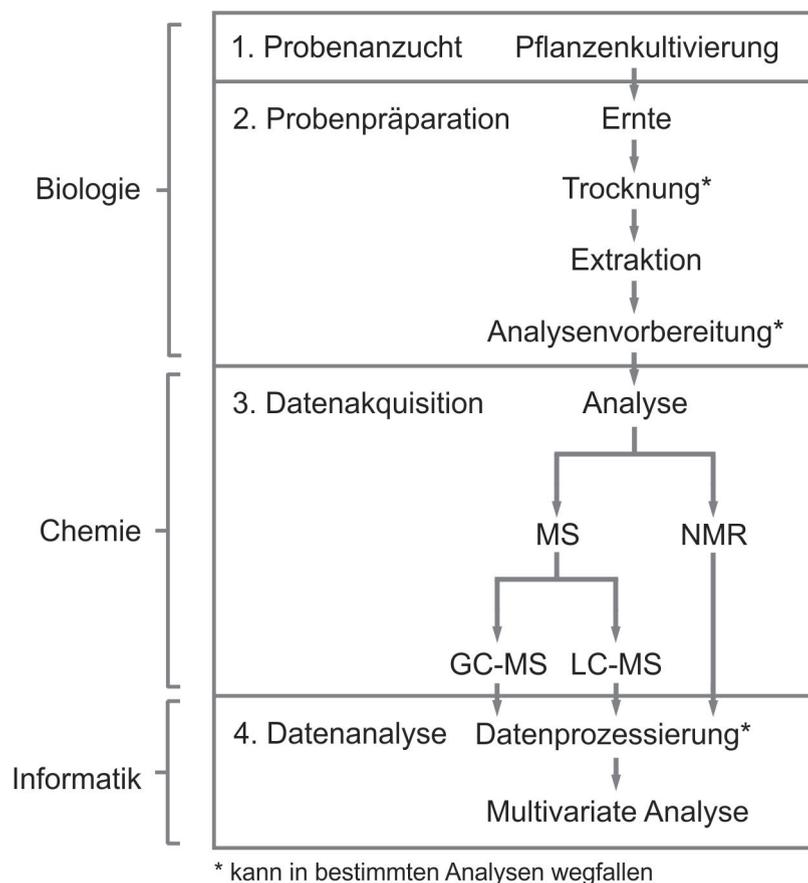


Abbildung 2.6: Nur durch die Synergien aus verschiedenen Forschungsbereichen kann eine adequate Analyse des Metaboloms durchgeführt werden. Hierbei nehmen u. a. die Themenfelder Biologie, Chemie und Informatik Schlüsselpositionen hinsichtlich der Probenanzucht, Probenpräparation, Datenakquisition und -analyse ein.⁴⁸

Jedes Protokoll beinhaltet Kompromisse zwischen guter Durchführbarkeit und Robustheit. Weitere Kriterien sind, möglichst viele Substanzklassen zu extrahieren oder instabile Moleküle, soweit möglich, vor Abbau und Zerfall zu schützen. Da Metabolite kleine Verbindungen sind, welche sich in ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften stark unterscheiden, kann es nicht ein Lösungsmittel für die Extraktion aller Metabolite geben. Die Lösungsmittelauswahl beschränkt die jeweilige Studie auf die Untersuchung bestimmter Substanzklassen. Das Lösungsmittel sowie die Extraktionsmethode wird zu Beginn der Studie empirisch getestet, um Unwegbarkeiten oder Fehlerquellen zu vermeiden. Größere Moleküle (> 1500 Da), Proteine und längere Zuckerketten werden aus praktischen Gründen in Bezug auf die Extraktion und Detektion ausgeschlossen.⁴⁰ Häufige Extraktionsmedien

sind wässrige, methanolische oder chloroformhaltige Lösungsmittelgemische.⁷ Um Fehlerquellen zu vermeiden und die individuelle Arbeitsweise des Experimentators einzugrenzen, werden vor jeder Studie sogenannte Standardarbeitsanweisungen (standard operating procedure = SOP) erprobt und anschließend für die gesamte Studie konstant gehalten. Jede Veränderung während der Studie, seien es wechselnde Bedingungen in der Anzucht der biologischen Proben oder das Prozessieren der aufgenommenen Spektren, kann die Verlässlichkeit der erhaltenen Daten verringern.²

Die Datenakquisition, -verarbeitung und -auswertung nehmen neben der Probenpräparation den höchsten Stellenwert in einer Metabonomics-Studie ein. In der Regel ist die enorme Menge an gewonnenen Daten nur durch ein bioinformatisches Datenmanagement zu bewältigen, um wichtige von unwichtigen Informationen zu trennen. Zwar ist der vorhandene Datenspeicher nicht annähernd so umfassend wie bei Genomics- oder Transkriptomicsansätzen, jedoch werden bereits Anstrengungen in Richtung standardisierter Datenbanken unternommen, um das Profiling von Daten zu ermöglichen. Die größte Herausforderung betrifft dabei die Datenanalyse selbst, welche das Ziel verfolgt, aus der Fülle an Daten Zusammenhänge herzustellen. Interaktionen zwischen Metaboliten oder welchen Einfluss äußere Lebensbedingungen auf einen Organismus ausüben können, sind häufig gestellte Fragen, die es zu beantworten gilt.⁴⁰

2.6.2 Anwendungsbeispiele

In den letzten Jahrzehnten beschränkten sich pflanzliche Metabolit-Studien aufgrund der Komplexität des Metaboloms meist auf Zielanalysen wie z. B. der Bestimmung von Hormonkonzentrationen vor und nach bestimmten Behandlungen.⁴⁰ Als jedoch der Bedarf nach einer systemweiten Analyse des pflanzlichen Metabolismus stieg, bestand die Möglichkeit etablierte Analysemethoden wie NMR spektroskopische oder massenspektrometrische Untersuchungen zu verwenden. Diese Analysemethoden wurden vor allem in der chemischen Analytik verwendet und weiterentwickelt, so dass auf fundiertes Wissen und robuste Techniken zurückgegriffen werden konnten. Dadurch konnten die benötigten Datenmengen generiert bzw. der damit verbundene, hohe Probendurchsatz im NMR-basierten Metabonomics-Ansatz gewährleistet werden. Zusätzlich wurden die Kosten pro Probe durch Automatismen auf ein Minimum reduziert.⁴²

Die NMR-Spektroskopie ist daher eine der effektivsten Methoden für die Analyse von Naturprodukten. Im Vergleich zu anderen Methoden wie der Massenspektrometrie ist die Probenpräparation simpel und bedarf keiner bestimmten Moleküleigenschaften wie der Derivatisierung oder Ionisierbarkeit. Allerdings ist ihr Einsatz durch ihre geringere

Empfindlichkeit bei niedrig konzentrierten Pflanzenmetaboliten wie etwa Hormonen eingeschränkt.¹⁵

Eine der frühen Anwendungsmöglichkeiten des NMR basierten Metabonomics-Ansatzes wurde als leistungsfähige und effiziente Analyse in Bezug auf Lebensmittel durchgeführt und für die Unterscheidung von Säften eingesetzt.⁴⁹ Grundsätzlich kann dieser Ansatz für Fragestellungen in der Grundlagenforschung, ebenso wie für die Anwendung im kommerziellen Bereich wie der Metabotypisierung oder Qualitätskontrolle verwendet werden.

2.6.2.1 Metabotypisierung und Populationsüberprüfung

Eine Metabotypisierung erfolgt, indem das bekannte Genom mit den gewonnenen Metabonomics-Daten in Bezug gesetzt wird. Der Phänotyp wird hierbei als Gesamtheit der Metabolite in einer Probe angesehen. Da der Genotyp den Phänotyp gerade auch in Hinsicht des Stoffwechsels, sowie die Interaktionsmöglichkeiten des Organismus mit seiner Umwelt prägt, kann eine Metabotypisierung somit auch nützlich für eine funktionelle Genanalyse sein.⁴²

Die Populationsüberprüfung hingegen identifiziert Gruppen innerhalb einer Population, um diese z. B. selektieren zu können. Diese kann entweder aufgrund der Überprüfung eines metabolischen Fingerabdrucks oder bestimmter bzw. einzelner Metabolite durchgeführt werden.⁵⁰

2.6.2.2 Qualitätskontrolle

Bei der Qualitätskontrolle kann die detaillierte Aufklärung der biochemischen Zusammensetzung u. a. dazu eingesetzt werden, um den Geschmack oder eine Krankheitsresistenz zu überprüfen, sowie auch Fälschungen zu entlarven. Je nach Kontext handelt es sich dabei um eine Populationsüberprüfung, welche einzelne Gruppen innerhalb einer Menge identifiziert. Diese kann entweder durch die Überprüfung eines metabolischen Fingerabdrucks oder einzelner Metabolite durchgeführt werden.⁵⁰ Die Qualitätskontrollen von Ginseng, von Pflanzen aus der traditionellen chinesischen Medizin oder von Weinen oder Säften sind nur einige Beispiele.^{26,51,52} Hierbei steht die Qualität von Nutzpflanzen in direktem Zusammenhang mit den enthaltenen Metaboliten und bestimmt den möglichen, kommerziellen Nutzen.

2.6.2.3 Biomarker

Der Begriff Biomarker steht für vielfältige Zeiger, welche auf bestimmte Zusammenhänge in Organismen hinweisen können. Er kann sowohl morphologische Merkmale, als auch einzelne Metabolite, Metabolitgruppen und deren Konzentrationen, DNA-Abschnitte, ebenso

wie Proteine beinhalten. Gemeinsam ist, dass diese Merkmale signifikant ein bestimmtes Geschehen wie eine genetische Veränderung oder auf den Organismus einwirkenden Stress anzeigen. Oft handelt es sich auch um mehrere Substanzen, die in einem spezifischen Muster vorkommen. So können z. B. verschiedene Pflanzen anhand solcher Biomarker-Pattern unterschieden werden.^{50,51}

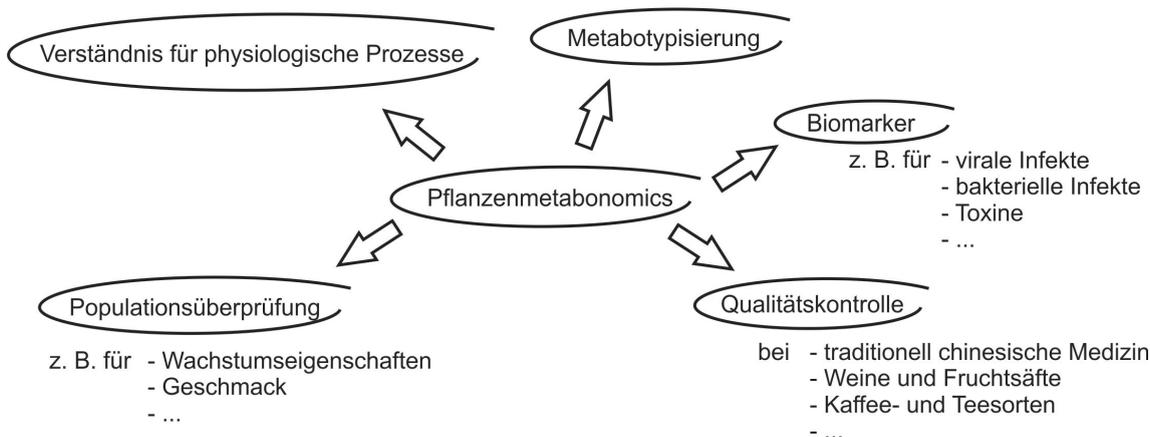


Abbildung 2.7: Anwendungsbeispiele von Pflanzen-Metabonomics. Mithilfe des Metabonomics-Ansatzes können bei Pflanzen physiologische und metabolische Prozesse detaillierter untersucht werden. Die Identifizierung von Biomarkern ist hierbei genauso entscheidend wie die Qualitätskontrolle oder Metabotypisierung.

2.6.2.4 Wesentliche Gleichheit

Um die Sicherheit von genetisch veränderten Organismen, welche der Ernährung dienen, gewährleisten zu können, kann z. B. die wesentliche Gleichheit (substantial equivalence) zwischen unveränderten und veränderten Sorten untersucht werden. So wurden Weizensorten, welche auf zwei unterschiedlichen Grundstücken drei Jahre lang angebaut wurden, erforscht. Für die Untersuchung wurde der metabolische Fingerabdruck mittels NMR-Spektroskopie genutzt. Mithilfe der gewonnenen Daten war es möglich, den Einfluss des Anbaus in Bezug auf die landwirtschaftliche Fläche bzw. des Anbaujahres festzustellen. Die genetische Veränderung dagegen, hatte im Vergleich eine geringere Auswirkung auf den Metabolismus. Es wurde aus diesen Ergebnissen geschlossen, dass die Umwelt, in der die Pflanze wächst, einen signifikanten Einfluss auf das Metabolom hat und dass in diesem Beispiel die Differenzen zwischen Kontroll- und transgener Pflanze in der Größenordnung des Umwelteinflusses lagen.^{2,53,54}

2.7 Bioinformatische Methoden

Die technischen Entwicklungen in den letzten Jahrzehnten ermöglichten in vielen Forschungsgebieten die Erfassung enormer Datenmengen. Die Auswertung erfordert daher bioinformatische Methoden, welche im folgenden im Zusammenhang mit dem Metabonomics-Ansatz näher erläutert werden.

2.7.1 Mustererkennungsmethoden

Bei den analytischen Verfahren für Metaboliten-Studien stellen u. a. die Überlagerungen von Signalmustern, die Isomerenunterscheidung bei der Massenspektrometrie bzw. letztendlich die große Menge an Molekülen in einer komplexen Matrix eine Herausforderung für die Datenauswertung dar. Die Informationen in einem NMR-Spektrum sind in Bezug auf eine definierte Fragestellung eher subtil, da die Spektren lediglich Informationen über Struktur oder Konzentrationen beinhalten. Erst der Experimentator analysiert und interpretiert die Daten.

In einem 1D ^1H -Spektrum können mehr als hundert Komponenten in einer einzigen Probe gleichzeitig erfasst werden. Der Vergleich mit anderen Spektren vervielfacht die Informationslast. Eine effektive Weise sich derart großen Datenmengen zu nähern und interessante von banalen Informationen zu trennen, ist die PR-Methode (pattern recognition). Hierbei wird die Informationsflut der vorhandenen Daten auf ein Minimum reduziert und klassifiziert. Am Beispiel der NMR-basierten Spektren bedeutet dies, dass das jeweilige Spektrum einer Probe als n-dimensionaler Raum angesehen wird, wobei die Dimensionen die individuelle Konzentration der Metabolite bzw. unterschiedliche Signalintensitäten darstellen. Mithilfe der unterschiedlichen Signalintensitäten werden die entsprechenden Hauptkomponenten (principle component = PC) berechnet, anhand derer ein mehrdimensionaler Raum aufgespannt wird. Durch diesen n-dimensionalen Raum können Varianzen innerhalb der Spektren visualisiert und für die Interpretation effektiv genutzt werden.

Solche Hauptkomponentenanalysen (PCA) dienen demnach der Datenreduktion mit dem Ziel, alle Ausgangsvariablen durch möglichst wenige Hauptkomponenten zu beschreiben. Anders gesehen, zeigen diese NMR-Spektren einen mehrdimensionalen Fingerabdruck des Organismus auf der Grundlage der gemessenen Proben, wobei sich dieser in Abhängigkeit zu bestimmten Faktoren wie Krankheit oder Stress verändert.⁹

Bei Mustererkennungsmethoden wie der beschriebenen PCA oder der Partial Least Square Regressionsmethode (PLS) sollte jedoch mit der Entwicklung von Hypothesen und Schlussfolgerungen vorsichtig umgegangen werden. So ist die Durchführung von Blindtests z. B. zur Kontrolle eines Modells unabdingbar.

Bereits bei dem experimentellen Design und der damit verbundenen Fragestellung an das System oder den Modellorganismus ist eine genaue Kenntnis über dieses notwendig. Dies beinhaltet u. a. mögliche Fehlerquellen bei der Anzucht zu kennen, ebenso wie die Kenntnis des Lebenszyklus oder Herkunft des Materials, sowie der für die Anzucht benötigten Materialien und Methoden. Auch die Studie selbst sollte kritisch auf den etwaigen biologischen Nutzen hinterfragt werden. So ist die Reproduzierbarkeit von Daten allein kein Indiz dafür, dass eine Studie korrekt durchgeführt wurde, da systematische Fehler auch reproduzierbar sind.¹¹ Die Studienkonzeption sollte demnach in die bereits bestehende, biologische Forschung integrierbar sein und gegebenenfalls durch ergänzende Daten interpretiert werden.

2.7.2 Gesteuerte und ungesteuerte Datenanalyse

Die PCA stellt die am weitverbreiteste Mustererkennungsmethode für die Auswertung von Metabonomics-Studien dar. Sie ist eine ungesteuerte Methode (unsupervised method), d. h. sie beruht allein auf statistischen Gegebenheiten. Die Hauptkomponenten entsprechen dabei Parametern, welche durch Linearkombinationen der Anfangsvariablen berechnet werden. Die ursprünglichen Variablen werden mit geeigneten Gewichtungsfaktoren versehen und in eine neue Menge, unkorrelierter Hauptkomponenten transformiert. Die erste Hauptkomponente enthält dabei den größten Anteil der Varianz des Datensatzes, wobei mit steigender Hauptkomponentenzahl die entsprechende Varianz kleiner wird. Dadurch, dass die ersten Hauptkomponenten den größten Teil der Varianz zeigen, kann die Dimension des Problems verringert werden.⁵⁵ Ein Plot der Hauptkomponenten zeigt anschaulich die größten Varianzen, indem sie in einem zwei- oder dreidimensionalen Raum dargestellt werden. Die Beziehung der Variablen in dem neuen Hauptkomponentenraum (Scores-Plot) und den spektroskopischen Daten bzw. Ursprungsvariablen (Bucket Tabelle = X-Tabelle) werden als sogenannte Loadings bezeichnet. Ein hohes Loading der Variablen indiziert, dass der entsprechende Bereich (oder Peak) im Spektrum einen signifikanten Einfluss auf die multivariate Analyse ausübt. Der Loadings-Plot verbindet somit die statistischen Berechnungen mit den spektroskopischen Daten. Dies ist entscheidend, da die PCA lediglich statistische Phänomene, aber nicht deren Ursache darstellt.¹⁴

Der sogenannte Modellraum oder Scores-Plot wird durch die PCs aufgespannt und stellt einen reduzierten Varianzraum dar. Für jedes Spektrum kann die Distanz zu diesem Raum (Modell) und die Distanz zum Zentrum (Modellzentrum) des Raumes berechnet werden. Wird die Distanz zum Modell und zum Modellzentrum gegeneinander aufgetragen und Vertrauenslinien miteinbezogen, kann darüber Auskunft gegeben werden, welches Spek-

trum im und welches außerhalb des Modellraumes liegt. Der entsprechende Plot heißt Influence-Plot. Die Position der Vertrauenslinien ist u. a. abhängig von der Anzahl der PCs oder auch der verwendeten Spektren.

Aufgrund der Möglichkeit multivariate Datenmengen effektiv zu visualisieren, wird die PCA meist als Startpunkt für die Auswertung von metabolischen Studien verwendet. So können dynamische Prozesse mittels metabolischer Trajektorien verfolgt werden, welche den Verlauf bestimmter Entwicklungen beschreiben. Ein solcher Verlauf wäre z. B. die Probenentnahme nach Toxinzugabe in definierten, zeitlichen Abständen. Die daraus gewonnenen Daten werden in der entsprechenden PCA dargestellt, wobei ein Überblick über die spektralen Informationen erhalten wird.¹³

Werden Spektren innerhalb des Modellraums als Modell oder Klasse gespeichert, können über einen Vergleich weitere Spektren kategorisiert werden. Diese Methode wird als SIMCA-Klassifizierung (kommerzielle, multivariate Analysesoftware von Umetrics) bezeichnet und stellt eine gesteuerte Methode (supervised method) dar. Die SIMCA-Klassifizierung beinhaltet u. a. die Spektrenauswahl sowie die Durchführung der Testklassifizierungen, um ein solides Modell zu bilden.⁵⁶

Falls zusätzliche Informationen wie bestimmte Metabolitkonzentrationen zu den jeweiligen Spektren vorhanden sind, können diese in Bezug zu den Ursprungsvariablen (Bucket-Tabelle) gesetzt werden. Diese Methode wird als Partial Least Square Regression (PLS) bezeichnet. Sie dient der Bestimmung einer Korrelation zwischen Tabelle X (Bucket-Tabelle) und weiterer tabellarischer Daten (Tabelle Y). Dies findet unter der Annahme statt, dass ein klar definierter Zustand über die Gesamtheit eines Spektrums beschrieben werden kann. Die PLS wird mit zusätzlichen Daten ergänzt und gehört ebenfalls zu den gesteuerten Methoden. Falls die Korrelation eine Differenzierung der metabolischen Daten bewirkt, kann die erhaltene PLS als Modell verwendet werden.

Genauer betrachtet startet die PLS also mit Spektren, welche in eine Bucket Tabelle übersetzt werden. Diese Tabelle wird als Tabelle X (s.o.) bezeichnet. Die Anzahl der Variablen von X entsprechen der Bucket- und Spaltenanzahl der Tabelle. Die zweite Tabelle mit der zusätzlichen Information wird als Y-Tabelle bezeichnet. Dabei ist die Anzahl der Y-Variablen identisch zu deren Spalten. Während die PCA die Richtung der maximalen Varianz in der X-Tabelle angibt, findet die PLS die beste Korrelation zwischen den X- und Y-Tabellen, indem sie relevante Linearkombinationen der Variablen verwendet. Die Resultate der PLS sind denen der PCA in der Darstellungsart gleich, wobei ebenfalls ein Scores- und Loadings-Plot erhalten wird.

Die PLS wird aus zwei Gesichtspunkten eingesetzt. Zum einen kann, falls bei Spektren

die zusätzliche Information fehlt und keine Wiederholung der Proben durchführbar ist, die Y-Information aufgrund der bestehenden Daten berechnet werden. Zweitens wird sie eingesetzt, falls eine Gruppierung in der PCA nicht eindeutig ersichtlich ist, wobei auch Korrelationen gefunden werden, welche von größeren Varianzen überlagert werden.⁵⁶

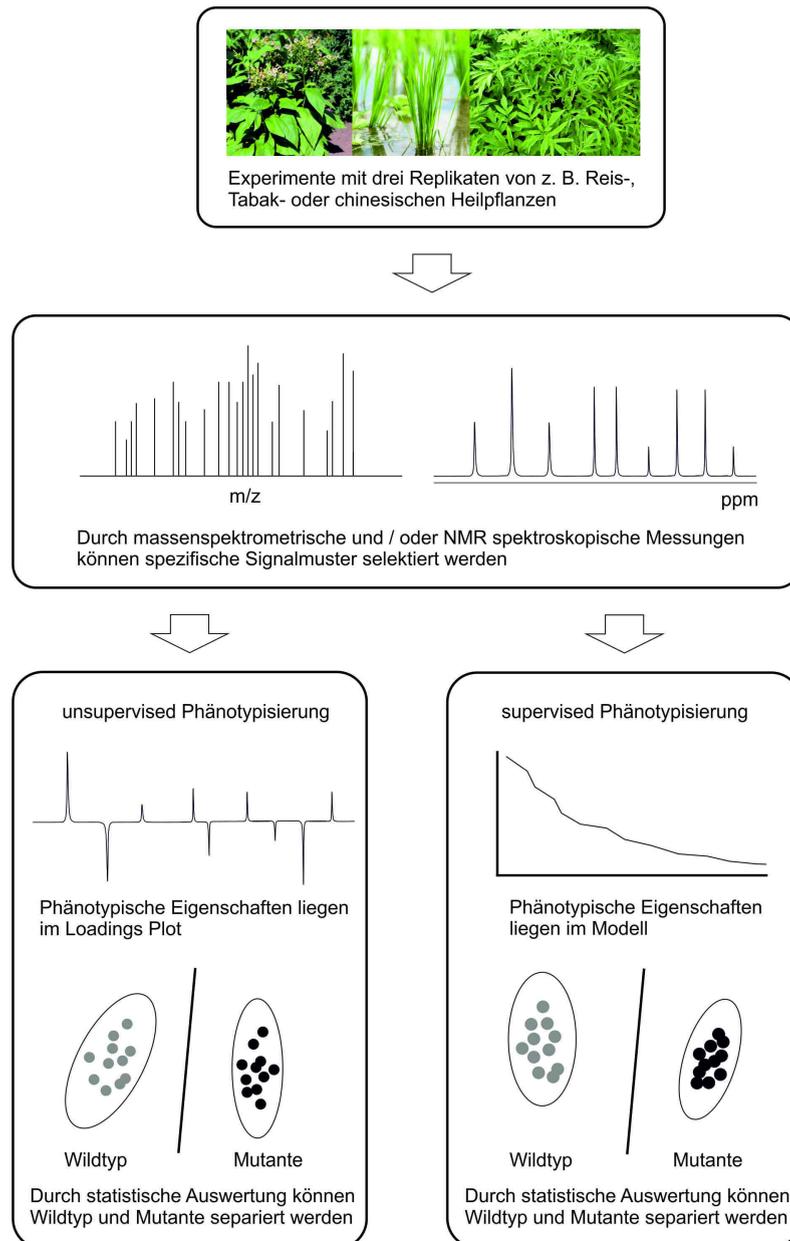


Abbildung 2.8: Abbildung der gesteuerten (supervised) und ungesteuerten (unsupervised) Datenanalyse, wobei schematisch auf die Unterschiede der beiden Strategien eingegangen wird.

2.8 NMR-Experimente

Für NMR-basierte Metabonomicsmessungen wird häufig die Standardpulssequenz des 1D ^1H -NOESY mit Vorsättigung verwendet. Wichtige Vorteile dieses Experiments sind die kurze Akquisitionszeit und die relativ gute Empfindlichkeit, da es sich bei den detektierten Kernen um Protonen handelt. Des Weiteren ist die hohe Qualität der Wasserunterdrückung, die durch das Experiment erreicht werden kann, für Metabonomicsexperimente entscheidend. Das in der Probe enthaltene Wasser würde den dynamischen Bereich erheblich verringern und andere Signale überlagern. Auch würden die Signale gering vorkommender Komponenten, welche nahe am Detektionslimit des Spektrometers liegen, im Rauschen untergehen. In der Sequenz gehen bestimmte ^1H NMR Resonanzen wegen eines H/D-Austauschprozesses durch die Vorsättigung bzw. wenn nach der Gefriertrocknung oder zur Probenpräparation eine größere Menge Deuteriumoxid hinzugegeben wird, verloren. Dies schließt nicht nur die NH und OH-Protonen mit ein, sondern ebenso sehr azide Gruppen, wie sie z. B. bei der CH_2 -Gruppe von Acetoacetat durch die Ketoenolautomerie vorkommt.²⁰

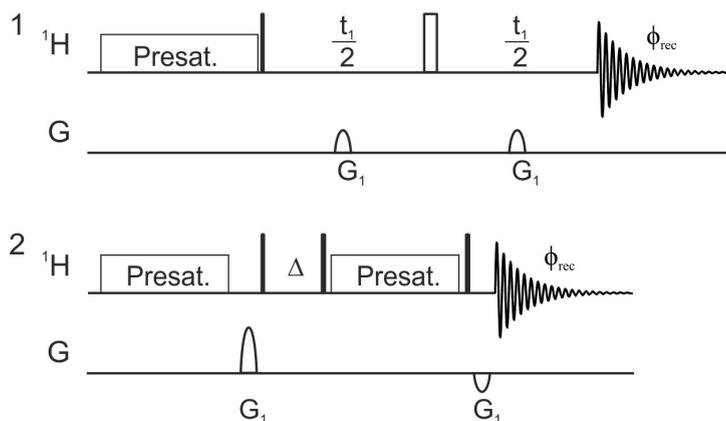


Abbildung 2.9: Pulsprogrammsequenzen eines pseudo 2D J -aufgelösten (1) und eines 1D ^1H -NOESY Experiments (2). Durch die Vorsättigung des Wassersignals während des Relaxationsdelays wird der dynamische Bereich erheblich vergrößert und selbst gering konzentrierte Substanzen können detektiert werden.

Obwohl 1D NMR-Studien in vielerlei Hinsicht sehr nützlich sind, z. B. um metabolische Fingerabdrücke zu generieren, ähnliche Gruppen zu klassifizieren oder einen Überblick über die Menge an Inhaltsstoffen in einer Probe zu erhalten, kann die Fülle an Informationen ein Problem darstellen. Überlappende Peaks können die Identifizierung einzelner Metabolite erschweren oder diese gar unmöglich machen. Deshalb werden zusätzlich 2D NMR-Studien für die Charakterisierung von nicht identifizierten Komponenten aus 1D Spektren verwendet, wobei meist das J -aufgelöste ($J\text{RES}$) Experiment aufgrund seiner

relativ zu anderen 2D Experimenten geringen Messzeit eingesetzt wird.^{26,57}

Ein *J*RES Spektrum separiert die chemische Verschiebung und die Spin-Spin Kopplungsdaten in getrennte Achsen, so dass die Projektion der chemischen Verschiebungsachse einem ^1H entkoppeltem NMR-Spektrum gleicht. Das Resultat sind vereinfachte NMR Spektren, welche weniger Resonanzen enthalten. Die Reduzierung der Signalfülle in einem *J*RES Spektrum erhöht die Wahrscheinlichkeit, spezifische Metabolite zu identifizieren.^{58–60}

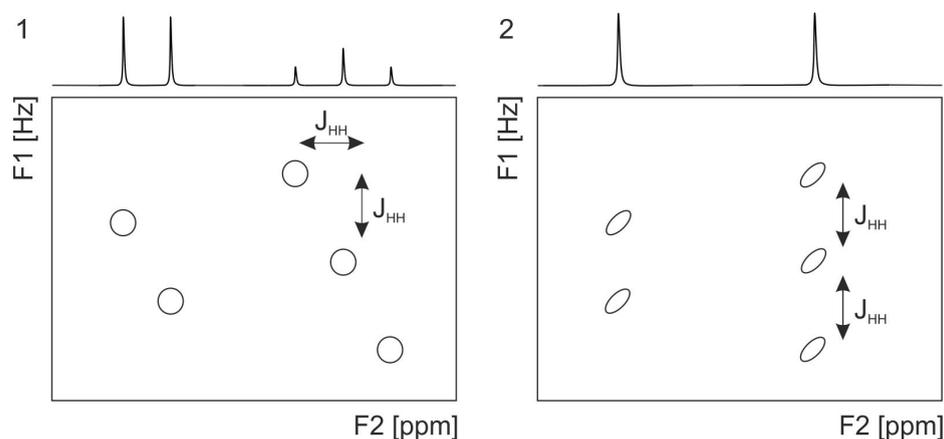


Abbildung 2.10: Darstellung eines *J*-aufgelösten Spektrums und eines um 45° verschobenen *J*-aufgelösten Spektrums. Durch den Tilt wird das Spektrum virtuell entkoppelt und Signalmultipletts werden zu Singulets, wodurch die Interpretation der Daten wesentlich erleichtert wird.

2.9 Zielsetzung und verwendete Modellorganismen

Die Zielsetzung dieser Arbeit war die Anwendung des Metabonomics-Ansatzes auf botanische Modellorganismen wie Reis und Tabakflüssigzellkulturen, welche bereits in der Vergangenheit detailliert erforscht wurden. Die Anforderungen an den Organismus für die erste Studie war es, ein leicht zugängliches System mit der Möglichkeit einer hohen Anzahl an Proben und einer einfachen Durchführung des experimentellen Designs zu gewährleisten. Dadurch sollten Fehler für die erste Anwendung eines Metabonomics-Ansatzes minimiert werden.

Die in Pflanzen synthetisierten Moleküle aus dem Sekundärmetabolismus stellen ein chemisches Arsenal gegen äußere Einflüsse dar. Diese Substanzen sind jedoch nicht nur nützlich für die Pflanze selbst, sondern beinhalten auch ein großes Potential für die pharmazeutische Anwendung am Menschen. Die meisten dieser Komponenten werden allerdings, in spezialisiertem Gewebe, in einzelnen Zellen oder in einem spezifischen, funktionellen Kontext gebildet, wobei die Gewinnung häufig über den Anbau der Pflanzen selbst, über deren Ernte bzw. Isolation stattfindet. Auch die Einführung der metabolischen Biosynthesewege

in Organismen wie Hefen oder Bakterien ist nicht möglich, da die Synthese oft restriktiv an bestimmte, pflanzenspezifische Strukturen wie Plastiden gebunden ist oder in Abhängigkeit zu bestimmtem Gewebe steht. Ein weiterer Ansatz wäre das sogenannte Molecular Farming, welches die Produktion pflanzlicher Substanzen aus Zellkulturen beabsichtigt. Diese Strategie ist jedoch derzeit limitiert, da die Biosynthese vieler, interessanter Substanzen erst durch eine Differenzierung des Pflanzengewebes ermöglicht wird. Eine Möglichkeit zur Lösung dieses Problems wäre, die Kontrolle des Metabolismus z. B. durch äußere Signale wie Licht zu steuern. Licht ist für die meisten Pflanzen lebensnotwendig und wird selbst in geringsten Mengen wahrgenommen. Zudem kann Licht vielfältig eingesetzt werden, da es im Vergleich zu Chemikalien zeitlich und räumlich präzise angewendet werden kann, um gezielt die Biosynthese bestimmter Stoffe anzuregen. Allerdings existieren bisher nur wenige lichtreaktive Pflanzenzellkulturen. Deshalb wurde für diese Studie die lichtempfindliche Zelllinie VBI-3 und die nicht lichtempfindliche Zelllinie VBI-0 verwendet, um durch den Metabonomics-Ansatz spezifische Signalmuster zu analysieren und zu vergleichen. Gleichzeitig konnte mit dieser Studie die Robustheit der Zellkultur und der hier eingeführten SOPs überprüft werden.

Mit der zweiten Studie an Reiskeimlingen wurde der Metabonomics-Ansatz auf einen komplexeren Organismus angewendet. Ziel war es hierbei, zum einen zu überprüfen, ob die erarbeiteten SOPs von angeleiteten Personen in der gewünschten Exaktheit durchgeführt werden können und zum anderen, ob durch die Durchführung zweier Experimentatoren die Reproduzierbarkeit der Daten gegeben ist. Auch bei dieser Studie können die gewonnenen Daten in bestehendes Wissen eingebracht werden, da es sich hierbei um ein bereits intensiv erforschtes Modellsystem handelt. Weiterhin sollten die Reismetabolite unter Salzstressbedingungen analysiert und mit salztoleranteren Mutanten verglichen werden, um so die jeweiligen, metabolischen Prozesse besser verstehen zu lernen.

2.9.1 Modellorganismen

Die Erforschung biologischer Fragestellungen erfordert Modellorganismen. Im Forschungszweig der Botanik werden unterschiedliche Modellorganismen und selbstverständlich gänzlich andere als in der zoologischen Forschung verwendet. Allgemeine Kriterien für die Auswahl eines Modellorganismus sind eine schnelle Fortpflanzung und Entwicklung, die Größe des Organismus, seine Handhabung in Bezug auf die Anzucht und seine Reproduzierbarkeit unter Laborbedingungen. Weiterhin spielt die Transformierbarkeit und Beobachtungsmöglichkeit der Entwicklung eine entscheidende Rolle. Der Organismus sollte idealerweise ein kleines Genom zur genetischen Charakterisierung besitzen bzw. in der Forschung weit

verbreitet sein, um Synergien anderer Experten und Forschungsgebiete zu nutzen. Letztendlich muss auch die Eigenschaft als Modellsystem durch die physiologische Erforschung ausreichend dokumentiert sein.

Das Modellsystem sollte einen experimentellen Zugang zur Untersuchung von bestimmten Einzelaspekten gewährleisten bzw. auf allgemeingültige Gesetze der Biologie anwendbar sein. Diese Gesetze können z. B. die Integration der einzelnen Zelle in einem Organismus oder auch die Entwicklung eines Organismus im Zeitverlauf betreffen. Weiterhin können Untersuchungen zu neuen Stoffwechsellösungen wie beim Molecular Farming angestrebt werden.

Es bestehen jedoch Grenzen der Übertragbarkeit. So muss festgestellt werden, ob ein erforschtes Gesetz, welches an einem bestimmten Modellorganismus entdeckt wurde, nur für diese Art, für das Reich oder allgemein für das Lebewesen eine Gültigkeit aufweist. In Bezug auf Pflanzen und Tiere ergeben sich viele Organisationsunterschiede wie z. B. die Anpassungsfähigkeit durch eine offene Entwicklung bei Pflanzen, wohingegen Tiere die Trennung von Keimbahn und Soma perfektionierten. Ein weiteres Beispiel ist, dass bei Pflanzen und Pilzen die Kern-Plasma-Relation außer Kraft gesetzt und die Zellgröße dadurch sehr variabel ist. Bei Tieren hingegen ist die Zellgröße stark reguliert und das Wachstum vor allem über eine Zellvermehrung geregelt.⁴⁷ Die Strategien der jeweiligen Lebensform zeigen sich daher in den Grundlagen und Ursachen des Genoms, Proteoms oder Metaboloms.

Eine Herausforderung bei der Definition biologischer Gesetzmäßigkeiten liegt in der differentiellen Organisationsstruktur verschiedener Organismenreiche, in eventuellen Abweichungen, sowie in den Grenzen wissenschaftlicher Kenntnis, welche durch definierte Fragestellungen bereits bestimmte Antworten in den Fokus stellen. Auf dieser Grundlage werden dann Reaktionen oder experimentelle Daten tendenziell in der erwarteten Richtung betrachtet. Wir können also nur sehen, wonach wir suchen oder worauf wir unseren Blick lenken. Dadurch wird unser Gewinn an Erkenntnis zwar erheblich eingeschränkt, jedoch durch die Vergegenwärtigung dieser Tatsache kann sie uns gleichzeitig vor allzu starker Detailsuche bewahren.⁴⁷

2.9.2 Tabakflüssigzellkulturen

Da Pflanzen nicht vor schädlichen Einflüssen oder Gefahren fliehen können, ist eine Anpassungsstrategie, wie eine sehr breitgefächerte Biosynthese unterschiedlichster Stoffe, welche zur Abwehr oder Verbesserung der Stresstoleranz dienen, essentiell. Auch die Flexibilität in der Pflanzenentwicklung ist ein Beispiel für die Anpassungsstrategie der Pflanzen, wel-

che eine flexible Antwort des Zellwachstums mit einschließt. So findet die Zellstreckung im Vergleich zu belichteten Zellen in Dunkelheit vermehrt statt. Diese eher schnelle Antwort wird durch eine etwas langsamere Produktion von morphogenetischen Elementen wie Zellen, mehrzelliger Strukturen oder Organe ergänzt.⁶¹

Dabei erfordert die offene Morphogenese von Pflanzen die Koordination der Musterbildung durch interzelluläre Signale. Die Tabakzelllinie VBI-0 ('Virginia Bright Italia 0') bietet ein einfaches Modellsystem, an welchem die Rolle der interzellulären Kommunikation in der Musterbildung erforscht werden kann. Die Vorteile einer Zellkultur gegenüber einer Pflanze sind, dass die Anzucht schneller verläuft und die Experimente einfacher durchführbar sind. Die Zelllinie wurde durch die Kultivierung aus einer Gewebeprobe der Tabaksorte 'Virginia Bright Italia 0' in Hellers Flüssigmedium initiiert.^{62,63}

Der Kulturzyklus der VBI-0 Tabakflüssigzellkultur besteht aus zwei Phasen (s. Abbildung 2.11). Nach der Kultivierung erfolgt eine axiale Zellteilungsphase, welche aus mehrzelligen Zellfäden besteht und eine klare Polarität mit einem spitzen, apikalen Ende und einem runden teilweise abgeflachten basalen Ende besitzt. Während dem zweiten Teil des Kulturzyklus wachsen die Zellfäden durch Expansion entlang der Zellreihe und beginnen sich voneinander teilweise zu lösen. Die komplette Auflösung der Zellfäden in einzelne Zellen markiert das Ende des Kulturzyklus. Es kann ein neuer Zyklus durch Inokulation in frisches Medium gestartet werden. In der 3-Wochenkultur sind die meisten Zellteilungen am siebten Tag nach Subkultivierung zu beobachten, welches an langen Zellfilamenten mit bis zu zehn Zellen pro Faden zu erkennen ist. Zwischen dem zehnten und zwanzigsten Tag sinkt die Anzahl der Zellen pro Faden bis zur kompletten Auflösung der Zellfäden. Die charakteristische Mikromorphologie von VBI-0 bzw. ihre Zyklusänderungen im Sinne eines Subkultivierungsintervalls kann durch die Auxinkomposition des Mediums beeinflusst werden. Die Charakterisierung der Zellkultur erfolgt nach morphologischen Anzeichen wie Zell- und Filamentgröße bzw. Anzahl der Zellen. Dabei ist es bei der VBI-0-Kultur das exogene Auxin, das den neuen Kulturzyklus auslöst und den Zellzyklus synchronisiert.⁶⁴ Der Nachteil dieser Zellkultur war jedoch, dass keine morphologische Reaktion auf Licht festgestellt werden konnte.

Für die Erforschung lichtabhängiger Musterbildung wurde deshalb nach lichtempfindlichen Tabakzellkulturen in der Zelllinie VBI-0 gesucht. Dabei konnte die lichtempfindliche und auxinautonome Zelllinie VBI-3 ('Virginia Bright Italia 3') isoliert werden. Wie in der Stammzelllinie VBI-0 ist die Zellteilung während der exponentiellen Wachstumsphase synchronisiert. Diese Synchronität kann ebenfalls durch 1-*N*-Naphthylphthalaminsäure (Auxintransportinhibitor) inhibiert werden und wird vom Abbau der Actinfilamente be-

gleitet. Bei der VBI-3-Zellkultur kann die Synchronität wiederhergestellt werden, indem die Zellen zum einen unter konstanten Lichtbedingungen inkubiert werden oder Auxin zugegeben wird. Im Vergleich kann die VBI-0-Kultur nur überleben, indem exogenes Auxin zugefügt wird. Die Überlebenschancen der VBI-3-Zellkultur waren am besten unter kontinuierlichem, hellrotem Licht zu beobachten, gefolgt von kontinuierlichem Blaulicht, während kontinuierliches Rotlicht am ineffektivsten war. VBI-0 und VBI-3 sind im Bezug auf ihren Lebenszyklus, die Achsenbildung der Zellfäden, sowie die Synchronität der Zellteilung gleich. Jedoch bildet die VBI-3 Zellkultur im Gegensatz zur VBI-0 Kultur chlorophyllhaltige Plastide, sobald diese unter Lichtbedingungen kultiviert wird. Die Synchronität unter Lichtbedingungen ist im Vergleich zu den in Dunkelheit gezogenen Kulturen nicht signifikant verändert.⁶⁵

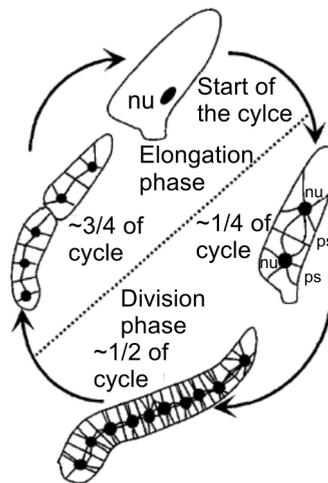


Abbildung 2.11: Darstellung des Zellzyklus der Tabakzelllinie VBI mit Start- und Endpunkt bzw. Elongations- und Teilungsphase.⁶³

2.9.3 Reis

Reis (*Oryza sativa* L.) ist ein wichtiges Grundnahrungsmittel, welches hauptsächlich in Asien angebaut und von über 50% der Weltbevölkerung täglich konsumiert wird. Aufgrund seiner 8000 jährigen Domestizierung als Nutzpflanze besitzt Reis eine einheitliche Keimung einhergehend mit einer geringen Dormanz. Des Weiteren zeichnet sich die Reis-pflanze durch große Samen mit enthaltenen Speicherstoffen aus. Da Reis im Vergleich zu anderen Getreidesorten das kleinste Genom (diploid) besitzt, wird er oft als Modellorganismus verwendet. Gleichzeitig ist er aber auch in vielen angewandten Forschungs- und Entwicklungszeitschriften zu finden, da er eine herausragende Bedeutung in der Welternährung hat.^{66,67}

Problematisch ist die Salzempfindlichkeit von Reis, da der Anbau vornehmlich in warmen Regionen stattfindet und dort für eine ausreichende Bewässerung gesorgt werden muss. Meist werden einfache Bewässerungssysteme ohne Drainagen angelegt, sodass das anfallende Wasser nicht zirkuliert und Salze sich anhäufen. Dies hat zur Folge, dass weltweit bisher mehr als 80 Millionen Hektar von bewässertem Land durch Versalzung unfruchtbar wurde, welches ca. 40% der Gesamtheit von bewässertem Land entspricht.⁶⁸ Salzkontaminierte Böden verhindern nicht nur die Aufnahme von Wasser, sondern setzen gleichzeitig die Verfügbarkeit von Mikronährstoffen herab, während sie die Konzentration an toxischen Ionen in Pflanzen erhöhen und damit die Ertragsquantität und -qualität erniedrigen. Auf der zellulären und molekularen Ebene verursacht Salzstress eine Membrandisorganisation, metabolische Toxizität, die Produktion von ROS (reactive oxygen species = reaktive Sauerstoffradikale) sowie die Störung der Photosynthese.^{69–71}

Um unter Salzstressbedingungen überleben zu können, entwickelten Pflanzen viele Mechanismen. So findet eine selektive Akkumulation oder Exklusion von Ionen statt, die Biosynthese von *Compatible Solutes* (Stoffe zum Schutz gegen Salzstress) wird eingeleitet oder Ionen werden in separaten Kompartimenten komplexiert. Zusätzlich findet eine Induzierung antioxidativer Enzyme und eine adaptive Regulation von Pflanzenhormonen wie Jasmonaten statt.⁷²

Jasmonsäure und ihre Derivate sind von Lipiden abgeleitete Pflanzenhormone. Als wichtige Regulatoren der Photomorphogenese aktiviert sie Photorezeptoren, welche in Reis u. a. die Inhibition des Koleoptilenwachstums als zentrales Ereignis hervorruft und darum zur Beschreibung des Phänotyps unter Lichtbedingungen dient.⁴⁵ Als ein wichtiges Signalmolekül auf biotische und abiotische Stressoren wird Jasmonsäure zur Erforschung der Stressantwort in Reis verwendet. Sie induziert z. B. die chemische Abwehr nach Verwundung oder ist bei verschiedenen Entwicklungsprozessen der Pflanzen involviert. Die bioaktive Form von Jasmonaten ist die Aminosäure konjugierte Form Jasmonoylisoleucin (Ja-Ile). Die Jasmonsäurebiosynthese beginnt in den Chloroplasten mit der Abspaltung von α -Linolensäure aus Membranlipiden.⁷³ Es wurde gezeigt, dass Jasmonate als Auslöser für die Induktion des Pflanzensekundärmetabolismus durch extensive transkriptionelle Umkodierung fungieren. Daher ist die metabolische Antwort in Pflanzen auf Jasmonate sehr komplex und verschieden.⁷⁴ Verschiedene Studien haben die biologische Relevanz des Jasmonsäuresignalweges in durch Salzstress behandeltem Reis untersucht.^{75–77}

Um die Stressqualität unterscheiden zu können, muss es weitere Interaktionen zwischen parallelen Signalketten geben bzw. die unterschiedliche Art und Schwere des Stresses muss sich im Metabolismus widerspiegeln. Die Reaktionen der Reispflanzen sind sowohl auf

genetischer, hormoneller als auch metabolischer Ebene sehr komplex. Es können z. B. Osmoprotektive angereichert werden, welche eine gängige Anpassungsstrategie gegen Salz- und Trockenstress darstellen. Diese Substanzen sind kleine organische Moleküle, welche für die Entgiftung der ROS sorgen und die Quartärstruktur von Proteinen stabilisieren. Die wichtigsten Osmoprotektive sind Prolin, Betain, Trehalose und Myo-Inositol. Eine wichtige Eigenschaft von Osmoprotektiven ist, dass ihre nützlichen Effekte generell nicht speziesabhängig sind, sodass artfremde in Pflanzen integriert werden und so die neue Art schützen.⁷⁷

Die für die Metabonomics-Studie verwendeten Reissorten (*Oryza sativa L. cv Nihonmatsari*) werden nun im Folgenden vorgestellt. Es handelt sich um eine Wildtypsorte und die zwei Mutanten *hebiba* (Japanisch für Schlangenblatt) und *cpm2* (*coleoptile photomorphogenesis 2*). Diese wurden durch eine gezielte Suche nach Reissorten, welche ein abweichendes Wachstum unter Lichtbedingungen zeigten, gefunden. Dabei ist die Reiskoleoptile ein nützliches System, um die Interaktionen zwischen Licht, Hormonsignalwirkung und der Photomorphogenese zu untersuchen. An Licht gewachsene Koleoptile antworten auf Licht, indem ihr Wachstum inhibiert wird. Unter Lichtbedingungen ist die Koleoptile demnach kurz und wird vom Primärblatt durchbohrt (s. Abbildung 2.12). Bei *hebiba* ist das Koleoptilenwachstum durch Anwesenheit von hellrotem Licht stimuliert, in Dunkelheit inhibiert wird. Diese Photoinhibition wurde für die Suche nach Reissorten verwendet, die eine geminderte Lichtantwort zeigten.

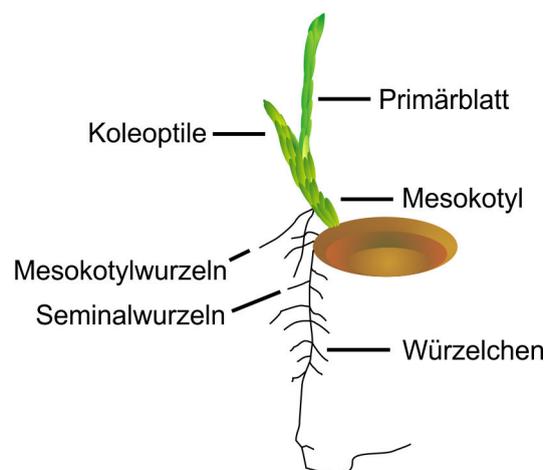


Abbildung 2.12: Darstellung des schematischen Aufbaus eines Reiskeimlings.⁷⁸

Hebiba ist eine Mutante, bei welcher eine jasmonsäureinduzierte Lipase bzw. zahlreiche Gene des Jasmonsäure-Biosynthesewegs gehemmt sind. Jasmonsäure ist wie Auxin ein Pflanzenhormon und leitet sich von der α -Linolensäure ab. Sie ist ein Warnstoff bei der pathogenen Abwehr, wobei befallene Blätter die Gefahr an den Rest der Pflanze oder auch

an die Nachbarpflanzen weiterleiten, welche daraufhin ihrerseits präventive Abwehrreaktionen anschalten. Diese als systemhervorgerufene Abwehr (systemic acquired resistance = SAR) bezeichnete Reaktion, findet sich analog im Tierreich in der unspezifischen Immunabwehr wieder. Die *cpm2* Linie besitzt wie *hebiba* einen Defekt im Gen der Allenoxydyclase. Dieses Enzym ist in die Jasmonsäurebiosynthese involviert, deshalb zeigt *cpm2* einen zu *hebiba* ähnlichen, jedoch nicht so stark ausgeprägten morphologischen Phänotyp.^{5,79} Die adulten *hebiba* Pflanzen können phänotypisch durch extensives Blattwachstum charakterisiert werden. Die Blätter sind im Gegensatz zu den dunkelgrünen Blättern des Wildtyps lichtgrün.⁸⁰ Die Lichtantwort von endogener Indol-3-Essigsäure und Abscissinsäure sind zwischen Wildtyp und *hebiba* identisch. Während der WT einen dramatischen Anstieg von Jasmonsäure und ihren Derivaten zeigt, wird dies bei *hebiba* durch Lichtinduktion oder Verwundung nicht festgestellt. Der Mutantenphänotyp kann jedoch durch exogenes Jasmonat und seinen Vorgänger 12-oxo-Phytodienonsäure (OPDA) geheilt werden.

3. Material und Methoden Teil 1

3.1 Chemikalien, Geräte, Medien

Deuteriumoxid	Eurisotop
Dinatriumhydrogenphosphat	Fluka
Einmalspritzen	Inject, B. Braun, 0.01–1 mL, B. Braun
Falcon	Falcon Tubes, 50 mL, 15 mL, Carl Roth GmbH
Saugflasche	Carl Roth GmbH
Kulturflaschen	Erlenmeyerkolben, 100 mL
Lyophylle	Christ, Alpha 2-4, LOC-1
Methanol	Carl Roth GmbH
Natriumazid	Carl Roth GmbH
Natriumchlorid	Fisher Scientific
Natriumdihydrogenphosphat	Fluka
NMR Spektrometer	600 MHz Avance III, Bruker
NMR Spektrometer	600 MHz Avance I, Bruker
Nutsche	Carl Roth GmbH
Parafilm	Laboratory film, American National Can
Pasteurpipetten	Wilma Lab Glass
Pflanzenzellkulturmedium	Musrashige and skoog salts, pH 5.8

Pflanzenzellkulturflüssigmedium	Hellers
pH-Elektrode	WTW SenTix 41
Pinzette	Carl Roth GmbH
Pipetten	Research [®] Pipette Eppendorf, autoclavable HTL
Pipettenspitzen	Finnpipette, Rainin, Sarstedt
Probenköpfe	600 MHz ¹ H, ¹³ C, ¹⁵ N-TCI-Cryo- und TBI-Probenkopf
Reinstwasseranlage	Millipore
Rundfilter	Rotilabo [®] -Rundfilter, Typ 11A
Safe-seal Reagiergefäße	1.5 mL, 2 mL, Sarstedt
Salzsäure 30%	Carl Roth GmbH
Schüttler	IKA KS 260 basic, Certomat BS-1
IKA Labortechnik Siebgewebe	F. Eckert GmbH, PA-150/38, MW 150 µm
Silikonschlauch	Lindemann ($\phi_{\text{außen}} = 4 \text{ mm}$), Med. Grade
Spatel	Carl Roth GmbH
Standard NMR-Röhrchen	Duran, WG-5 mm
Natriumtrimethylsilylpropionat (TSP)	Sigma Aldrich, Eurisotop
Vortexer	Genie K-550-GE, Bender und Hobein AG
Waagen	Sartorius Typ M2P, CP64 und analytic
Zentrifuge 1	Eppendorf centrifuge 5418, 5702, 5702
Betain	Sigma Aldrich
Cholinchlorid	VWR
Adenosin	VWR
Myo-Inositol	Carl Roth GmbH
Fumarsäure	Sigma Aldrich
Äpfelsäure	Sigma Aldrich
Prolin	Sigma Aldrich
Linolensäure	Sigma Aldrich

Trehalose	Sigma Aldrich
Eisen(III)citrat	Sigma Aldrich
Ammoniumsulfat	Carl Roth GmbH
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH
Kaliumnitrat	Sigma Aldrich
Kaliumsulfat	Carl Roth GmbH
Calciumnitrat	Carl Roth GmbH
Magnesiumsulfat	Carl Roth GmbH
70%/80%/96% Ethanol	Carl Roth GmbH
Flüssigstickstoff	Air Liquide
12% Natriumhypochlorid	Carl Roth GmbH
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH
Methanol-D ₄	Eurisotop
Phytoagar	Duchefa
Tissue Lyser	Quiagen, Retsch
PEG 6000	Carl Roth GmbH
Magenta Box (Reisanzuchtgefäß)	Carl Roth GmbH
Reissamen	<i>Oryza sativa L ssp. Japonica cv.</i> <i>Nihonmasari</i> , Wildtyp (WT), <i>hebiba</i> , <i>cpm2</i>
Sterilbank	Hera guard, PTS KG
Wachstumschamber	CLF, Plant Climatics, E-30 B, Percival
15 mL, 50 mL Falcon	Carl Roth GmbH
2 mL (Safe-Seal-)Tube	Sarstedt
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D)	Fluka
1-Naphthyllessigsäure (NAA)	Sigma Aldrich

Tabelle 3.2: Zusammensetzung des Kimura B-Mediums.

Substanz*	Menge (mg)
Ammoniumsulfat	289.2
Kaliumdihydrogenphosphat	148.8
Kaliumnitrat	111
Kaliumsulfat	95.4
Calciumnitrat	3594
Magnesiumsulfat	395.4
Eisen(III)citrat	45.6

*Angaben sind bezogen auf einen 6 L-Ansatz.

Tabelle 3.3: Zusammensetzung des Heller-Mediums mit 2,4-D (4.5 μM) und NAA (5.4 μM) für 1 L Heller Medium.⁸¹

Substanz	Menge (mg)
$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.05
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.03
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1
H_3BO_3	6.2
KI	0.02
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.08
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.03
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1
CaCl_2	56.62
KCl	750
MgSO_4	121.56
NaNO_3	600
NaH_2PO_4	108.7

3.2 Tabakflüssigzellkulturen

3.2.1 Probenanzucht von VBI-0 und VBI-3

- In 100 mL Erlenmeyerkolben, welche 30 mL frisches Heller-Medium enthielten, wurden nach einer Woche Anzucht 15 mL Zellkultur steril unter einer Reinraumbank überführt. Das Medium enthielt 2,4 D (4.5 μM) und NAA (5.4 μM)
- Dies wurde mit jeweils VBI-0 und VBI-3 Kulturen durchgeführt, wobei jeweils zwei unter Weißlichtbedingungen und zwei in Dunkelheit bei 25 °C unter konstantem Schütteln bei 120 rpm inkubiert wurden
- Nach einer Woche wurde jeweils eine Probe geerntet und zur weiteren Anzucht verwendet
- Der Anzucht- und Erntezyklus erfolgte innerhalb von neun Monaten

3.2.2 Probenernte von VBI-0 und VBI-3

- Die Zellkulturen wurden mithilfe einer Nutsche, einem Filterpapier und einer Vakuumpumpe abgenutscht
- Anschließend wurde die Zellmasse mithilfe eines Spatels in ein 50 mL Falcon überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren
- Die Lagerung fand in einem -80 °C Gefrierschrank bis zur anschließenden Gefrierdrying statt
- Die gefrorene Probe wurde am Lyophilisator gefriergetrocknet und bis zur Abwaage bei -80 °C gelagert

3.2.3 Probenextraktion von VBI-0 und VBI-3

- Die gefriergetrockneten Proben wurden 30 min bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend wurden 15 mg in einem 1.5 mL Eppendorftube eingewogen. Die Einwaage betrug $15\text{ mg} \pm 0.03\text{ mg}$
- Der Einwaage wurde 1.5 mL Extraktionsmedium zugegeben und das Eppendorftube 1 min lang mithilfe des Vortexers gemischt (Stufe 7 von 10)
- Die Proben wurden auf 50 °C für 10 min erwärmt, für 5 min bei 14195 rpm zentrifugiert, um danach 600 μL des Überstands in ein 5 mm NMR Röhrchen zu überführen
- Die Proben wurden innerhalb der nächsten 12 h mittels NMR Spektroskopie untersucht⁸²

3.2.4 NMR-Messungen der Metabolite von VBI-0 und VBI-3

Auf 100 mL deuteriertes Methanol wurden 1 mg TSP abgewogen. Methanol und TSP wurden von Hand geschwenkt und vor Verwendung eine Woche im Dunkeln bei RT stehen gelassen.

- Für die Messungen der Metabonomics Daten wurden 1D ^1H NOESY und 2D ^1H J -aufgelöste Spektren verwendet
- Die Proben wurden automatisch durch den Macrobefehl “atma“ auf die gewünschte Sender- und Empfängerfrequenz eingestellt, bzw. die Einstellung des Schwingkreises auf die Proben vorgenommen. Der 90° Puls wurde ebenfalls automatisch mit dem Macrobefehl “pulsecal“ bestimmt
- Das NOESY Spektrum wurde mit 32 Scans, 4 Dummy Scans, 65536 Datenpunkten und einer Empfangsstärke (receiver gain = RG) von 90.5 aufgezeichnet. Die Mischzeit wurde auf 10 ms und die Erholzeit zwischen zwei Scans auf 4 s eingestellt, wobei für die Vorsättigung eine RF-Amplitude von 50 Hz (entsprechend einem 90° Puls von 10 ms Dauer) eingestellt wurde. Die Stärken der beiden SMSQ10.100 Gradienten wurden auf $G_1 = 50\%$ und $G_2 = -10\%$ justiert. Für die Prozessierung wurden 131072 Datenpunkte ohne Apodisierung verwendet
- Das 2D ^1H J -aufgelöste Spektrum wurde mit einem Scans, 16 Dummy Scans, 8192 Datenpunkten und einer RG von 90.5 detektiert. Die Mischzeit wurde auf 10 ms und die Erholzeit zwischen zwei Scans auf 4 s eingestellt, wobei wiederum für die Vorsättigung eine RF-Amplitude von 50 Hz (entsprechend einem 90° Puls von 10 ms Dauer) verwendet wurde. Die Stärken der beiden SMSQ10.100 Gradienten betragen jeweils 10%

Der Cryoprobenkopf reduziert gegenüber einem konventionellen RT-Probenkopf signifikant die NMR Messzeit, weil dieser eine höhere Empfindlichkeit aufweist und so mit vergleichbar wenigen Scans gering konzentrierte Metabolite erfassen kann. Dieser Ansatz stützt sich auf die Kühlung des Radiofrequenzdetektors und des Vorverstärkers auf ca. 20 K. Das thermische Rauschen wird näherungsweise um den Faktor 4 reduziert, welches wiederum eine 16-fache Reduzierung der Messzeit für dasselbe Signal-zu-Rausch-Verhältnis ermöglicht. Der Gewinn an Messzeit ist dabei erheblich, da eine Metabonomics Studie i. d. R. die Messung von hunderten von Proben abverlangt.^{1, 14, 15, 83, 84}

3.2.5 NMR-Datenanalyse von VBI-0 und VBI-3

Mithilfe des Programms AMIX wurde die Hauptkomponentenanalyse für die jeweiligen Fragestellungen und Vergleiche von Datensätzen angewendet. Neben dem prozentualen Anteil der kumulativen Varianzen bzgl. der Gesamtvarianz wurden auch der Influence- und der T^2 -Hotelling Plot zur Analyse der Daten hinzugezogen. Je nach PCA wurde das Konfidenzlevel (Vertrauensintervall) zwischen 80 und 95% eingestellt. Die Bereiche des Wasser-, PEG- und Methonalsignals wurden in der Statistik nicht berücksichtigt, da diese keinerlei Informationen bzgl. der untersuchten Systeme aufzeigen. Hierfür wurden die Bereiche um 3.3, 3.6 und 4.8 ppm ausgelassen. Für die PCA wurde der Bereich von 0 bis 10 ppm verwendet. Falls ein gleichmäßiges Bucketing angewendet wurde, ist die Größe den Ergebnissen zu entnehmen. Häufiger wurde die Auswertung jedoch anhand von Mustern durchgeführt. Die Muster zu den jeweiligen PCA Plots sowie spezifische Angaben zur Auswertung sind in den Kapiteln 4 und 10 zu finden.

Die Auswertung der Daten erfordert eine zusätzliche Prozessierung, da die Spektren sowohl hoch wie auch niedrig konzentrierte Metabolite enthalten. So würde bei einer Auswertung bzgl. der Varianzen vor allem die Unterschiede hoch konzentrierter Metabolite vorherrschen. Um niedrig konzentrierte Metabolite stärker zu gewichten, existieren unterschiedliche Möglichkeiten. Es kann z. B. jede einzelne Integralregion durch die Varianz der Integralregion dividiert und damit die Varianz standardisiert werden (univariante Skalierung). Ebenso kann eine logarhythmische Transformation durchgeführt werden, um die Daten weiter abzufragen. Am Beispiel des Pareto Scaling wird die Varianz durch die Quadratwurzel der Varianz dividiert. Hier können sowohl hoch wie auch niedrig konzentrierte Metabolite durch nachfolgende Mustererkennung identifiziert werden. Des Weiteren können auch Muster für gering konzentrierte Metabolite angelegt und für die Auswertung verwendet werden.

Der Scores-Plot ist die Auftragung der PC_i gegen PC_j und zeigt wie die Spektren im korrespondierenden Subraum beschrieben werden können. Im Scores-Plot wird in dieser Arbeit häufig die Sicherheitswahrscheinlichkeit durch den T^2 -Hotelling Plots mit einem Zufallsfehlerbereich in % angegeben, wobei die Distanz jedes Spektrums zum Zentrum des Modellraums entlang der vertikalen Achse angezeigt wird. Diese Achse entspricht der horizontalen Achse im Influence-Plot, wobei hier gegen die Reihenfolge der Spektren aufgetragen wird. Proben außerhalb der Sicherheitswahrscheinlichkeit werden als Ausreißer betrachtet.¹³ Der Loadings-Plot gibt den Zusammenhang zwischen der Mustertabelle und der Varianz der entsprechenden Hauptkomponente an. Dadurch kann der Loadings-Plots für die Identifikation von potentiellen Biomarkern verwendet werden.^{13, 16}

3.2.6 Spiken der Metabolite von VBI-0 und VBI-3

Bestimmte Resonanzen wurden durch sukzessive Zugabe der jeweiligen Substanz eindeutig identifiziert. Zusätzlich wurden in dieser Arbeit einzelne Signale ausgewählt und mit den Methylgruppen des TSPs als Referenzsignal integriert, um anschließend die Konzentration zu berechnen.

3.3 Salz- und Trockenstress von Reis

3.3.1 Probenanzucht von Reis

Es folgt die Probenanzucht des Experimentators 1:

- sterilisieren der Anzuchtgefäße durch Autoklavieren
- befüllen der Anzuchtgefäße mit 150 mL 0.4%igem Phytoagar
- Reissamen entspelzen
- Samen in einem 50 mL Falcon in 30 – 40 mL 70%igem EtOH 1 min lang schwenken
- zwei Mal in 30 – 40 mL bidestilliertem Wasser waschen
- 35 mL 5%ige Natriumhypochloridlösung dazugeben und 20 min bei 20 rpm schütteln
- fünfmaliges Waschen durch Zugabe von 40 mL autoklaviertem, bidestilliertem Wasser und nachfolgendem Schwenken unter der Reinraumbank
- die Aussaat erfolgte unter der Sterilbank
- in jedes Aussaatgefäß wurden 20 Samen mit dem Embryo nach oben gesetzt
- die Keimlinge wurden im Anzuchtraum unter Weißlicht bei 24 °C gezogen
- nach 12 Wachstumstagen folgte die Überführung in neue Anzuchtgefäße, indem die Pflanzen aus dem Agar entfernt wurden. Beschädigte oder im Wachstum gehemmte Pflanzen wurden verworfen
- Kontrollpflanzen wurden für 48 h in Kimura B-Nährlösung, Salzstresspflanzen für 48 h in 150 mM NaCl-Kimura B-Nährlösung gesetzt und bei konstanten 25 °C in der Wachstumskammer bei konstantem Weißlicht gezogen

Anmerkungen: Die Wachstumszeit richtet sich nach der Keimlingsentwicklung und wurde für jede Experimentreihe eingehalten. Jedoch unterschieden sich die Zeiten im Vergleich von Experimentator 1 und Experimentator 2.

Es folgt die Probenanzucht des Experimentators 2:

- sterilisieren der Anzuchtgefäße durch Autoklavieren
- befüllen der Anzuchtgefäße mit 150 mL 0.3%igem Phytoagar
- Reissamen entspelzen
- Samen in einem 50 mL Falcon in 35 mL 70%igem EtOH 1min lang schwenken
- zwei Mal in 40 mL autoklaviertem Bideest waschen
- 35 mL 5%ige Natriumhypochloridlösung dazugeben und 20 min bei 20 rpm schütteln
- fünfmaliges Waschen durch Zugabe von 40 mL und nachfolgendem Schwenken
- die Aussaat erfolgte unter der Sterilbank 1. Die Pinzette wurde vor Gebrauch abgeflammt und anschließend mit 80%igem EtOH besprüht
- in jedes Aussaatgefäß wurden 25 Samen mit dem Embryo nach oben gesetzt
- die Keimlinge wurden im Anzuchtraum unter Weißlicht bei 24 °C gezogen
- nach 14 Wachstumstagen folgte die Überführung in neue Anzuchtgefäße, indem die Pflanzen aus dem Agar entfernt wurden. Beschädigte oder im Wachstum gehemmte Pflanzen wurden verworfen
- Kontrollpflanzen wurden für 24 h bzw. 48 h in Kimura B-Nährlösung, Salzstresspflanzen für 24 h bzw. 48 h in 150 mM NaCl-Kimura B-Nährlösung gesetzt und bei konstanten 25 °C in der Wachstumskammer bei konstantem Weißlicht gezogen
- bei Trockenstressproben wurden die Pflanzen nach 14 Wachstumstagen 24 h in einer 10%igen PEG-Kimura B-Lösung angesetzt

Anmerkungen: Die Mutante *cpm2* wurde ausschließlich für das Experiment von 48 h Salzstress und den jeweiligen Kontrollproben verwendet, da es hier zu Lieferschwierigkeiten des Saatguts kam. Die Trockenstressansätze wurden 24 h behandelt, da die Pflanzen nach einer 48 h Trockenstressbehandlung starke Schäden zeigten.

3.3.2 Probenernte von Reis

Die Probenernte wurde von beiden Experimentatoren wie folgt durchgeführt:

- die Pflanzenernte wurde möglichst zügig durchgeführt, um eventuelle Stressantworten zu vermeiden
- die Wurzeln wurden von den Sprossen getrennt und beides anschließend in 15 mL Falcons, welche mit flüssigem Stickstoff gefüllt waren, überführt

- die gefrorenen Proben wurden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und anschließend fünf Tage lang lyophilisiert
- die Zerkleinerung wurde zunächst mit einer Schere durchgeführt
- die Teilstücke wurden in ein 2 mL Safe-Lock Tube mit zwei Metallkugeln überführt
- die gefrorenen Proben der ersten Anzucht wurden bei Experimentator 1 1–2 min, bei 20 Hz im Tissue Lyser zerschlagen
- die Proben der Anzucht 2 und 3 von Experimentator 1 wurden 5 min bei 20 Hz im Tissue Lyser zerschlagen
- die gefrorenen Proben des Experimentators 2 wurden 5 min bei 20 Hz im Tissue Lyser zerschlagen
- die Wurzelproben wurden 5 min bei 20 Hz im Tissue-Lyser zerschlagen
- das zerkleinerte Material wurde in flüssigen Stickstoff gegeben und 45 min vor der Abwaage aufgetaut

3.3.3 Probenextraktion von Reis

Die Probenernte wurde von beiden Experimentatoren wie folgt durchgeführt.

- die Einwaage von $15\text{ mg} \pm 0.03\text{ mg}$ wurde in 2 mL Eppendorfgefäße abgewogen
- zu diesen Proben wurde 1 mL Extraktionsmedium gegeben
- die Eppendorfgefäße wurden 1 min lang auf dem Vortexer gemischt und anschließend bei $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 min erwärmt
- die Probe wurde für 15 min bei 12.500 rpm und $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert
- Experimentator 1 zentrifugierte den Überstand nochmals für 15 min bei 12.500 rpm und $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, um alle Schwebteile zu entfernen
- 600 μL des Überstands wurden vorsichtig mit einer Pipette in ein 5 mm NMR Röhrchen überführt und mithilfe der hochauflösenden NMR Spektroskopie untersucht

3.3.4 NMR-Messungen von Reis

Die verwendeten NMR-Experimente und die Spektrometereinstellungen sind dem Abschnitt 3.2.4 zu entnehmen. Es erfolgte die gleiche Durchführung wie bei der Tabakzellkulturstudie.

3.3.5 NMR-Datenanalyse von Reis

Die verwendete Datenanalyse ist dem Abschnitt 3.2.5 zu entnehmen. Diese wurde unter den dort angegebenen Schritten und Gesichtspunkten durchgeführt.

3.3.6 Spiken der Metabolite von Reis

Der Vorgang des Spikens und die Konzentrationsbestimmung bestimmter Metabolite ist dem Abschnitt 3.2.6 zu entnehmen.

4. Ergebnisse Metabonomics

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Metabonomics-Studien an den Modellorganismen Reis (*Oryza sativa* L.) und Tabakzellkulturen (*Nicotiana tabacum* cv 'Virginia Bright Italia', VBI) aufgeführt. Die Studien beinhalten die Einführung der Methode mit den jeweiligen SOPs (s. Kapitel 3), die Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Daten, die Klassifizierung der Proben nach Genotyp und Behandlung über den erhaltenen metabolischen Fingerabdruck, sowie die Identifizierung und Quantifizierung einzelner Metabolite im jeweiligen System. Für die Analyse der Zusammensetzung von Extrakten müssen weder Absolutkonzentrationen, noch die Identität jedes einzelnen Metabolites bestimmt werden.¹¹ Die erhaltenen Daten und Informationen werden im Kontext der jeweiligen Experimente und Fragestellungen dargestellt, beschrieben und im Anschluss diskutiert.

4.1 Tabakflüssigzellkulturen

In der vorliegenden Arbeit wurden Tabakzellkulturen für die gezielte Biosynthese durch Lichtinduktion verwendet. Tabak stellt eine reiche Quelle an Sekundärmetaboliten, wie Isoprenoide, Alkaloide, Flavonoide und Anthocyane dar. Viele dieser Substanzen besitzen eine therapeutische Wirkung auf den Menschen und werden als Pharmazeutika für schwerwiegende Erkrankungen wie Krebs eingesetzt. Die lichtreaktive Tabakzelllinie VBI-3 und die nicht lichtreaktive Stammlinie VBI-0 wurden für die folgenden Experimente kultiviert. Dabei wurde das Augenmerk auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und die Stabilität der Zelllinie gelegt. Im Weiteren wurden beide Zellkulturen jeweils in Dunkelheit und unter Bestrahlung von weißem Licht angesetzt, sodass ein direkter Vergleich der metabolischen Fingerabdrücke unter den jeweiligen Bedingungen gewährleistet wurde.^{44, 45, 47, 62, 64, 65}

4.1.1 VBI-0 belichtet/unbelichtet und VBI-3 belichtet/unbelichtet

Die Anzucht der Tabakflüssigzellkulturen wurde von drei Personen bzw. die Probenpräparation von zwei Personen durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit der Daten beim Modellsystem einer Pflanzenflüssigzellkultur zu überprüfen (s. Kapitel 3). Gleichzeitig wurde getestet, ob die SOPs leicht verständlich und von mehreren Personen akkurat durchgeführt werden können. Der Bereich zwischen 0 bis 10 ppm der 101 Spektren ist als Übersicht in Abbildung 4.1 dargestellt. Die jeweiligen belichteten und unbelichteten Kulturen von VBI-0 und VBI-3 wurden farblich unterschieden. Die Proben wurden im Wochenrhythmus subkultiviert und geerntet. Insgesamt wurden von 101 Proben NMR-Spektren aufgenommen, wobei die jeweiligen Ansätze in Tabelle 4.1 festgehalten wurden.

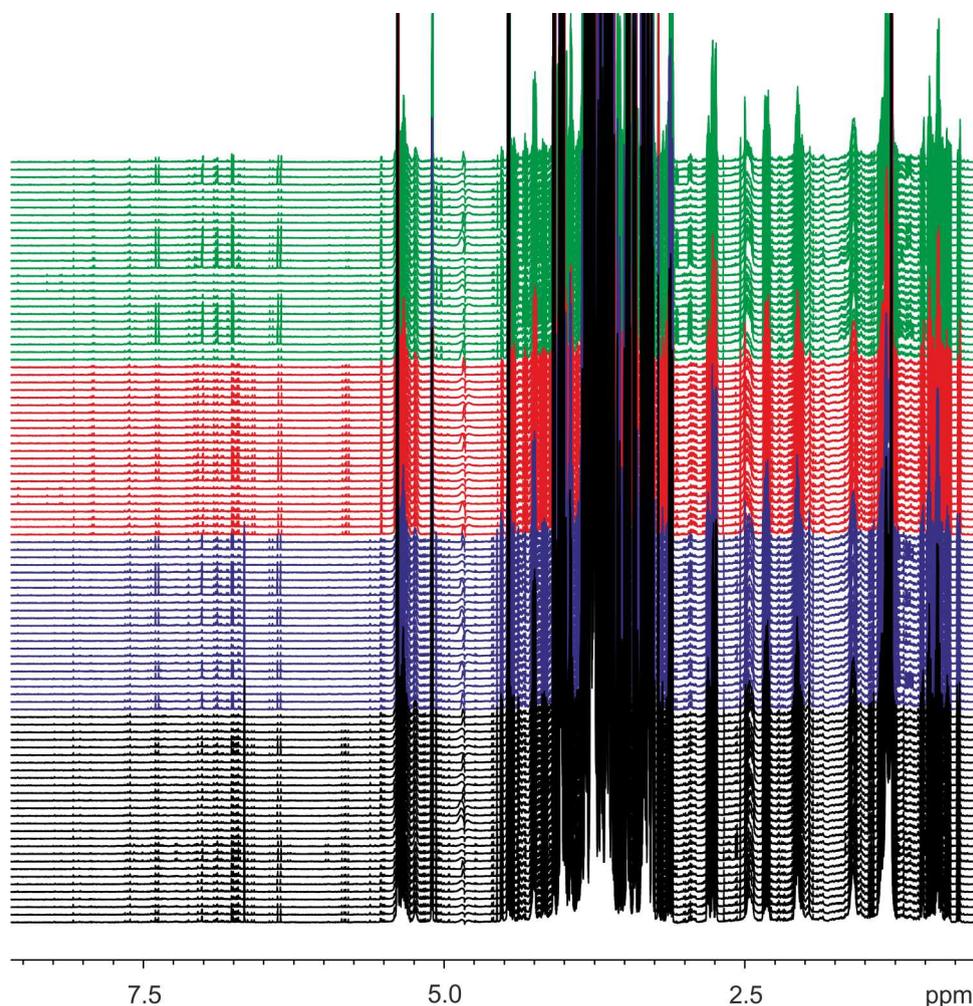


Abbildung 4.1: In diesem Überblick sind die 1D ^1H NOESY Spektren der jeweiligen Versuchsreihen dargestellt. Die Spektren der unterschiedlichen Probenansätze VBI-3 belichtet (schwarz), VBI-3 unbelichtet (blau), VBI-0 belichtet (rot) und VBI-0 unbelichtet (grün) konnten durch die Extraktion von spezifischen Signalmustern und einer anschließenden PCA differenziert werden.

In Abbildung 4.2 wurde die Hauptkomponentenanalyse auf der Basis des angelegten Musters erstellt (s. Abbildung 10.2). Einige Moleküle, welche den Signalmustern zugrunde liegen, werden im Kapitel 4.1.6 identifiziert bzw. quantifiziert. Im Influence-Plot sind die möglichen Ausreißer mit Angabe des Probenansatzes und der Probennummer gekennzeichnet. Die Darstellung der Gesamtvarianz verdeutlicht, dass mit den ersten drei PCs die Varianz zu 96.61% angegeben werden kann. Zuletzt wird im Loadings-Plot der Zusammenhang zwischen der Mustertabelle und der größten Varianz angezeigt. Es ist zu erkennen, dass die Bereiche um 1.31, 1.43, 4.33, 6.66 und 7.01 ppm für die Trennung der Gruppen ausschlaggebend sind. Des Weiteren konnte das Signal bei 6.7 ppm als Biomarker für die VBI-3 Zellkultur in diesem Versuchsaufbau identifiziert werden.

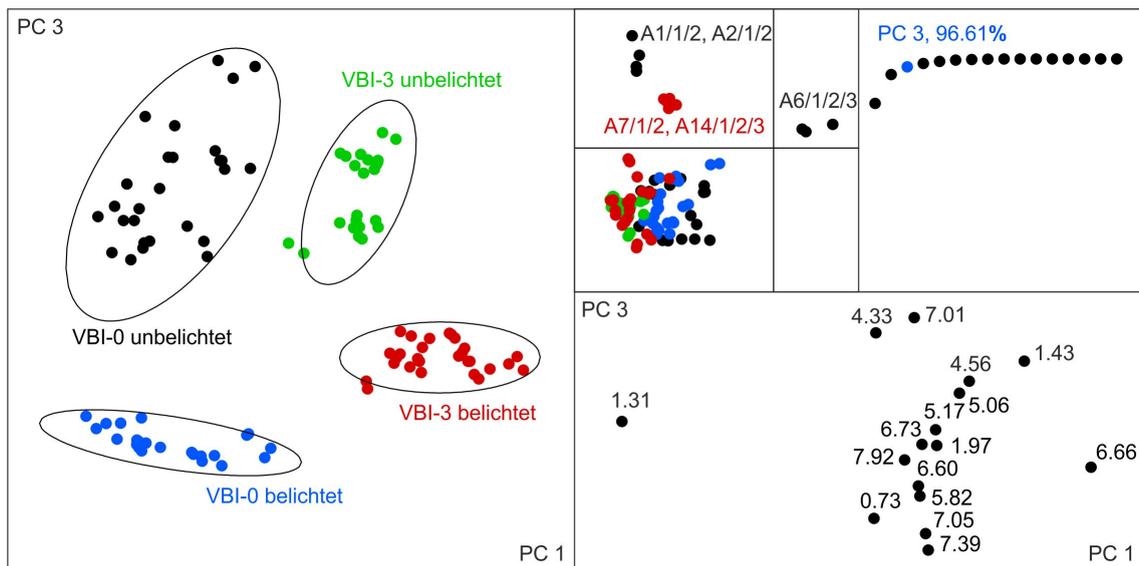


Abbildung 4.2: Auftragung von PC 1 gegen PC 3 der beiden Genotypen VBI-0 und VBI-3, der in Abbildung 4.1 gezeigten Spektren. VBI-3 unbelichtet (grün), VBI-3 belichtet (rot), VBI-0 unbelichtet (schwarz) und VBI-0 belichtet (blau) wurden auf die Gesamtintensität skaliert und die Arealgröße durch die Musterbreite dividiert. Das Vertrauensintervall des T^2 Group Hotellings betrug 0.9. Es folgt der Influence-Plot, die Übersicht der Gesamtvarianz und der Loadings-Plot. Mögliche Ausreißer von Ansatz 1, 2, 6, 7 und 14 wurden mit der entsprechenden Probennummer gekennzeichnet. Die Darstellung der Gesamtvarianz verdeutlicht, dass mit den ersten drei PCs die größte Varianz zu 96.61% angegeben werden kann. Der Loadings-Plot zeigt, dass die Bereiche um 1.31, 1.43, 4.33, 6.66 und 7.01 für die Trennung der Gruppen ausschlaggebend waren.

Tabelle 4.1: Probenübersicht der geernteten Zellkulturansätze. Es wurden insgesamt 14 Ansätze durchgeführt. Einzelne Ansätze konnten nicht ausgewertet werden und wurden nicht in der Tabelle aufgeführt. Die Anzahl der gemessenen Proben sind chronologisch aufgelistet. Die Proben entstammen alle einer Ausgangskultur, welche zu Beginn von ausplattierten Zellen angesetzt wurde. Die Kultur war stabil von April bis Dezember 2012. Nach 14 Ansätzen wurde die Kultivierung abgebrochen. Die Proben wurden je Ansatz zweimal präpariert, um eventuelle Abweichungen in der Präparation ermitteln zu können.

Ansatz	VBI-0 _{unbel.}	VBI-0 _{bel.}	VBI-3 _{unbel.}	VBI-3 _{bel.}
1	2	2	2	2
2	2	2	2	2
3	2	2	2	2
4	–	2	2	2
5	3	2	3	3
6	3	–	–	2
7	2	2	2	2
8	–	2	2	2
9	2	2	2	2
10	2	1	2	2
11	2	1	2	2
12	2	2	2	2
13	2	–	–	–
14	3	3	–	3

4.1.2 VBI-0 unbelichtet und VBI-0 belichtet

In Abbildung 4.3 ist die PCA gezeigt, welche eine eindeutige Gruppierung der Zellkultur VBI-0 in die beiden Versuchsanordnungen mit und ohne Belichtung zeigt. Für diese PCA wurde ein entsprechendes Muster angelegt, welches dem Kapitel 10 entnommen werden kann (s. Abbildung 10.3). Eine weitere Unterscheidung gelingt innerhalb der unbelichteten VBI-0 Zellkulturen, wobei die Proben den zwei Jahreshälften zugeordnet werden können. In Abbildung 4.3 ist der Influence-Plot, der Hotelling's T²-Plot, die Darstellung der Gesamtvarianz und der Loadings-Plot zu sehen. Im Influence-Plot sind die als mögliche Ausreißer angegebenen Proben mit Ansatz- und Probennummer versehen. Die Darstellung der Gesamtvarianz verdeutlicht, dass mit den ersten beiden PCs die Gesamtvarianz zu 99.54% angegeben werden kann. Zuletzt wird im Loadings-Plot der Zusammenhang zwischen der Mustertabelle und der größten Varianz angezeigt. Dabei ist zu erkennen, dass die Signale

bei 1.33 und 7.50 ppm entscheidend für eine Trennung der Gruppen sind.

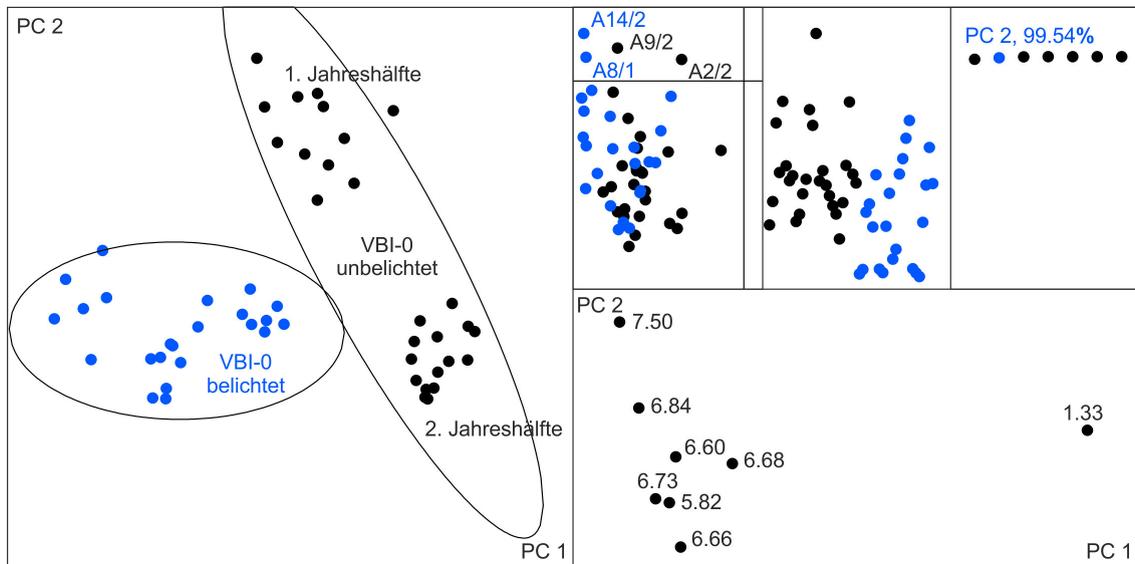


Abbildung 4.3: PCA der belichteten (blau) und unbelichteten (schwarz) VBI-0 Zellkulturen. Innerhalb der unbelichteten VBI-0 Proben konnte eine Differenzierung zwischen der ersten und zweiten Jahreshälfte festgestellt werden, wobei das Vertrauensintervall des T^2 Group Hotellings 0.9 betrug. Die Skalierung erfolgte auf die Gesamtintensität bzw. wurde die Arealgröße durch die Musterbreite dividiert. Weiterhin sind der Influence-Plot, die Darstellung der Gesamtvarianz und der Loadings-Plot der Zellkultur VBI-0 gezeigt. Im Influence-Plot sind die als mögliche Ausreißer angegebenen Proben gekennzeichnet. Die Darstellung der Gesamtvarianz verdeutlicht, dass mit den ersten beiden PCs die größte Varianz zu 99.54% angegeben werden kann. Die Bereiche um 1.33 und 7.50 ppm sind entscheidend für die Trennung der Gruppen.

4.1.3 VBI-3 unbelichtet und VBI-3 belichtet

Eine eindeutige Gruppierung der Zellkultur VBI-3 ist in der PCA in Abbildung 4.4 visualisiert. Für diese PCA wurde ein spezifisches Muster erstellt (s. Abbildung 10.4), welches dem Kapitel 10 entnommen werden kann. Der Influence-Plot, die Darstellung der Gesamtvarianz und der Loadings-Plot ist in Abbildung 4.4 gezeigt. Mögliche Ausreißer wurden entsprechend gekennzeichnet. Mit den ersten beiden PCs kann bereits eine Gesamtvarianz von 99.86% erreicht werden. Im Loadings-Plot ist zu erkennen, dass die Bereiche um 1.32, 7.05 und 7.39 ppm für die Abgrenzung der Gruppen verantwortlich sind.

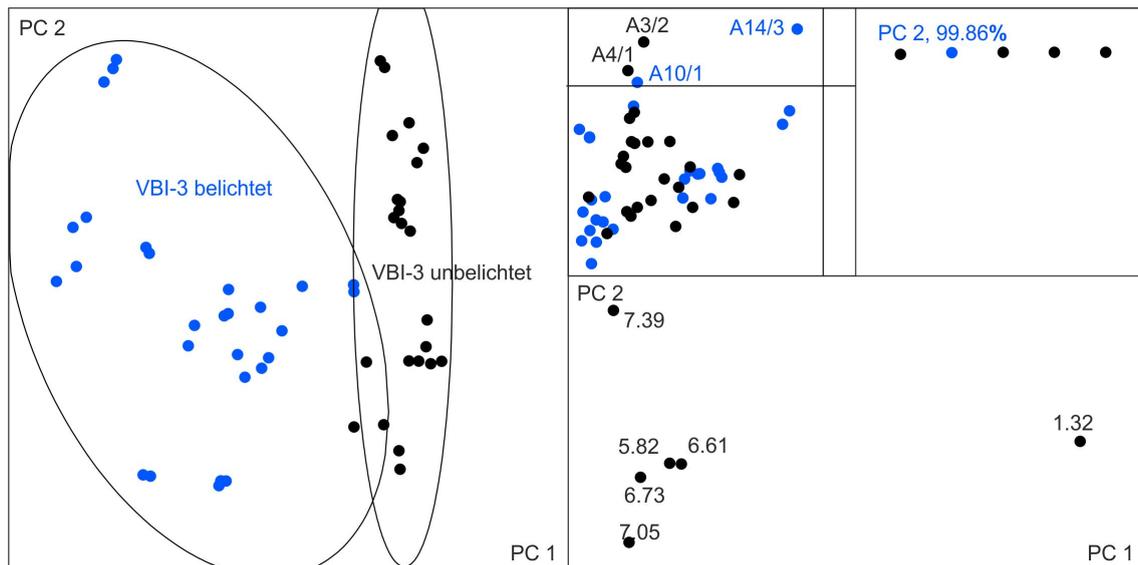


Abbildung 4.4: PC 1 gegen PC 2 der belichteten (blau) und unbelichteten (schwarz) VBI-3 Zellkulturen, wobei das T^2 Group Hotelling mit einem Vertrauensintervall von 0.9 angegeben wurde. Die Skalierung erfolgte zur Gesamtintensität bzw. wurde die Arealgröße durch die Musterbreite dividiert. Im Influence-Plot sind die als mögliche Ausreißer angegebenen Proben gekennzeichnet. Die Gesamtvarianz konnte mit den ersten beiden PCs zu 99.86% angegeben werden. Die Bereiche um 1.32 und 7.05 und 7.39 ppm sind entscheidend für die Trennung der Gruppen.

4.1.4 VBI-0 unbelichtet und VBI-3 unbelichtet

In Abbildung 4.5 ist die Auswertung der beiden, unbelichteten Zellkulturen VBI-3 und VBI-0 dargestellt, wobei hierfür ein entsprechendes Muster angelegt wurde (s. Abbildung 10.5), welches in Kapitel 10 dokumentiert wurde. Während im Influence-Plot die möglichen Ausreißer des Modells identifiziert wurden, wurde im Loadings-Plot der Zusammenhang zwischen der Mustertabelle und den größten Varianzen bei 1.33, 3.15 und 3.60 ppm angezeigt. Die Gesamtvarianz wird durch PC 1 und PC 2 zu 99.21% erfüllt.

4.1.5 VBI-0 belichtet und VBI-3 belichtet

Für die PCA in Abbildung 4.6 wurde ein spezifische Muster für die Differenzierung der Zellkulturen VBI-3 belichtet und VBI-0 belichtet angelegt (s. Abbildung 10.6). Im Influence-Plot sind die als mögliche Ausreißer angegebenen Proben mit der Beschriftung der Ansatz- und Probennummer gekennzeichnet. Die Darstellung der Gesamtvarianz verdeutlicht, dass mit den ersten beiden PCs die Gesamtvarianz zu 99.75% angegeben werden kann. Zuletzt wird im Loadings-Plot der Zusammenhang zwischen der Mustertabelle und den größten Varianzen in den Bereichen 3.78, 3.59, 4.05 und 5.39 ppm wiedergegeben.

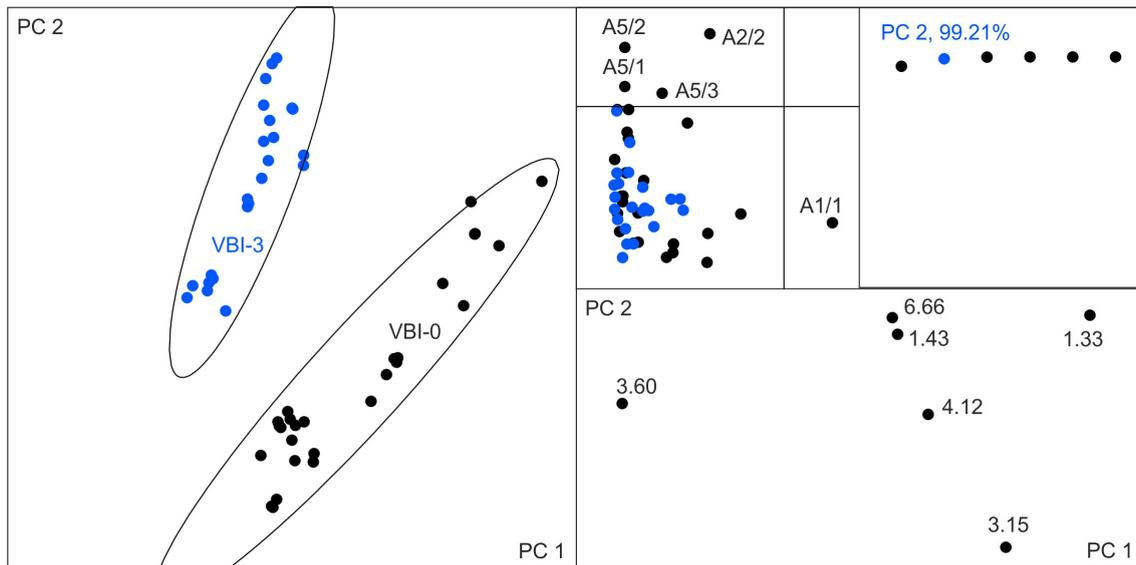


Abbildung 4.5: PCA der unbelichteten VBI-3 (blau) und VBI-0 (schwarz) Zellkulturen. Das Vertrauensintervall des T^2 Group Hotellings betrug hierbei 0.9 und die Skalierung bezog sich auf die Gesamtintensität. Die Arealgröße wurde durch die Musterbreite dividiert. Gezeigt sind der Influence-Plot, die Darstellung der Gesamtvarianz und der Loadings-Plot. Die Darstellung der Gesamtvarianz konnte mit den ersten beiden PCs zu 99.86% angegeben werden. Die ppm-Bereiche um 1.32, 7.05 und 7.39 sind entscheidend für die Trennung der Gruppen.

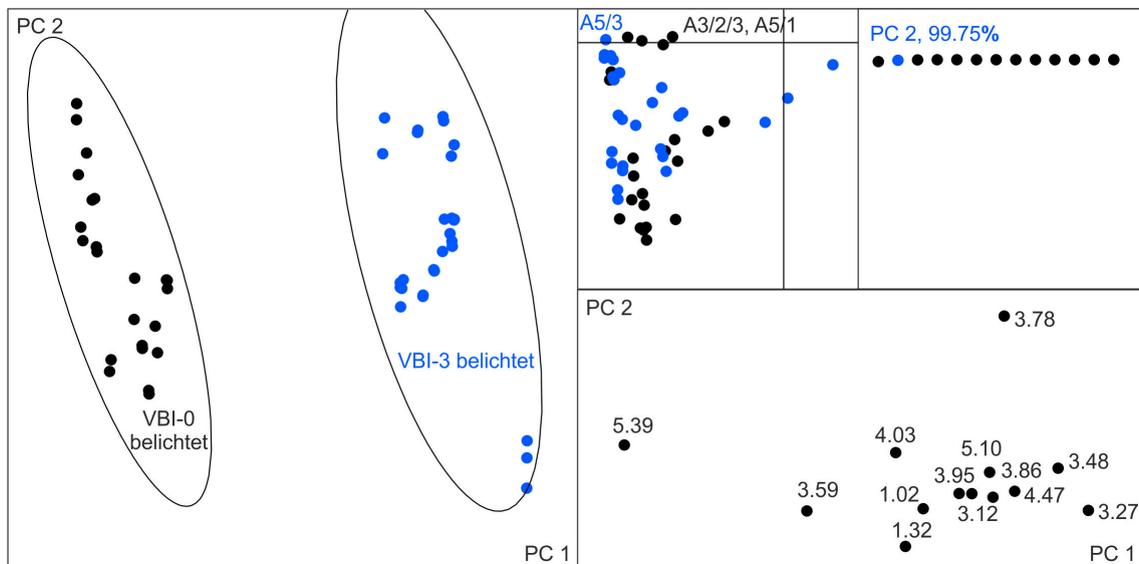


Abbildung 4.6: PC 1 gegen PC 2 der belichteten VBI-3 (blau) und VBI-0 (schwarz) Zellkulturen. Das Vertrauensintervall des T^2 Group Hotellings wurde auf 0.95 festgesetzt und die Skalierung erfolgte zur Gesamtintensität. Die Arealgröße wurde durch die Musterbreite dividiert. Die Gesamtvarianz der ersten beiden PCs betrug 99.75%. Im Loadings-Plot wird der Zusammenhang zwischen der Mustertabelle und der größten Varianz angezeigt, wobei die ppm-Bereiche um 1.32, 3.78 und 5.39 entscheidend für die Separierung der Gruppen sind.

4.1.6 Identifizierte Metabolite und Konzentrationen

Mithilfe einer Datenbank wurden die Spektren abgeglichen. Einige der vorgeschlagenen Substanzen wurden durch gezielte Zugabe in der Probe nachgewiesen. Nachfolgend sind die Bereiche der Spektren mit den identifizierten Substanzen dargestellt. Von den identifizierten Substanzen konnte α -Linolensäure, Fumarsäure und Malat (Äpfelsäure) quantifiziert werden. Weitere Substanzen konnten aufgrund von Überlagerungen mit anderen Signalen nicht genauer untersucht werden. Die Quantifizierung der Fumarsäure zeigte, dass der Fumarsäuregehalt in der Zellkultur VBI-0 um das 8-fache geringer als bei der Zellkultur VBI-3 war. Zudem wies die Zellkultur VBI-3 einen Anstieg der Fumarsäure nach Belichtung auf. Bei der Quantifizierung der Äpfelsäure konnte ein Trend aufgezeigt werden. Der Durchschnittsgehalt in der Zellkultur VBI-0 war geringer als in der VBI-3 Zellkultur. Zusätzlich sank die durchschnittliche Äpfelsäurekonzentration der VBI-0 Kultur bei der Anzucht unter Licht. Die VBI-3 Kultur hingegen wies keinen Anstieg der Äpfelsäurekonzentration bei belichteten Proben auf. Die Quantifizierung der α -Linolensäure zeigte sowohl zwischen den beiden Genotypen, als auch zwischen den Kontroll- und Behandlungsproben keinen Unterschied.

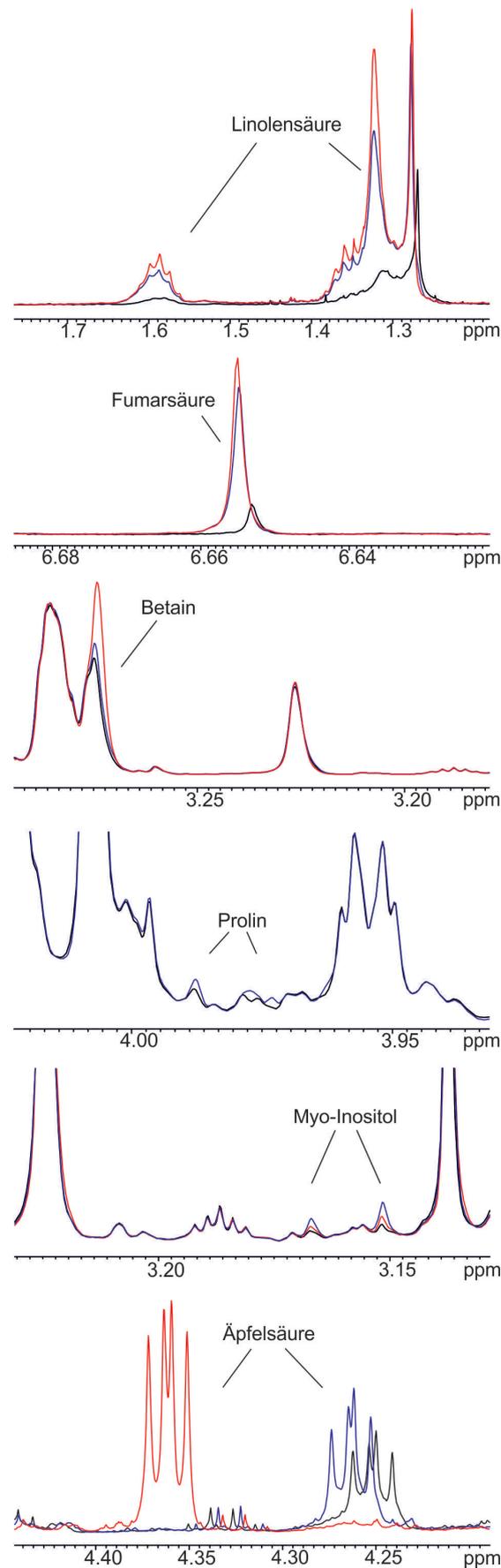


Abbildung 4.7: α -Linolensäure, Fumarsäure, Betain, Prolin, Myo-Inositol und Äpfelsäure konnten nach erfolgter Zugabe entsprechend in einem 1D ^1H NOESY Spektrum identifiziert werden. Die Änderung der chemischen Verschiebung ergab sich aufgrund der Änderung im pH-Wert durch Zugabe der Säure.

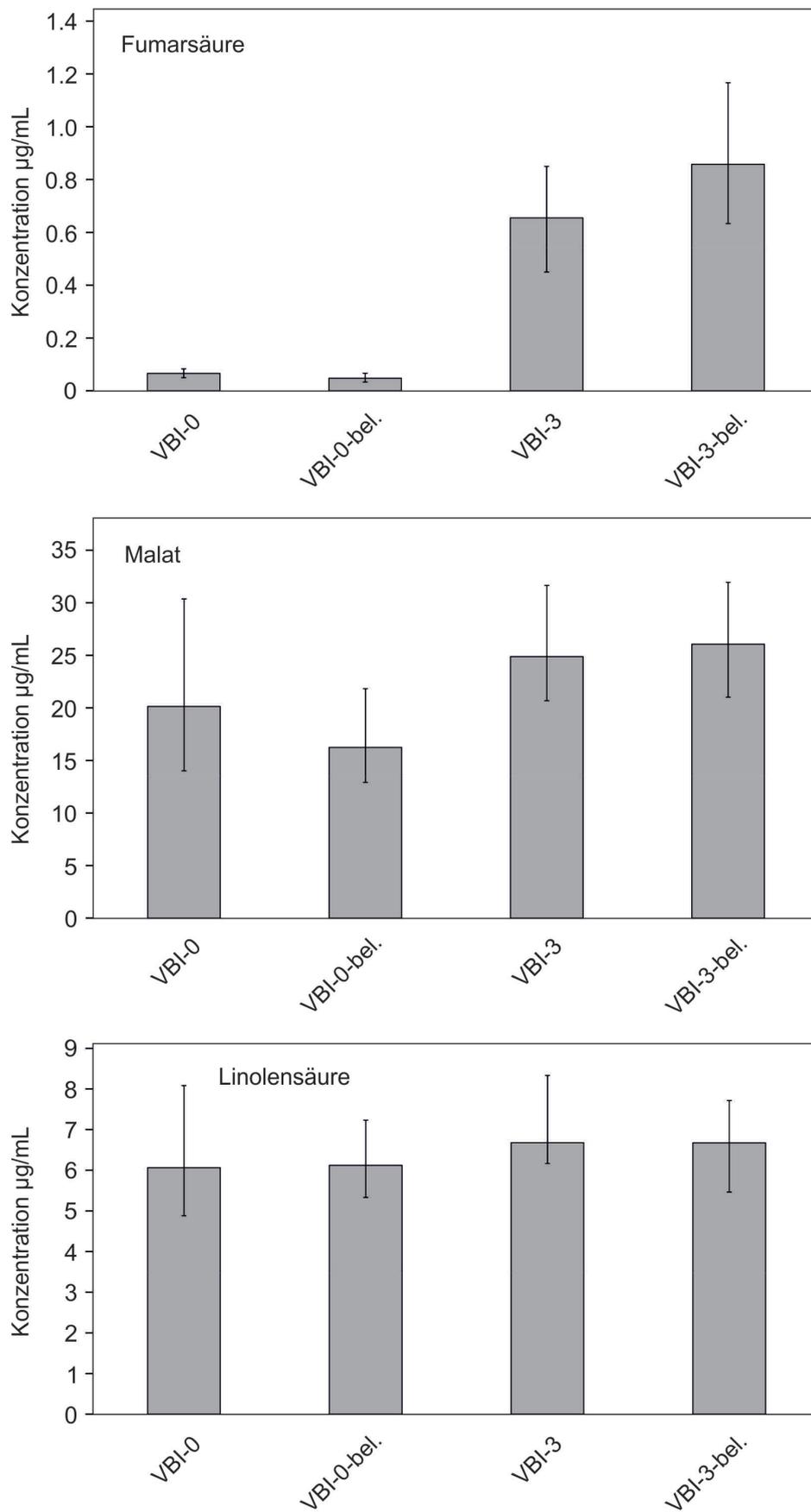


Abbildung 4.8: Diagramme mit den Ergebnissen zu den quantifizierten Substanzen Fumarsäure, Äpfelsäure und α -Linolensäure.

4.1.7 Diskussion

4.1.7.1 Ergebnisse der Datenanalyse von VBI

Physiologisch und biochemisch homogene Zellpopulationen sind ein unschätzbares Werkzeug für die Erprobung und Durchführung von Metabonomics-Studien mit hohem Probandendurchsatz. Flüssigkulturen von isolierten Zellen aus pflanzlichem Gewebe bieten einen einfachen experimentellen Zugang und geringen Kostenaufwand.^{85,86} Aus diesem Grund wurden für diese Arbeit Tabakzellkulturen verwendet, um die Durchführbarkeit der Metabonomics-Studie und die Stabilität der Zellkulturen in Bezug auf die Langlebigkeit der Zellen im Anzuchtrhythmus zu untersuchen. Die Erstellung von metabolischen Fingerabdrücken mithilfe der hochauflösenden NMR-Spektroskopie führte zu einer Charakterisierung der Proben. Über die Hauptkomponentenanalyse wurden zum einen Signalmuster von Biomarkern identifiziert und den jeweiligen Genotypen und Behandlungen zugeordnet. Zum anderen wurden einige Metabolite bestimmt, wobei auch Moleküle analysiert wurden, welche für den Kontext des verwendeten Modells interessant sein könnten.

Um eine vergleichsweise höhere Probenanzahl zu erhalten, wurde die Zykluslänge der Zellkulturen von ursprünglich drei Wochen auf eine Woche reduziert. Vorab wurden Testdurchläufe angesetzt, um die Kulturbedingungen und SOPs auf Durchführbarkeit zu überprüfen bzw. um entsprechende Änderungen vornehmen zu können. Hierbei zeigte sich, dass die Anzucht der VBI-Zellkulturen stabil in einem Wochenzyklus durchgeführt werden konnte. Aus den PCA-Plots ist zu entnehmen, dass die Kulturen bis Ende der Studie (insgesamt neun Monate) stabil waren, da keine signifikanten Veränderungen im Bezug auf die Dauer der Zellkulturanzucht beobachtet wurden. Lediglich die unbelichtete VBI-0 Zellkultur zeigte eine Gruppierung in die 1. und 2. Jahreshälfte, wobei die Varianzen im Vergleich zu denen der Gruppierung der Genotypen und Behandlungen gering waren. Die Ursache hierfür konnte nicht ermittelt werden.

Durch die PCAs konnten Varianzen im Metabolitenmuster der Spektren visualisiert werden, welche eine eindeutige Zuordnung der Gruppen sowohl in Genotyp, als auch in Behandlung gewährleisten. Über die Auswertung der aufgenommenen Spektren konnten Muster von Biomarkern und teilweise Metabolite wie Äpfelsäure identifiziert bzw. quantifiziert werden.

Obwohl die Anzucht, Ernte und Messung der biologischen Proben durch mehrere Experimentatoren durchgeführt wurde, wurden die SOPs strikt eingehalten, sodass Varianzen, welche die Zuordnung in Genotyp oder Behandlung überlagerten, nicht festgestellt werden konnten.

Die Zelllinie VBI-0 stammt aus dem Gewebe des Parenchyms der Tabaklinie (*Nicotiana tabacum* cv 'Virgina Bright Italia', VBI) und besitzt damit die Fähigkeit zur Bildung von Zellfäden. Dies setzt grundlegende Eigenschaften zur Differenzierung voraus und kann sowohl für die Anwendung im Bereich des Metabolic Engineering, als auch für zellbiologische Analysen herangezogen werden.^{65,87} Das Metabolic Engineering dient zur Gewinnung von biologisch aktiven Substanzen z. B. aus geeigneten Zellkulturen im größeren Maßstab.⁸⁷

4.1.7.2 Identifizierung einzelner Metabolite und Biomarker

Für die Trennung der vier Gruppen (VBI-0 (un)belichtet, VBI-3 (un)belichtet) sind u. a. die Bereiche um 1.31, 1.43, 4.3, 6.66, 7 sowie 7.5 ppm in den Loadings-Plot angegeben. Hierbei wurde um 6.66 ppm Fumarsäure als Metabolit identifiziert, wobei ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Gehalt an Fumarsäure, dem Genotyp und der Behandlung gefunden wurde. Während der Genotyp VBI-3 diese Substanz in einer Durchschnittskonzentration von 0.7–0.9 µg/mL enthielt, lag der durchschnittliche Wert des Genotyps VBI-0 unter 0.1 µg/mL. Durch die Belichtung der Zellkulturen von VBI-3 war die durchschnittliche Fumarsäurekonzentration höher (0.9 µg/mL) als bei der Kontrollgruppe (0.7 µg/mL). In diesem Zusammenhang stellt Fumarsäure einen Biomarker für die Zellkultur VBI-3, sowie einen Biomarker für die Belichtung unter den gegebenen experimentellen Bedingungen dar. Weiterhin konnte Äpfelsäure dem NMR-Signal bei 4.25 ppm zugeordnet werden, wobei VBI-0 durchschnittlich weniger Äpfelsäure (17–20 µg/mL) als VBI-3 (25–26 µg/mL) enthielt.

Um den Bereich bei 1.3 ppm konnte α -Linolensäure nach Zugabe einer definierten Referenzmenge identifiziert werden. Weder bei den Genotypen noch bei den Kontroll- und Behandlungsproben konnte eine eindeutige Veränderung des α -Linolensäuregehaltes festgestellt werden. Es kann daher festgehalten werden, dass α -Linolensäure nicht ausschlaggebend für die Unterscheidung der Genotypen ist.

Die zusätzlichen NMR-Signale bei 1.31, 1.43, 4.3, 7 und 7.5 ppm waren soweit von Fremdsignalen überlagert, dass es sich empfiehlt, vor einer analytischen Messung eine Aufreinigung der Extrakte durchzuführen. Zur anschließenden Strukturbestimmung ist neben 1D ¹H NOESY oder JRES Experimenten, auch der Einsatz von COSY, TOCSY oder HSQC Pulssequenzen denkbar.

Im Vergleich zwischen der Zelllinie VBI-0 und VBI-3 konnte festgehalten werden, dass bei beiden Behandlungsmethoden Fumarsäure eine wichtige Rolle im Metabolismus einwöchiger Zellkulturen einnimmt. Der Unterschied beider Zellkulturen ist, dass allein VBI-3 bei Belichtung die Fähigkeit zur Entwicklung chlorophyllhaltiger Plastide besitzt. Die höhere

Fumarsäurekonzentration in VBI-3 vor und nach einer Belichtung steht demnach im Zusammenhang mit der Fähigkeit, diese Plastide ausbilden zu können. Die einzelnen Aspekte der Fumarsäure auch in Bezug auf den genetischen Hintergrund müssen im Einzelnen noch geklärt werden.

Literaturbekannt ist jedoch, dass Fumarsäure eine entscheidende Rolle hinsichtlich der Energiegewinnung und des strukturellen Aufbaus in C₃-Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* einnimmt. Die Forschung zu Photoassimilaten in C₃-Pflanzen beschränkte sich jedoch häufig auf die mengenmäßig am meisten vorkommenden Moleküle wie Zucker oder Stärke. Neben diesen ist mittlerweile auch das Interesse an organischen Säuren bzw. deren Rolle im Zusammenhang mit der Photosynthese gestiegen.^{88–90} Organische Säuren wie Fumarsäure oder auch Äpfelsäure sind nicht mehr nur als Zwischenprodukte des Citratzyklus anzusehen, sondern werden auch als Schlüsselkomponenten zur Bewältigung von Nährstoffmangel, der pH-Wert-Regulation oder zur Interaktion mit Mikroben im Boden-Wurzelbereich gehandelt.⁹¹

Die Zusammensetzung von organischen Säuren in C₃-Pflanzen variiert abhängig von Art, Pflanzenalter und untersuchtem Gewebe. *Arabidopsis thaliana* enthält z. B. signifikante Mengen an Fumarsäure, wobei die Konzentration mit dem Pflanzenalter und der Lichtintensität steigt. Sie ist in allen photosynthetisch aktiven Organen und damit nicht in Wurzeln und Samen zu finden.^{88,92,93} Dies spricht dafür, dass in *Arabidopsis thaliana* das Vorkommen der Fumarsäure an die Photosynthese gekoppelt ist.⁸⁸

Verschiedene Untersuchungen zur Rolle von Fumarsäure und Äpfelsäure in *Arabidopsis thaliana* ergaben, dass die Konzentration im Tagesrhythmus der von Stärke und Sucrose ähnelt. Der Anstieg am Tag bzw. Abfall in der Nacht legt nahe, dass diese Substanzen als Kohlenstoffspeicher dienen.⁹⁴ Es konnte festgestellt werden, dass an kurzen Tagen die Bildung von Stärke stärker ausgeprägt ist als an langen Tagen und dass je länger die Nächte andauerten, desto größer der Anteil an gespeicherter Stärke, Fumarat und Malat war.^{88,91,95,96}

Fumarsäure ist jedoch im Vergleich zu Äpfelsäure nur in wenige, metabolische Prozesse involviert und besitzt einen niedrigeren pK_a-Wert, d. h., dass ihre Rolle als vorübergehender Kohlenstoffspeicher und pH-Wert-Regulator wahrscheinlich ausgeprägter als bei Äpfelsäure ist.^{90,96} In Bezug auf die Tabakzellkultur VBI-3 bedeutet dies, dass die hohen Konzentrationen an Fumarsäure und Äpfelsäure im Zusammenhang mit der Fähigkeit zur Photosynthese und dem Vorhandensein chlorophyllhaltiger Plastide steht. In einer weiteren Arbeit konnte bei *Arabidopsis thaliana* gezeigt werden, dass zwei Fumarasegene in dieser existieren. Eine Fumarase ist vermutlich in den Mitochondrien, die andere im Cytosol loka-

liert. Die mitochondriale Fumarase ist existentiell während Mutanten ohne cytosolische überlebensfähig sind. In Bezug auf VBI bedeutet dies, dass auch die chlorophyllhaltigen Plastide einen Einfluss auf die vermehrte Synthese von Fumarsäure und Äpfelsäure ausüben. Die Frage ist nun, ob es bei VBI-3 im Gegensatz zu VBI-0 eine weitere Fumarase existiert und, ob VBI-0 ähnlich zu den *Arabidopsis thaliana*-Mutanten eine Kohlenstoffhun- gerstoffwechsel aufweist. Dieser Kohlenstoffhungertyp entsteht bei Tageszyklen mit langen Nächten und kurzen Tagen, einhergehend mit geringen Konzentrationen an Fumar- und Äpfelsäure. Dies stützt die These, dass Äpfelsäure und Fumarsäure essentielle, vorüberge- hende Kohlenstoffspeichermoleküle in C₃-Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* bzw. in VBI-3 Zellkulturen sind.^{90,95}

Das Projekt wurde in Kooperation mit Prof. Dr. Peter Nick und Sabine Purper durchge- führt. Diese Arbeit wurde noch nicht veröffentlicht.

4.2 Reis

In den folgenden Experimenten wurden Reiskeimlinge (*Oryza sativa L. cv Nihonmasari*, WT, *hebiba* und *cpm2*) verschiedenen, zeitlichen Salz- und Trockenstressbedingungen ausgesetzt. Zu jeder Stressbehandlung wurde der jeweilige Kontrollansatz durchgeführt. Die erste Salzstressdauer betrug 48 h, die zweite 24 h. Das Trockenstressexperiment konnte lediglich 24 h durchgeführt werden, da die Pflanzen bei längerer Einwirkzeit starke Schäden zeigten. Die 48 h Proben wurden in vier Ansätzen durch Experimentator 1 und 2 durchgeführt. Die Ergebnisse zu den 24 h Salz- und Trockenstressproben werden im Abschnitt 4.2.2 behandelt. Im Abschnitt 4.2.3 werden die Ergebnisse beider Salzstressbehandlungslängen im Vergleich dargestellt. Für die 48 h Ansätze konnten sowohl WT-Keimlinge als auch die beiden Mutanten verwendet werden. Für die Versuche der 24 h Salz- und Trockenstressproben konnte lediglich die Anzucht der WT- und *hebiba* Keimlinge durchgeführt werden, da es bei den *cpm2* Samen zu Lieferengpässen kam. Die Proben wurden, je nach gewonnener Menge an Pflanzenmaterial ein- bis dreimal pro Ansatz präpariert, um eventuelle Abweichungen in der Probenpräparation ermitteln zu können.

4.2.1 48 h Salzbehandlung

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse beider Experimentatoren der 48 h Salzstressbehandlung mit den jeweiligen Kontrollansätzen dargestellt und besprochen. Experimentator 1 präparierte drei Ansätze, Experimentator 2 einen Ansatz. Mithilfe des Ansatzes von Experimentator 2 konnten die Ergebnisse des ersten Experimentators verifiziert werden. Ziel des 48 h Salzstressexperiments war zum einen die Überprüfung der Gruppierung durch die Hauptkomponentenanalyse in Behandlungs-, Kontrollproben und der Genotypen und damit einhergehend die Analyse der Signalmuster. Die Auswirkung der Salzstressbehandlung auf das Vorkommen bestimmter Metabolite sollte untersucht und im Hinblick auf die bessere Salztoleranz der Mutanten eingeordnet werden.⁹⁷ Es wurde zur getrennten Analyse die Sprossachse von der Wurzelmasse separiert und jeweils ausgewertet. Bei der Auswertung stand die Hauptkomponentenanalyse, das Identifizieren spezifischer Metabolite und eine Konzentrationsbestimmung im Mittelpunkt.

Zunächst werden zur Einführung alle Spektren der aus den Sprossachsen gewonnenen Extrakte im Überblick (s. Abbildung 4.9) dargestellt, bevor die einzelnen Ergebnisse der 48 h Salzbehandlung im Detail betrachtet werden.

Im Überblick ist der Bereich zwischen 0 und 10 ppm dargestellt, wobei die Kontroll- und Salzproben dreier verschiedener Genotypen (WT, *cpm2*, *hebiba*) miteinander gezeigt wer-

den.

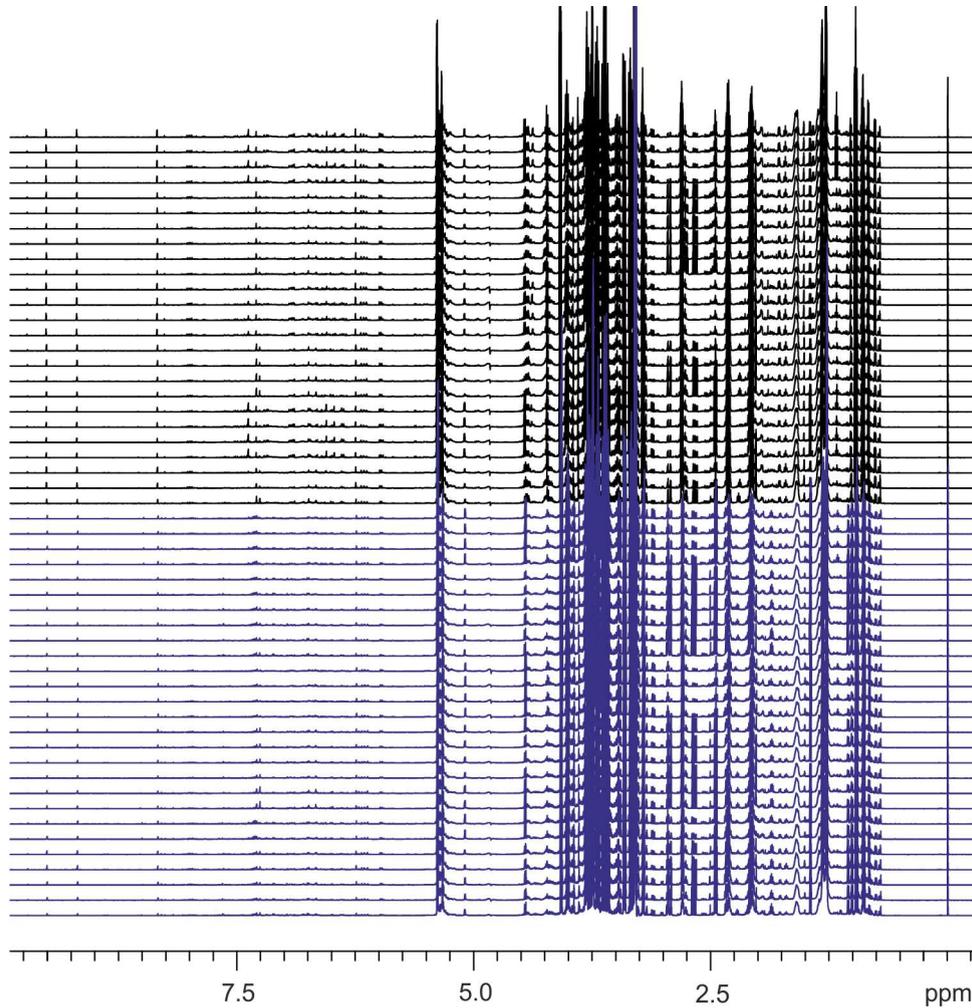


Abbildung 4.9: Darstellung der 53 Spektren von Kontroll- (schwarz) und Salzproben (blau) der Sprossachse, wobei vier Versuchsreihen, von denen drei von Experimentator 1 und eine von Experimentator 2 durchgeführt wurden.

Für die Auswertung der Spektren der Sprossachsen aus Abbildung 4.9 wurde eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) auf der Basis eines angelegten Musters erstellt. Im Folgenden sollen die Ergebnisse der Sprossachsenextraktion dargestellt werden. In den Abbildungen 4.10 und 4.11 ist das Muster zu sehen, welches der Erstellung der PCA zugrunde lag. Hierbei wurden zum besseren Verständnis in Abbildung 4.10 die Region von 6 bis 8.5 ppm, in Abbildung 4.11 hingegen die Region von 1.5 bis 4.0 ppm über rotunterlegte Bereiche hervorgehoben.

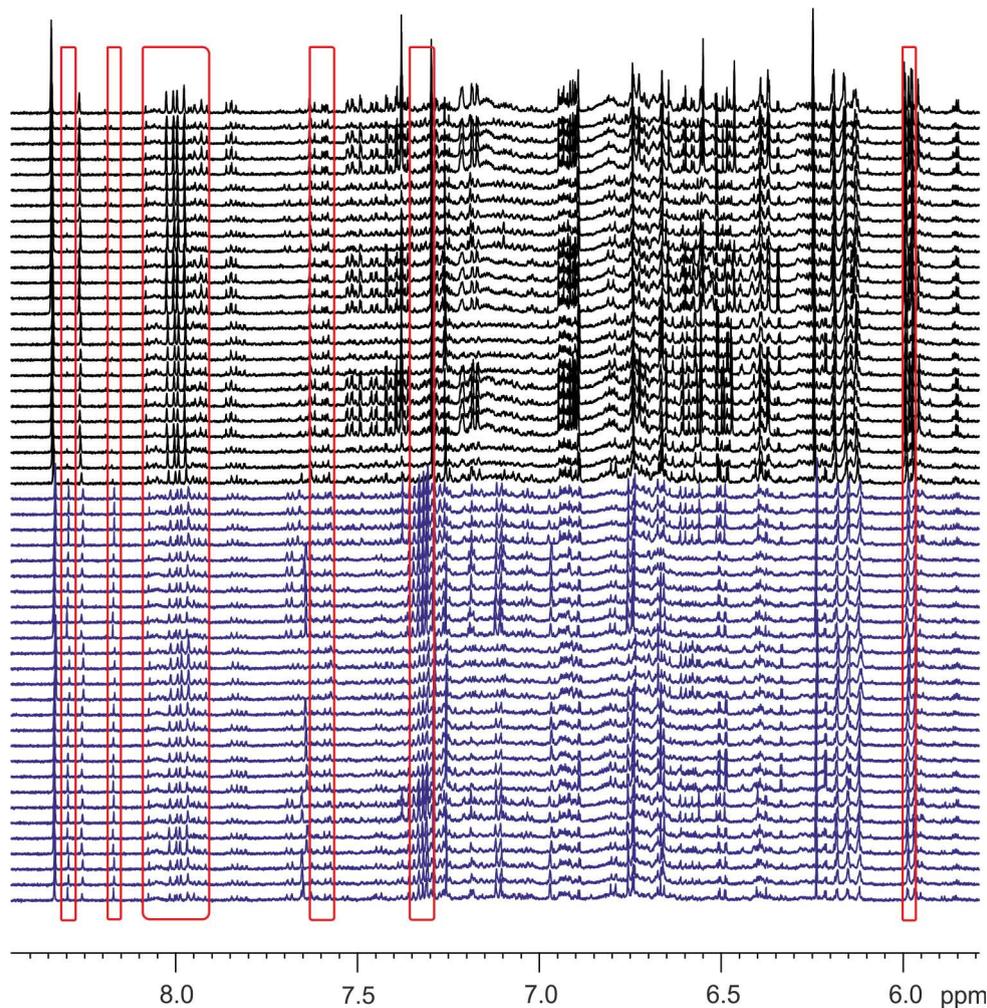


Abbildung 4.10: Darstellung des spezifischen Signalmusters im Bereich von 6.0 bis 8.5 ppm, zur Auswertung der Daten aus den 48 h Salzstressexperimenten mittels PCA. Die Musterbereiche sind rot unterlegt

In Abbildung 4.12 ist die PCA, der Influence-Plot, die Darstellung der Gesamtvarianz und der Loadings-Plot der 48 h Salzstress- und Kontrollproben der Sprossachsen gezeigt. Aufgrund des signifikanten Signalmusters, welches durch eine Salzbehandlung hervorgerufen wurde, konnte eine eindeutige Unterscheidung zwischen behandelten und unbehandelten Proben durchgeführt werden. Lediglich eine WT Kontrollprobe lag außerhalb des vorgegebenen Konfidenzlevels. Im Influence-Plot sind die als mögliche Ausreißer angegebenen *cpm2* Proben des 2. Experimentators gezeigt. Diese Proben konnten ebenfalls in Salzstress- bzw. Kontrollproben eingeteilt werden. Die Darstellung der Gesamtvarianz verdeutlicht, dass mit den ersten beiden PCs die Varianz zu 99.36% angegeben werden kann. Im Loadings-Plot ist zu erkennen, dass die Bereiche um 1.8, 1.7, 3.9 und 7.3 ppm für die Trennung der Gruppen in Salzstress- und Kontrollproben ausschlaggebend sind. Des Weiteren konnten im Verlauf der Auswertung die beiden Singulettts im Bereich um 8.17 und 8.30 ppm als eindeutiges Indiz für eine Salzbehandlung und damit als Biomarker-

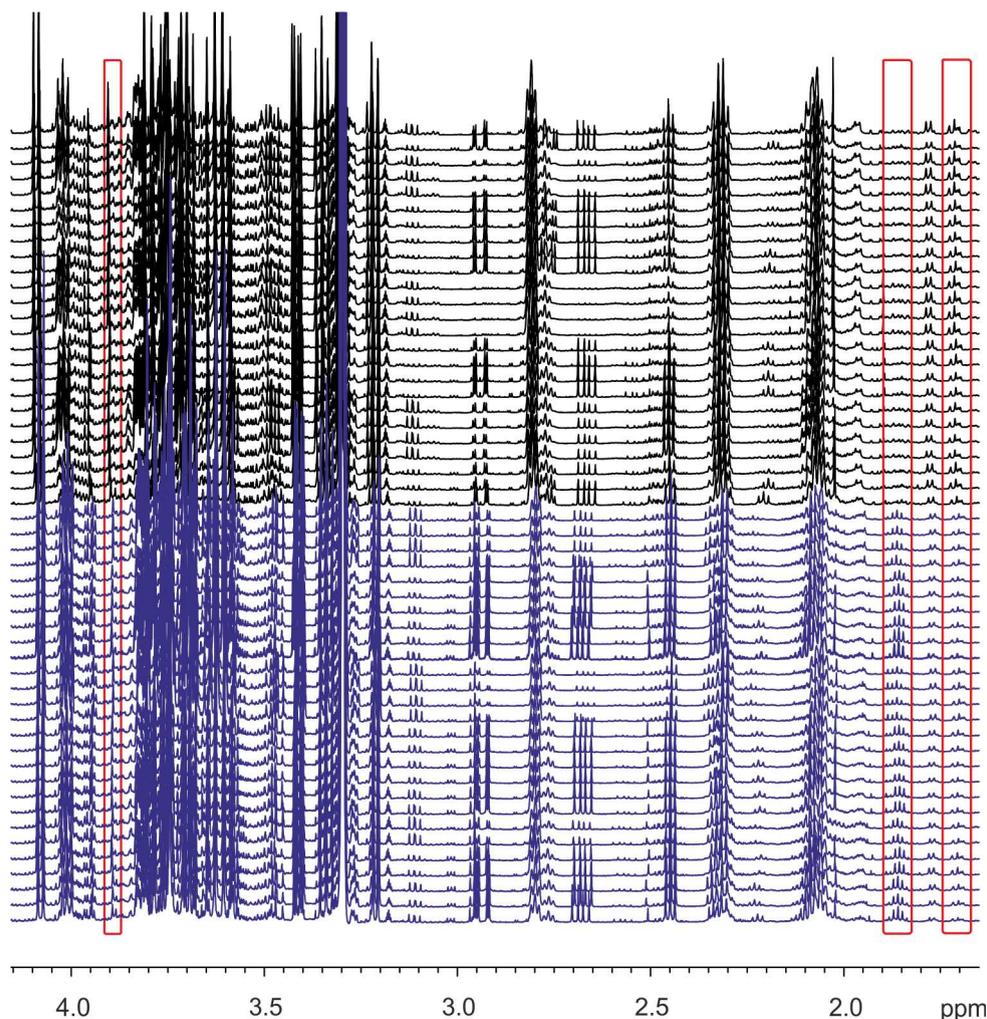


Abbildung 4.11: Darstellung des spezifischen Signalmusters im Bereich von 1.5 bis 4.0 ppm zur Auswertung der Daten aus den 48 h Salzstressexperimenten. Die entsprechenden Bereiche sind rot hinterlegt.

Muster identifiziert werden. Im Abschnitt 4.2.4 wurden die spezifischen Signale nach einer Salzbehandlung mit einer Datenbank abgeglichen und einige der Substanzen durch Spiken identifiziert.

In Abbildung 4.13 ist die PCA, der Influence-Plot, die Darstellung der Gesamtvarianz und der Loadings-Plot dargestellt. Es wurden 27 Spektren der 48 h salzbehandelten Keimlinge ausgewertet, wobei hier die Extrakte der Sprossache untersucht wurden. Es konnte die Gruppierung der Genotypen nach der Salzbehandlung festgestellt werden. Für die PCA wurde ein Muster (s. Abbildung 10.7) angelegt, welches dem Kapitel 10 zu entnehmen ist. Eine deutliche Unterscheidung gelingt zwischen WT und *hebiba*, wobei die Gruppierung der *cpm2* dazwischen liegt. Im Influence-Plot sind eine *cpm2* Probe sowie zwei *hebiba* Proben als mögliche Ausreißer gekennzeichnet. Mit den ersten drei PCs kann die Gesamtvarianz zu 96.66% angegeben werden. Im Loadings-Plot ist zu erkennen, dass die ppm-Bereiche um 0.97, 1.31 und 2.97 entscheidend für die Separation der Genotypen sind.

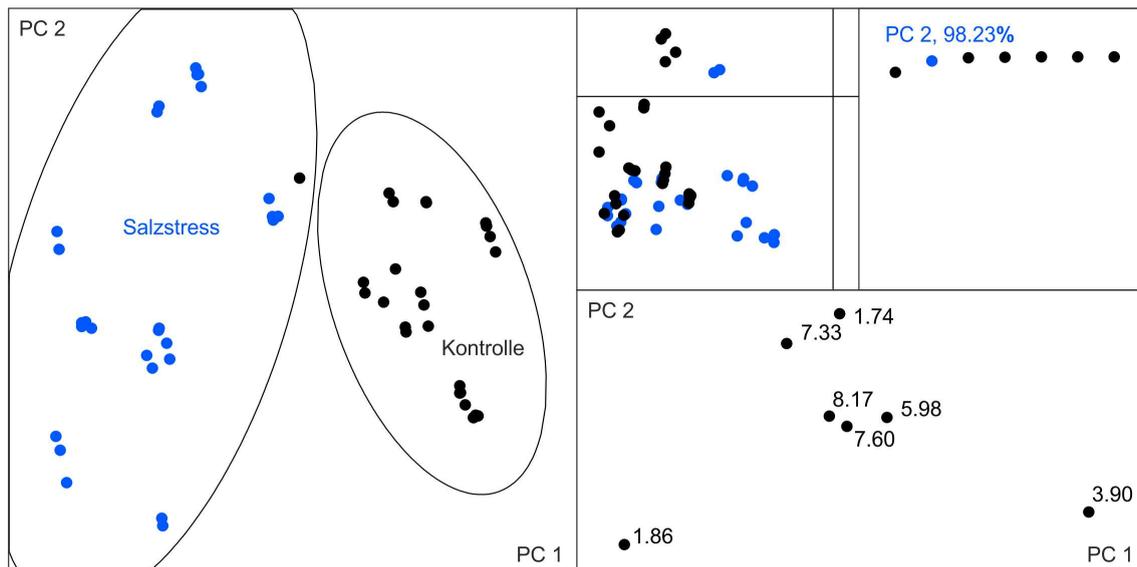


Abbildung 4.12: PC 1 gegen PC 2 der in Abbildung 4.9 gezeigten 53 Spektren der Salz- (blau) und Kontrollproben (schwarz). Das Vertrauensintervall des T^2 Group Hotellings betrug 0.9, die Skalierung erfolgte zur Gesamtintensität und die Arealgröße wurde durch die Musterbreite dividiert. Im Influence-Plot sind die möglichen Ausreißer von *cpm2* gekennzeichnet. Die Gesamtvarianz kann mit den ersten beiden PCs zu 98.23% angegeben werden kann. Im Loadings-Plot wird der Zusammenhang zwischen der Muster-tabelle und der größten Varianz angezeigt, wobei das Muster nur wenige Bereiche beinhaltet (s. Abbildung 4.10 und 4.11).

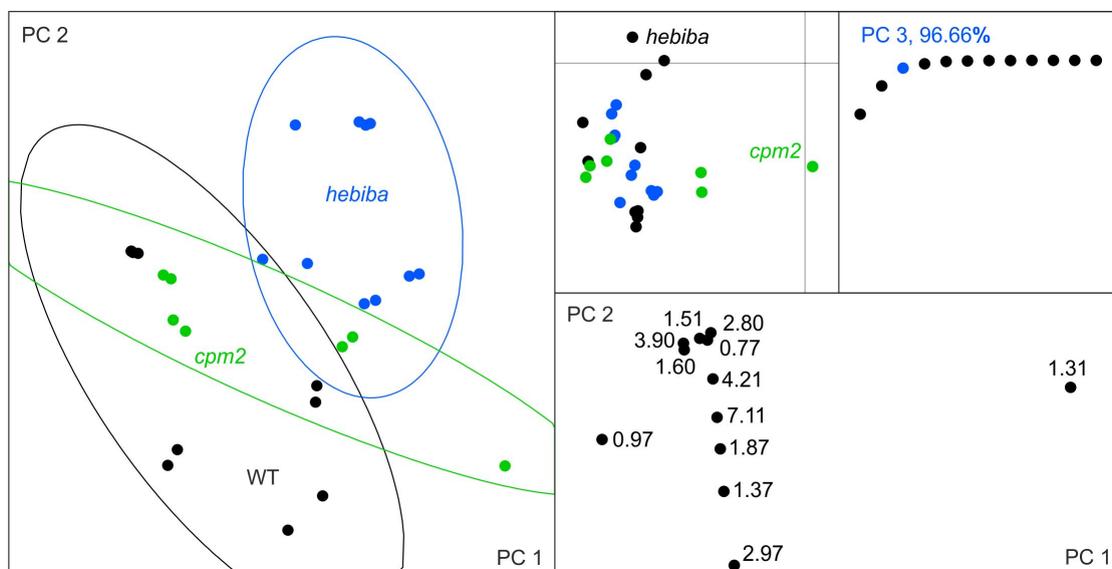


Abbildung 4.13: PC 1 gegen PC 2 der in Abbildung 4.9 gezeigten 27 Spektren der salz-behandelten *hebiba* (blau), *cpm2* (grün) und WT (schwarz) Proben. Das Vertrauensintervall des T^2 Hotelling-Plots betrug 0.8. Die Skalierung bezog sich auf die Gesamtintensität und die Arealgröße wurde durch die Musterbreite geteilt. Im Influence-Plot sind die als mögliche Ausreißer der *cpm2* Proben gekennzeichnet. Die gezeigte Gesamtvarianz verdeutlicht, dass mit den ersten drei PCs die größte Varianz zu 96.66% angegeben werden kann.

4.2.1.1 Experimentreihe 1

Die Anzucht der Experimentreihe 1 wurde mit drei Ansätzen von Experimentator 1 durchgeführt (s. Tabelle 4.2 und 4.3). Sowohl die Extrakte der Sprossachsen als auch der Wurzeln wurden ausgewertet. Häufig war nach der Anzucht die Menge an Pflanzenmaterial zu gering, sodass Triplikate nur insgesamt zweimal durchgeführt werden konnten.

Die Ergebnisse der Salzbehandlung der ersten Experimentreihe mit jeweils drei Ansätzen der geernteten Sprossachsen sind in der PCA in Abbildung 4.14 dargestellt, wobei die 17 Salzbehandlungsproben für die Auswertung aus Tabelle 4.2 verwendet wurden. Das entsprechende Muster ist Kapitel 10 zu entnehmen (s. Abbildung 10.3). WT, *cpm2* und *hebiba* Proben wurden in einer PCA gegeneinander aufgetragen, wobei durch Separation zwar die Gruppen zwischen WT und *hebiba* getrennt, jedoch eine Überschneidung zwischen *cpm2* und *hebiba* Proben zu erkennen ist. In Abbildung 4.14 ist der Influence-Plot, die Darstellung der Gesamtvarianz und des Loadings-Plot zu sehen. Im Influence-Plot lagen alle Proben im Modellbereich. Die Gesamtvarianz der verwendeten Proben lag bei 98.23%. Der Loadings-Plot zeigte bei 0.97, 1.31, 2.80 und 2.97 ppm die für die Trennung der Gruppen entscheidenden Bereiche.

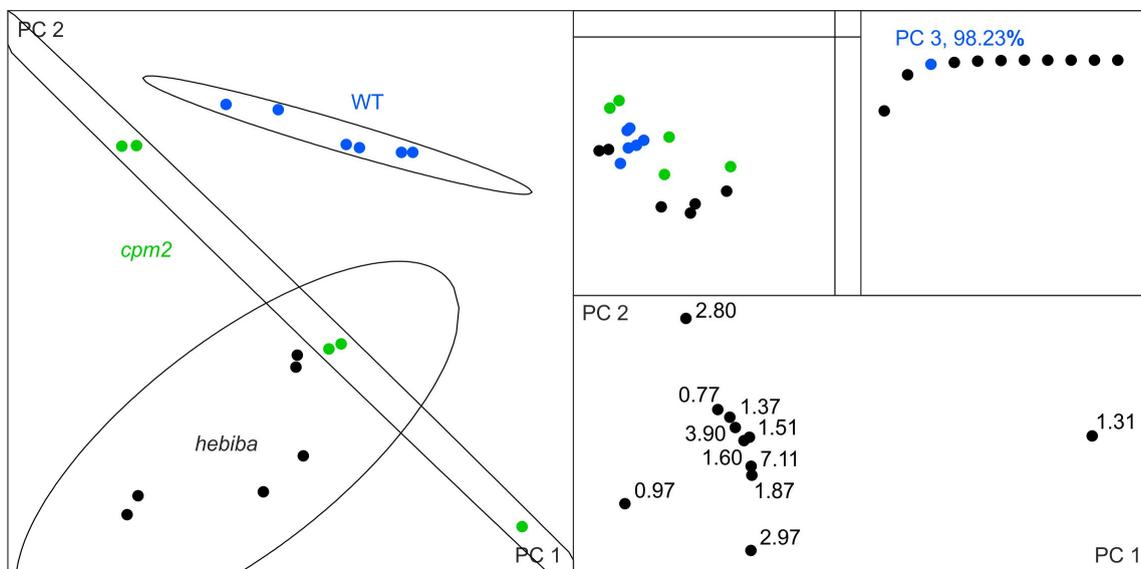


Abbildung 4.14: PC 1 gegen PC 2 der in Tabelle 4.2 aufgelisteten 17 Salzproben von WT (blau), *cpm2* (grün) und *hebiba* (schwarz). Das Konfidenzlevel betrug 0.8. Bei dieser PCA wurden die Buckets auf die Gesamtintensität skaliert und durch die Musterbreite dividiert. Im Influence-Plot sind keine Ausreißer vorhanden und die Gesamtvarianz lag bei 98.23%.

Im folgenden sollen die Ergebnisse der Extrakte aus dem gewonnenen Wurzelmaterial dargestellt werden. In der Tabelle 4.3 ist eine Übersicht über die geernteten und präparierten

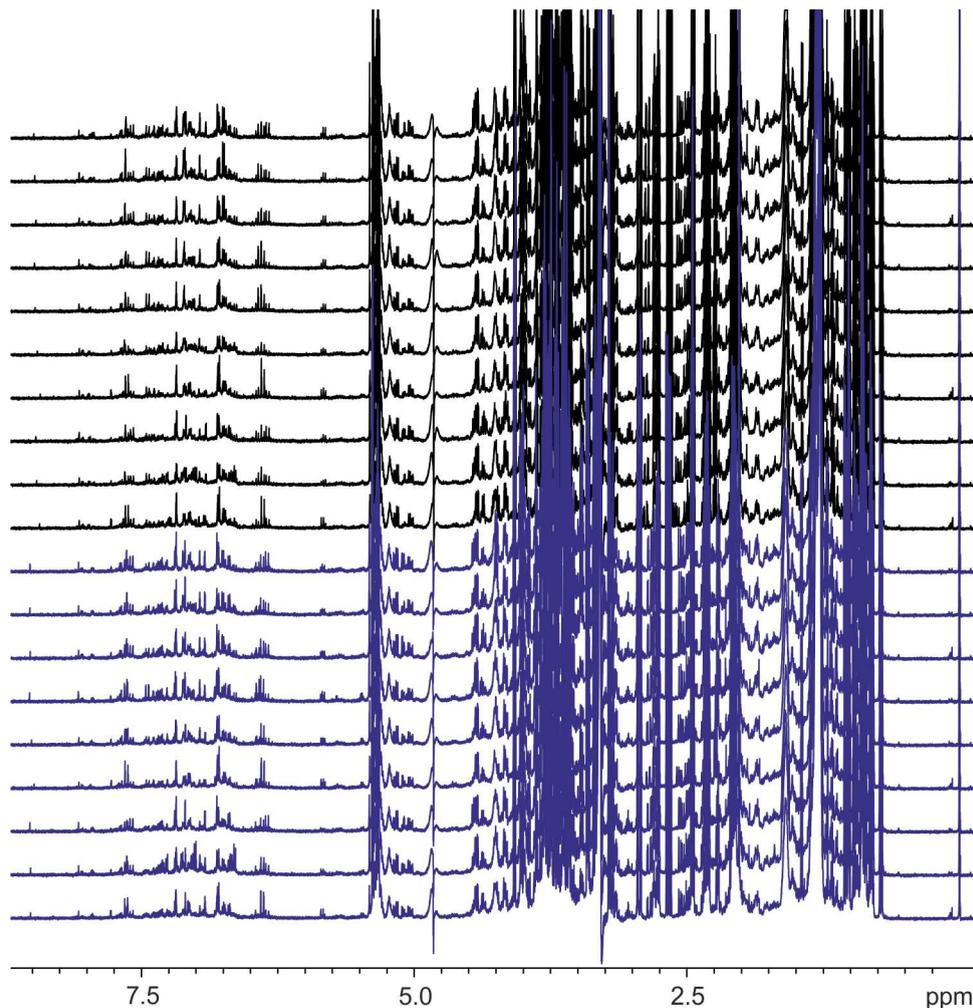


Abbildung 4.15: Darstellung der 19 Spektren der Wurzelextrakte, wobei die Kontrollproben (schwarz) und die Salzproben (blau) farblich unterschieden wurden. Es handelt sich um Spektren von drei Versuchsansätzen des ersten Experimentators (s. Tabelle 4.3). Die Versuchsreihen wurden mit drei verschiedenen Genotypen durchgeführt, welche jedoch der Übersichtlichkeit halber nicht farblich hervorgehoben wurden.

Proben aufgelistet. Im Vergleich zu den Sprossachsen konnte weniger Masse gewonnen werden. Die in Abbildung 4.15 gezeigte Übersicht der Wurzelspektren verdeutlicht, dass keine signifikanten Musteränderungen zwischen Salzbehandlung und Kontrolle bzw. zwischen den Genotypen zu erkennen sind. Lediglich eine minimale Signalverschiebung ist bei den salzbehandelten Proben festzustellen. Diese Signalverschiebung führt zu einer Gruppierung in der in Abbildung 4.16 gezeigten PCA, wobei eine Bucketweite von 0.05 ppm verwendet wurde. Aufgrund des nicht feststellbaren Unterschieds im Signalmuster, konnten keine spezifischen Metabolite als Indikatoren für einen Salzstress anhand des Wurzelextrakts identifiziert werden. Bei dem Ausreißer handelt es sich um eine WT Probe nach Salzbehandlung. Die entsprechenden Plots zur Hauptkomponentenanalyse sind dem Kapitel 10 zu entnehmen.

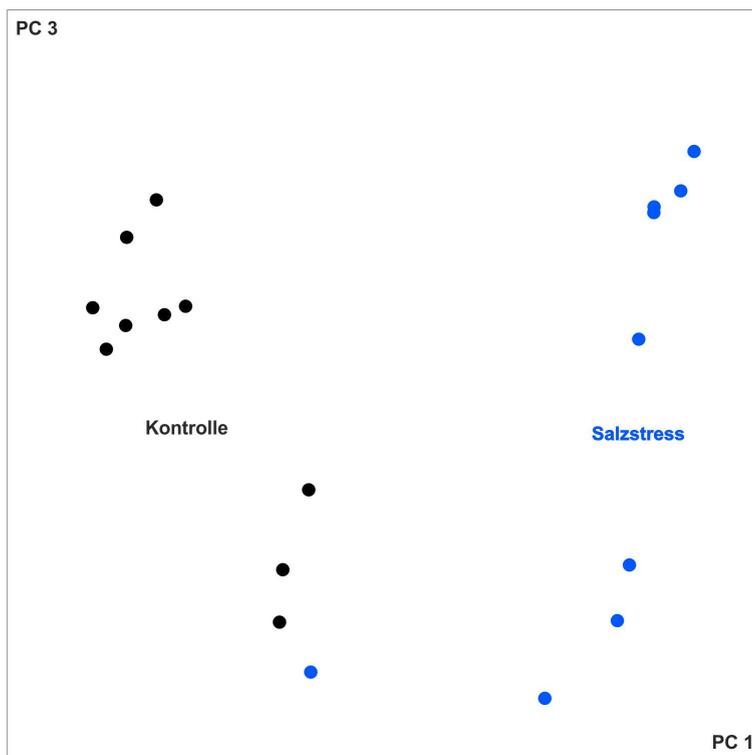


Abbildung 4.16: PC 1 gegen PC 3 der in Abbildung 4.15 gezeigten 19 Spektren der Wurzel-extrakte der Salz- (blau) und Kontrollproben (schwarz). Die Bucketbreite beträgt 0.05 ppm, wobei das Wassersignal sowie das Methanolsignal ausgeschlossen wurden. Der Ausreißer im Kontrollbereich ist eine WT Probe.

4.2.1.2 Experimentreihe 2

Die Ansätze der 2. Experimentreihe wurden von Experimentator 2 durchgeführt. Bei den Sprossachsenextrakten konnten ein Kontroll- bzw. Salzstressansatz untersucht werden. Daher werden die Ergebnisse dieses Ansatzes im allgemeinen Teil der 48 h Salzbehandlung dargestellt und dienen der Verifizierung der Ergebnisse von Experimentator 1. Aus Mangel an gewonnener Wurzelmasse konnte hier keine Auswertung durchgeführt werden.

4.2.2 24 h Salz- und Trockenstressbehandlung

In diesem Abschnitt wird die Auswertung der 24 h Salz- und Trockenstressproben dargestellt und beschrieben. Sowohl die Extrakte der Sprossachsen als auch der Wurzeln wurden ausgewertet. Die Anzucht der 24 h Salz- und Kontrollproben konnte mit bis zu drei, die PEG Versuche mit zwei Ansätzen durchgeführt werden (s. Tabelle 4.4). Hierbei wurden die beiden Genotypen WT und *hebiba* nach der entsprechenden Standardarbeitsanweisung präpariert (s. Kapitel 3). Nach der Anzucht war die Menge an Pflanzenmaterial der Sprossachse in manchen Fällen zu gering, sodass Triplikate insgesamt nur zweimal durchgeführt werden konnten.

Tabelle 4.2: Probenübersicht der 1. Experimentreihe der geernteten Sprossachsen. Die Behandlung fand 48 h in Kimura B-Medium mit einer Salzkonzentration von 150 mM NaCl statt.

	Ansatz	Kontrollprobe(n)	Salzprobe(n)
<i>hebiba</i>	1	3	2
	2	2	2
	3	1	2
<i>cpm2</i>	1	1	2
	2	2	2
	3	3	1
WT	1	2	2
	2	1	2
	3	2	2

In Abbildung 4.17 ist die PCA der in Tabelle 4.4 benannten Probenansätze gezeigt. Sie beinhaltet die Sprossachsenproben der 24 h Salzbehandlung, den Trockenstressansatz mittels PEG und den Kontrollansatz. Das für diese PCA verwendete Muster ist dem Kapitel 10 zu entnehmen (s. Abbildung 10.4). Aufgrund des Signalmusters, welches durch eine Salzbehandlung bzw. durch Trockenstress hervorgerufen wurde, konnte eine Unterscheidung zwischen behandelten und unbehandelten Proben getroffen werden. Die Salzstressproben konnten von den Kontrollproben ebenso separiert werden wie die PEG- von den Salzstressproben. Bei den Gruppierungen der PEG Proben jedoch fand eine Überlagerung mit den Kontrollproben statt. Die Moleküle, welche den Signalmustern zugrunde liegen, wurden im Abschnitt 4.2.4 weiter untersucht und falls möglich identifiziert bzw. quantifiziert.

In Abbildung 4.17 ist der Influence-Plot, die Darstellung der Gesamtvarianz und der Loadings-Plot dargestellt. Im Influence-Plot sind die als mögliche Ausreißer angegebenen Proben gekennzeichnet, wobei es sich um eine WT Kontrollprobe und zwei *hebiba* Salzstressproben handelt. Die Darstellung der Gesamtvarianz verdeutlicht, dass mit den ersten beiden PCs die Varianz zu 99.89% angegeben werden kann. Die Bereiche um 1.32, 7.30, 8.17 und 8.30 ppm sind für die Trennung der behandelten und unbehandelten Proben verantwortlich. Eine Separation in die zwei Genotypen konnte jedoch weder durch ein Bucketing, noch durch das Anlegen eines Musters durchgeführt werden.

Tabelle 4.3: Probenübersicht der 1. experimentellen Reihe der geernteten Wurzeln. Die Behandlung fand 48 h in Kimura B-Medium mit einer Salzkonzentration von 150 mM NaCl statt.

	Ansatz	Kontrollprobe(n)	Salzprobe(n)
<i>hebiba</i>	1	1	1
	2	1	1
	3	1	1
<i>cpm2</i>	1	1	1
	2	1	1
	3	1	1
WT	1	2	1
	2	1	1
	3	1	1

Im folgenden werden die Ergebnisse der Wurzelextrakte dargestellt und beschrieben. Zunächst erfolgt die Übersicht über Proben der Reiswurzeln in Tabelle 4.5.

Die Spektren der Wurzelextrakte in Abbildung 4.18 zeigen keine spezifischen Unterschiede zwischen Salzbehandlung, PEG-Behandlung und Kontrolle. Demnach konnten keine signifikanten Signalmuster im Bezug auf die Behandlung oder den Genotyp identifiziert werden. Eine Trennung der Ansätze in Bezug auf die Behandlung konnte weder durch eine PCA mit Bucketing, noch durch eine Erstellung eines Musters erreicht werden.

Tabelle 4.4: Probenübersicht der 24 h Salz- und Trockenstressproben sowie der Kontrolle (Sprossachse). Die Behandlung fand mit Kimura B-Medium mit einer Salzkonzentration von 150 mM bzw. mit einer 10%igen PEG-Lösung statt.

	Ansatz	Kontrollprobe(n)	Salzprobe(n)	PEG
<i>hebiba</i>	1	2	2	2
	2	–	1	–
	3	1	1	1
WT	1	2	2	2
	2	3	1	3
	3	1	2	–

Tabelle 4.5: Probenübersicht der 24 h Salz-, Trockenstressproben sowie der Kontrollproben der Wurzelextrakte 48 h nach einer Behandlung mit Kimura B-Medium mit einer Salzkonzentration von 150 mM bzw. einer 10%igen PEG-Lösung.

	Ansatz	Kontrolle	Salzbehandlung	PEG
<i>hebiba</i>	1	–	1	2
	2	2	1	1
	3	1	1	–
WT	1	–	1	3
	2	1	2	3
	3	1	–	–

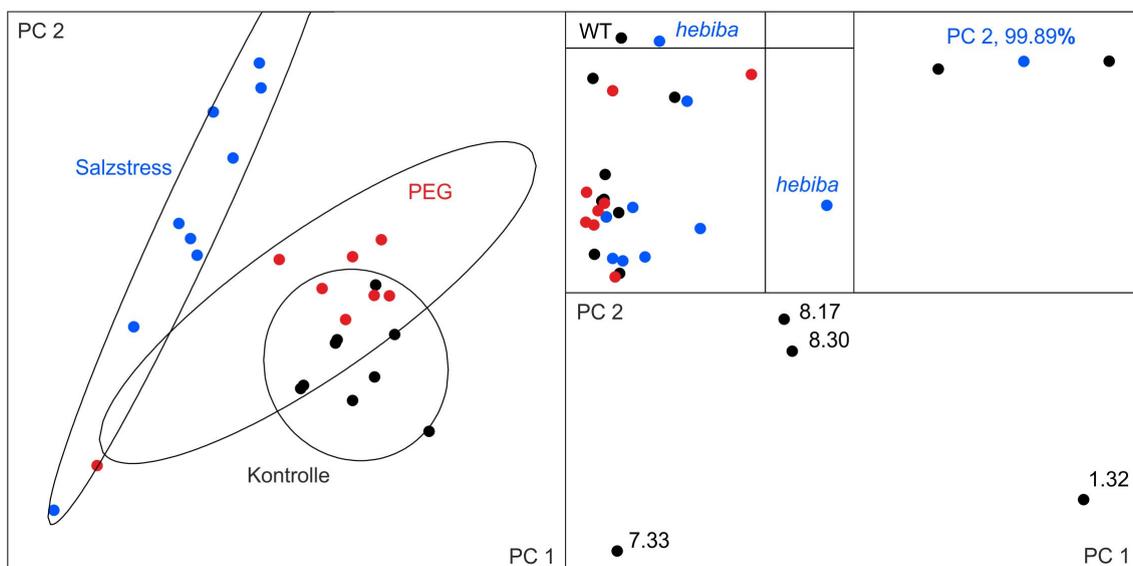


Abbildung 4.17: Gezeigt ist die PCA der in der Tabelle 4.4 aufgelisteten 26 Spektren der Sprossachsenextrakte der Salz- (blau), der PEG (rot) und der Kontrollproben (schwarz). Es erfolgte eine Skalierung zur Gesamtintensität. Das Vertrauensintervall des T^2 Hotelling-Plot betrug 0.78 und die Gesamtvarianz der ersten beiden PCs lag bei 99.98%. Im Loadings Plot wird der Zusammenhang zwischen der Mustertabelle und der größten Varianz angezeigt, wobei durch das verwendete Signalmuster nur wenige Bereiche zu sehen sind. Für die Trennung der Gruppen sind vor allem die Bereiche um 7.33 und 1.32 ppm verantwortlich.

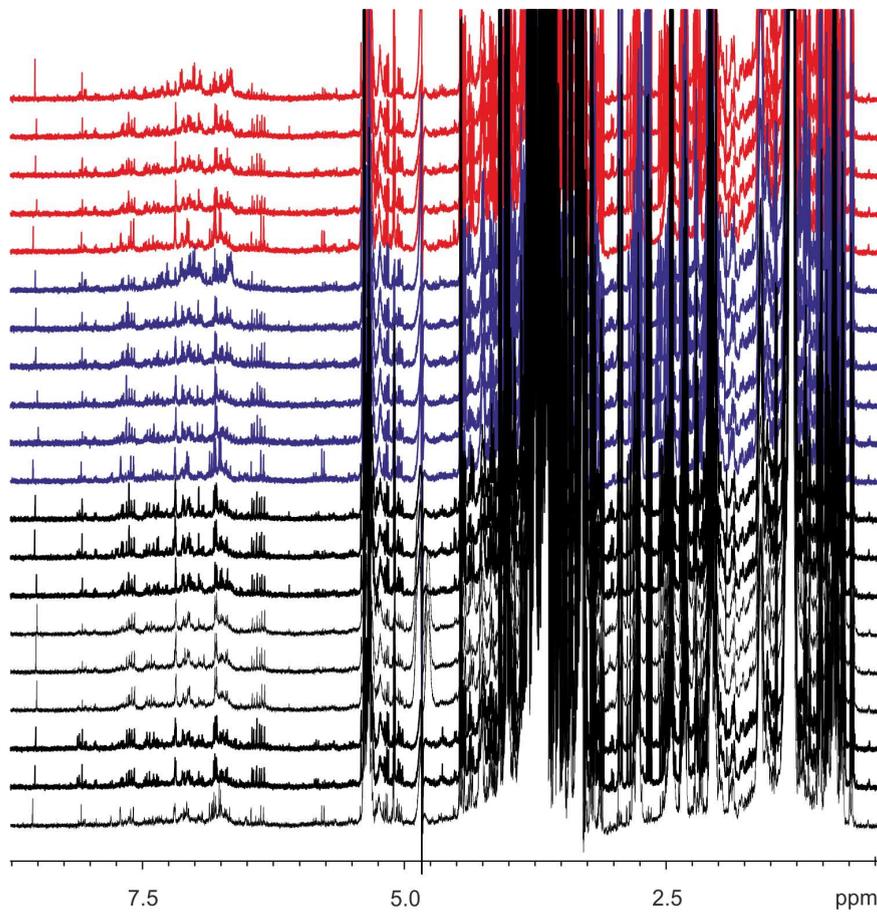


Abbildung 4.18: Gezeigt ist die Übersicht der 20 Spektren der 24 h Salzstress-(blau), PEG-(schwarz) und Kontrollproben (rot) der Wurzelextrakte.

4.2.3 24 h und 48 h Behandlungsdauer im Vergleich

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der beiden unterschiedlich langen Salzbehandlungsexperimenten verglichen. Es werden nur die Spektren der Sprossachse für die Auswertung verwendet, da die vorherige Betrachtung der Wurzelextrakte in Abschnitt 4.2.1 und 4.2.2 keine signifikanten Signalmuster in den Wurzelextrakten ergaben. Da bei den 24 h Salzstressexperimenten keine *cpm2* Samen verwendet werden konnten, wurden für die Gegenüberstellung der Ergebnisse nur WT- und *hebiba* Proben ausgewertet. Im Folgenden wurden insgesamt 56 Spektren für die beiden zeitlich unterschiedlichen Salzstressbehandlungen verglichen. Die Proben konnten mithilfe der Hauptkomponentenanalyse (s. Abbildung 4.19) gruppiert bzw. aufgrund eines unterschiedlichen Signalmusters separiert werden. Sowohl die 24 h und 48 h Kontrollgruppe, als auch die beiden Salzstressgruppen konnten trotz teilweiser Überlagerung jeweils voneinander getrennt werden. Die Moleküle, welche den Signalmustern zugrunde lagen, konnten im Abschnitt 4.2.4 teilweise identifiziert bzw. quantifiziert werden. In der Abbildung 4.19 ist der Influence-Plot, die Darstellung der Gesamtvarianz und der Loadings-Plot zu sehen. Der Influence-Plot zeigt, dass die Proben 24 h *hebiba* Salzstress, WT Kontrolle und 24 h *hebiba* Kontrolle als Ausreißer angesehen werden können. Die Darstellung der Gesamtvarianz verdeutlicht, dass mit den ersten drei PCs die Varianz zu 97.15% angegeben werden kann. Im Loadings-Plot ist die Separierung der Gruppen in Salzstress und Kontrollgruppen mit den jeweiligen Behandlungsdauern im Zusammenhang des angelegten Musters und damit den Bereichen um 1.31 1.37 und 2.80 ppm gezeigt.

Im Folgenden wurde die Möglichkeit einer Unterscheidung zwischen den beiden Genotypen WT und *hebiba* überprüft. In Abbildung 4.20 ist durch die Erstellung eines Musters die Gruppierung in die beiden Genotypen innerhalb der 48 h Salzbehandlung durchführbar. Das entsprechende Muster ist dem Kapitel 10 zu entnehmen (s. Abbildung 10.3). Die Salzbehandlungen sind ohne Überschneidungen voneinander separierbar. Die Unterscheidung der Genotypen der 24 h Proben dagegen ist, wie im vorherigen Abschnitt bereits beschrieben, nicht möglich (s. Kapitel 4.2.2). Im Influence-Plot sind die zwei möglichen Ausreißer von *hebiba* und WT 24 h angegeben. Die Gesamtvarianz liegt bei 97.48%. Zuletzt wird im Loadings-Plot der Zusammenhang zwischen der Mustertabelle und der Varianz der entsprechenden Hauptkomponente angezeigt. Es ist zu erkennen, dass die Bereiche um 0.97, 1.31 sowie 2.8 ppm Einfluss auf die Trennung der Genotypen haben.

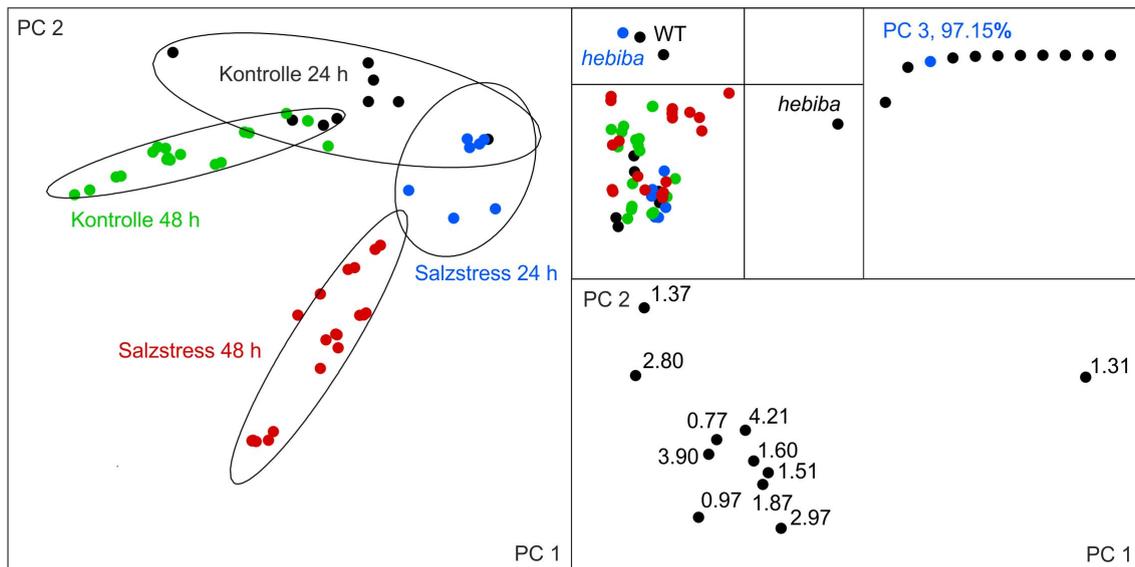


Abbildung 4.19: PC 1 gegen PC 2 der 48 h und 24 h Salzstressproben (rot/blau) mit den jeweiligen Kontrollproben (grün/schwarz). Das Konfidenzlevel des T^2 Hotelling-Plots betrug 0.8 und die Skalierung erfolgte zur Gesamtintensität. Die Musterbreite wurde durch die Regionsgröße dividiert. Im Influence-Plot sind die als mögliche Ausreißer angegebenen Proben gekennzeichnet (*hebiba* und WT 24 h Salzbehandlung). Mit den ersten drei PCs kann die Gesamtvarianz zu 97.48% angegeben werden. Die ppm-Bereiche 1.31, 0.97 sowie 2.80 stellen die größten Varianzen.

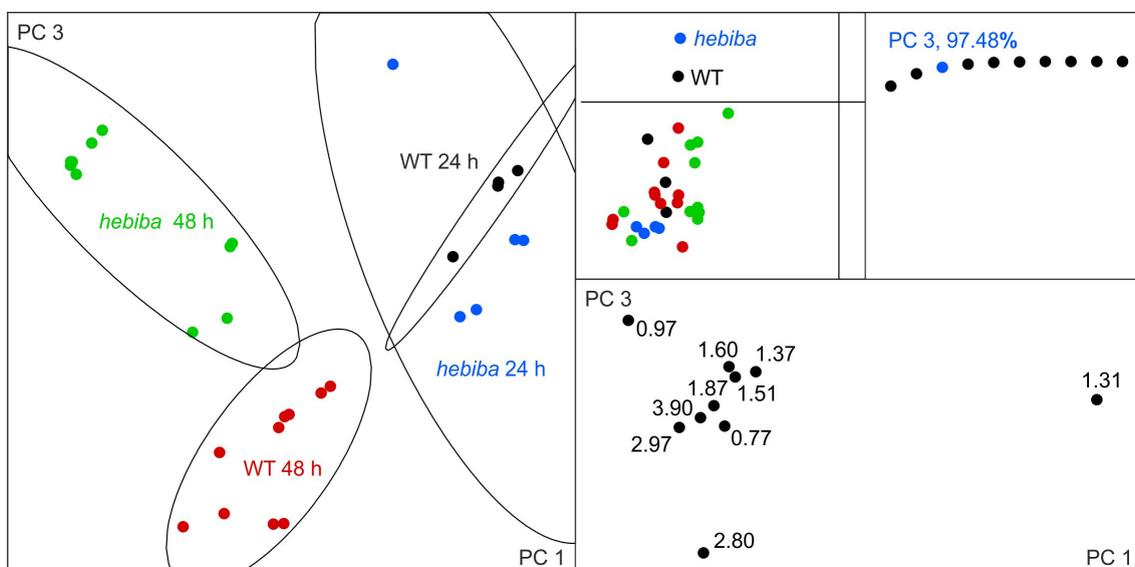


Abbildung 4.20: PC 1 gegen PC 3 der 24 h und 48 h Salzstressproben. Es wurden insgesamt 34 Spektren von *hebiba* 24 h (blau), WT 24 h (schwarz), die *hebiba* 48 h (grün) und WT 48 h (rot) Proben aufgezeichnet. Der Vertrauensintervall des Hotelling-Plot betrug 0.8. Es erfolgte eine Skalierung zur Gesamtintensität. Die Musterbreite wurde durch die Regionsgröße dividiert. Im Influence-Plot sind zwei mögliche Ausreißer von 24 h *hebiba* und WT gekennzeichnet.

4.2.4 Identifizierte Metabolite und Konzentrationen

Mithilfe einer Datenbank wurden die Spektren abgeglichen. Einige Substanzen, welche in Pflanzen potentiell vorkommen könnten, konnten durch gezielte Zugabe in den jeweiligen Proben nachgewiesen werden (s. Abbildung 4.21 und 4.22).

Von den identifizierten Substanzen konnten α -Linolensäure, Adenosin und Cholinchlorid in den Spektren quantifiziert werden, wohingegen von Betain, Alanin, Trehalose, Glycin, Prolin und Myo-Inositol aufgrund von Überlagerungen keine Konzentrationen berechnet werden konnten.

In Abbildung 4.23, sind die Diagramme der Adenosin-, Cholinchlorid- und α -Linolensäurekonzentration der 48 h Salzstressproben dargestellt. Für die Auswertung wurden die Spektren aus Kapitel 4.2.1.1 der 48 h Salzstress- und Kontrollproben der Genotypen Wildtyp, *hebiba* und *cpm2* verwendet. Die Adenosinkonzentration zeigt einen klaren Unterschied zwischen den Durchschnittswerten der behandelten (1 – 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) und den unbehandelten (3 – 3.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) Proben. Bezüglich der Konzentration an Cholinchlorid wiesen die Durchschnittswerte der behandelten Proben (23 $\mu\text{g}/\text{mL}$) und unbehandelten (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) Proben einen leichten Unterschied auf, wobei die Abweichungen vom Durchschnittswert vor allem bei den *cpm2*-Kontrollproben hoch ist. Die α -Linolensäurekonzentration zeigte dagegen einen eindeutigen Unterschied zwischen den durchschnittlichen Konzentrationen der behandelten (160 $\mu\text{g}/\text{mL}$) und der unbehandelten (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) Proben. Die Konzentration von Adenosin stieg demnach durch eine Salzstressbehandlung stark an, wohingegen die α -Linolensäurekonzentration sank.

In Abbildung 4.24 sind die Diagramme der Adenosin-, Cholinchlorid- und α -Linolensäurekonzentration der 24 h-Salzstressproben dokumentiert. Für diese Diagramme wurden die Spektren aus Kapitel 4.2.2 der 24 h Salzstress- und Kontrollproben und dabei die Genotypen Wildtyp und *hebiba* ausgewertet. Die Adenosinkonzentration zeigt einen eindeutigen Unterschied in den durchschnittlichen Konzentrationen zwischen den unbehandelten (0 – 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) und den behandelten (1.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$) Proben. Der Trend der Durchschnittskonzentrationen an Cholinchlorid zeigte ebenfalls nach der Behandlung mit Salz von 15 – 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ auf 20 – 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ einen Anstieg an. Jedoch sind die Konzentrationen vor allem bei den Salzbehandlungsproben großen Schwankungen unterworfen, weshalb der Vergleich der Genotypen nicht eindeutig ausfällt. Die durchschnittliche α -Linolensäurekonzentration hingegen sank durch die Behandlung mit Salz von 180 – 210 $\mu\text{g}/\text{mL}$ auf 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

In Abbildung 4.25 sind die Diagramme der Adenosin- und α -Linolensäurekonzentration der WT und *hebiba* Proben gezeigt. Für diese Diagramme wurden die Spektren aus Kapi-

tel 4.2.2 der 24 h Salzstress- und Kontrollproben sowie Spektren aus Kapitel 4.2.1.1 der 48 h Salzstress- und Kontrollproben ausgewertet. Diese Abbildung dient dem Überblick in Bezug auf die Adenosin- und α -Linolensäurekonzentration beider Salzbehandlungsexperimente, wobei der Unterschied der Metabolitkonzentrationen in Abhängigkeit zur Salzstresswirkung dargestellt werden soll. Die durchschnittliche α -Linolensäurekonzentration war bei den 24 h Kontrollproben geringer als bei den 48 h. Des Weiteren ist zu erkennen, dass die Konzentration durch eine Salzbehandlung unabhängig, ob diese 24 h oder 48 h dauert, ähnlich niedrig konzentriert vorliegt und die durchschnittliche Konzentration der entsprechenden Kontrollproben unterschiedlich ausfällt. Bei Adenosin hingegen war ein deutlicher Anstieg der durchschnittlichen Konzentration um den Faktor 6 zu beobachten.

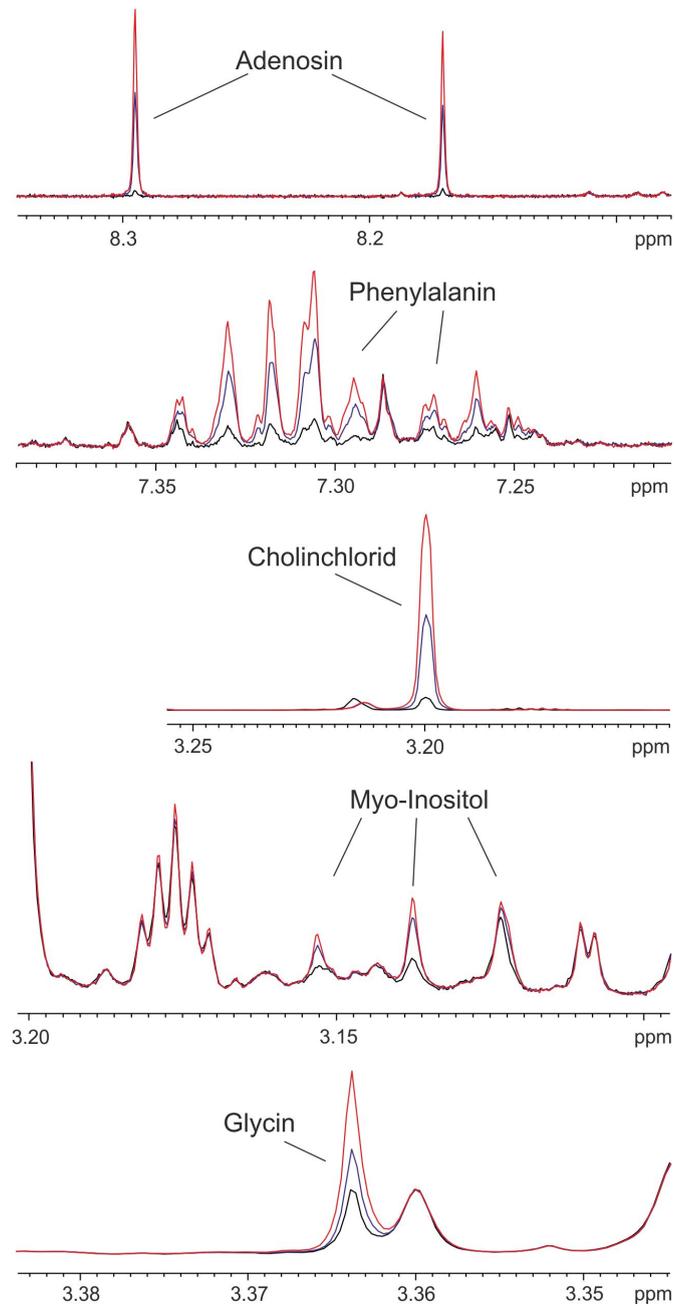


Abbildung 4.21: Durch gezielte Zugabe konnten Adenosin, Phenylalanin, Cholinchlorid, Myo-Inositol und Glycin in Reispflanzen als Metabolite bestätigt werden.

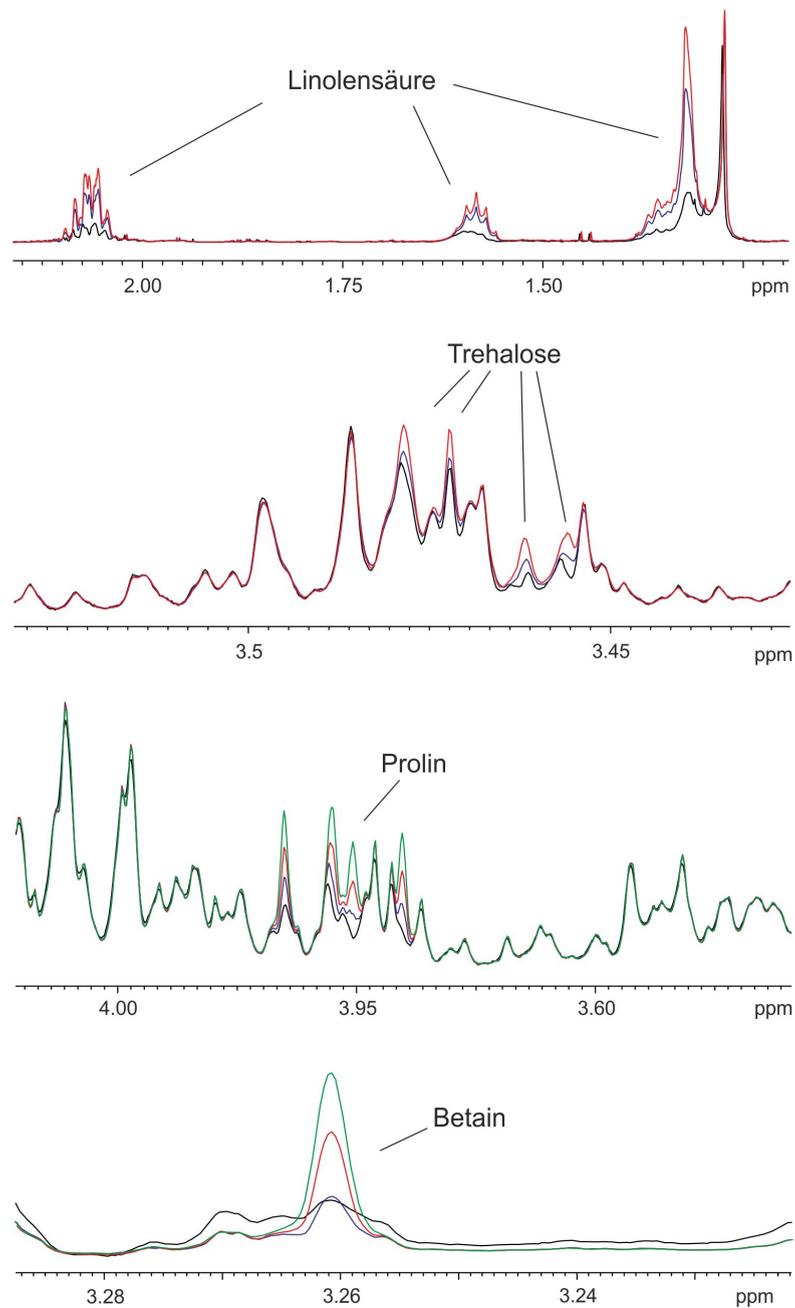


Abbildung 4.22: Nach der jeweiligen Zugabe von α -Linolensäure, Trehalose, Prolin und Betain konnten diese als Metabolite identifiziert werden.

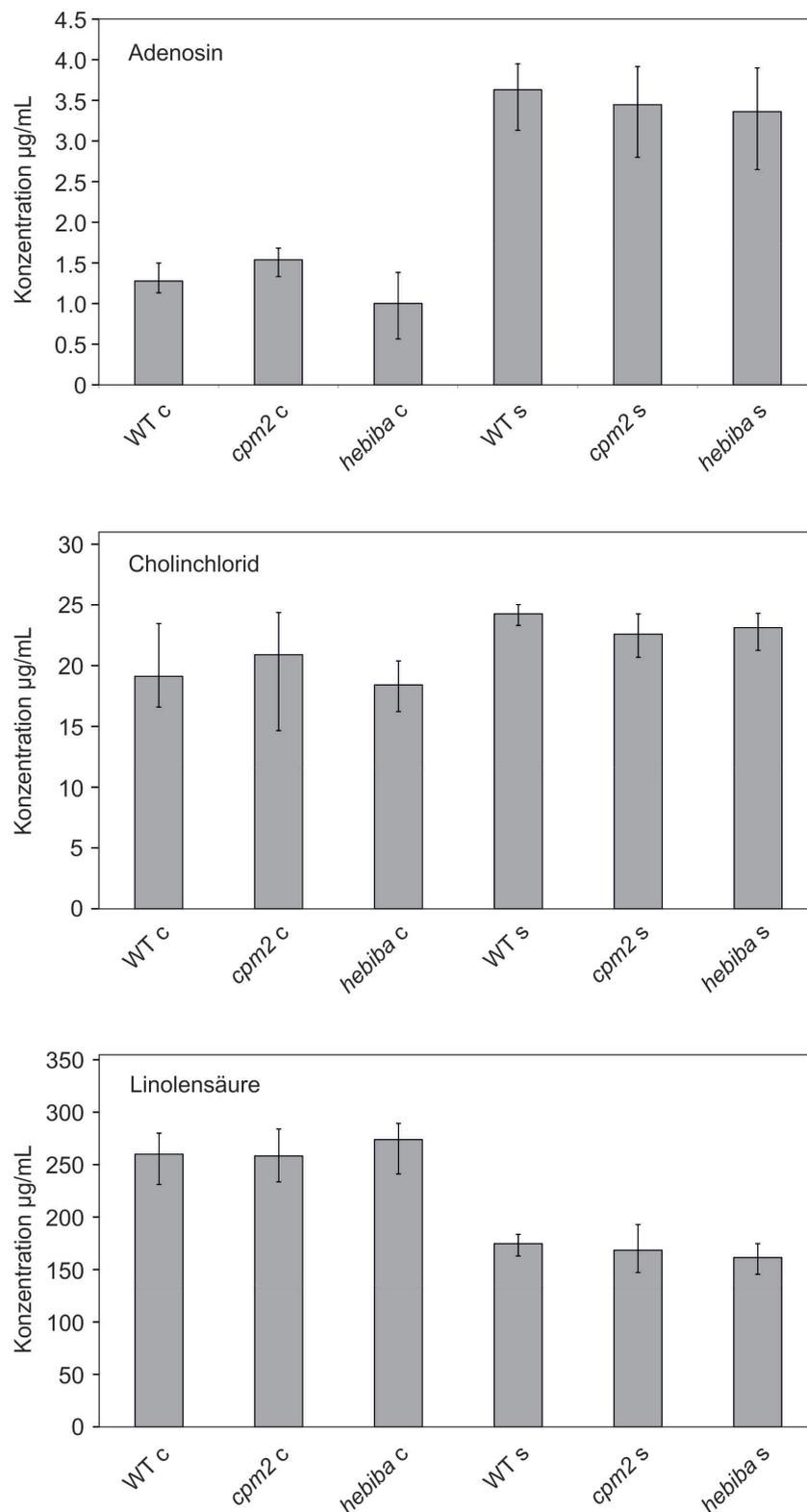


Abbildung 4.23: Diagramme der Konzentrationen von Adenosin, Cholinchlorid und α -Linolensäure. Die für diese Auswertung betrachteten Spektren 4.2.1.1 wurden 48 h lang mit Salz behandelt, wobei sowohl die Behandlungsgruppen (s) wie auch die Kontrollproben (c) ausgewertet wurden. Der Genotyp und die Behandlungen sind auf der Abszisse aufgetragen, die Substanzkonzentrationen auf der Ordinate. Die Anzucht, Probenpräparation, sowie der Vorgang der Auswertung sind dem Kapitel 3 zu entnehmen.

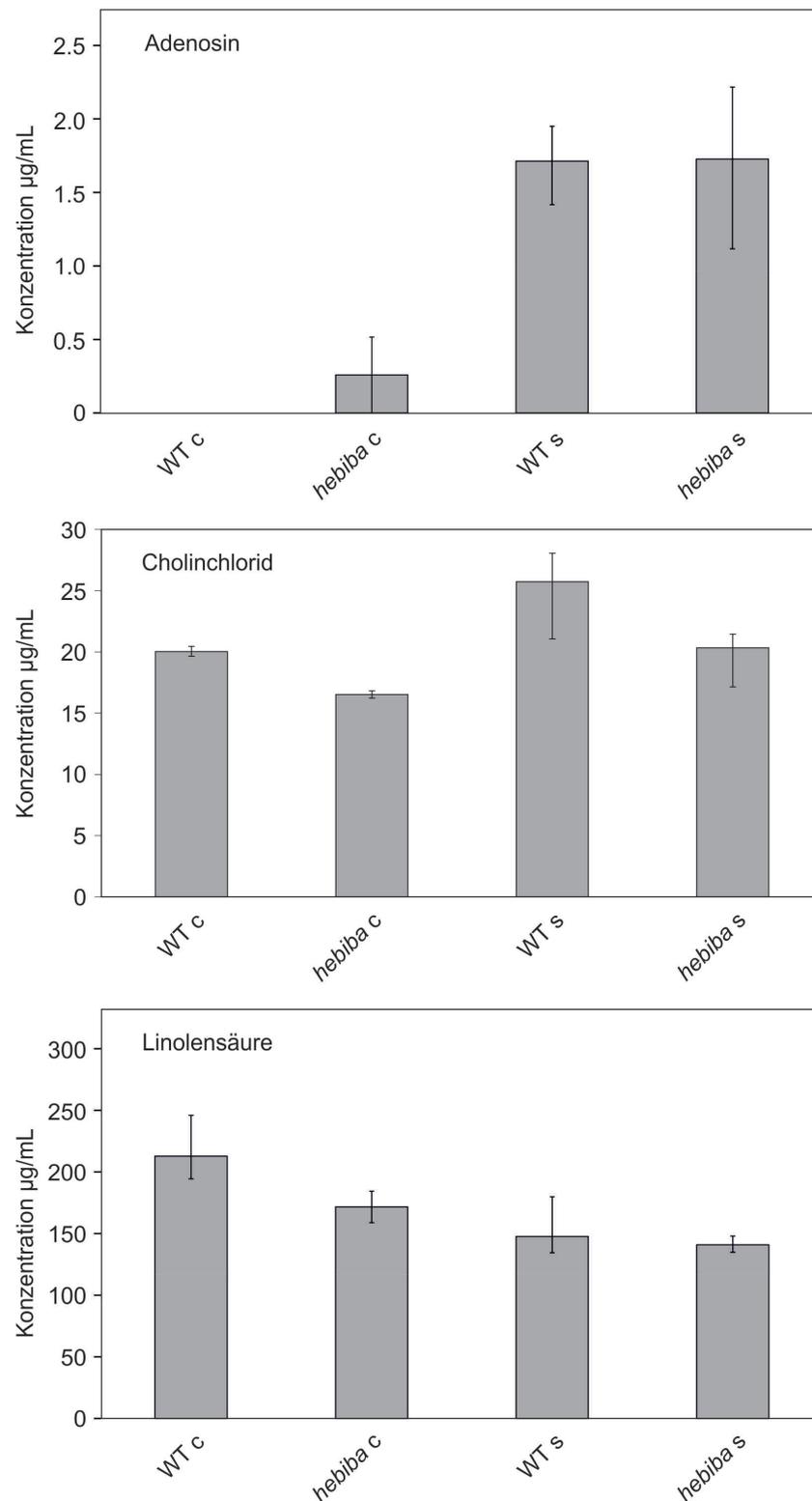


Abbildung 4.24: Diagramme der Konzentrationen von Adenosin, Cholinchlorid und α -Linolensäure. Die für diese Auswertung betrachteten Proben 4.2.2 wurden 24 h lang einer Salzstressbedingungen unterzogen, wobei sowohl die Behandlungsgruppen (s) wie auch die Kontrollproben (c) dargestellt werden. Der Genotyp und die Behandlung sind auf der Abszisse aufgetragen, die Substanzkonzentration auf der Ordinate. Details über Anzucht, Probenpräparation und Auswertung sind in Kapitel 3 aufgeführt.

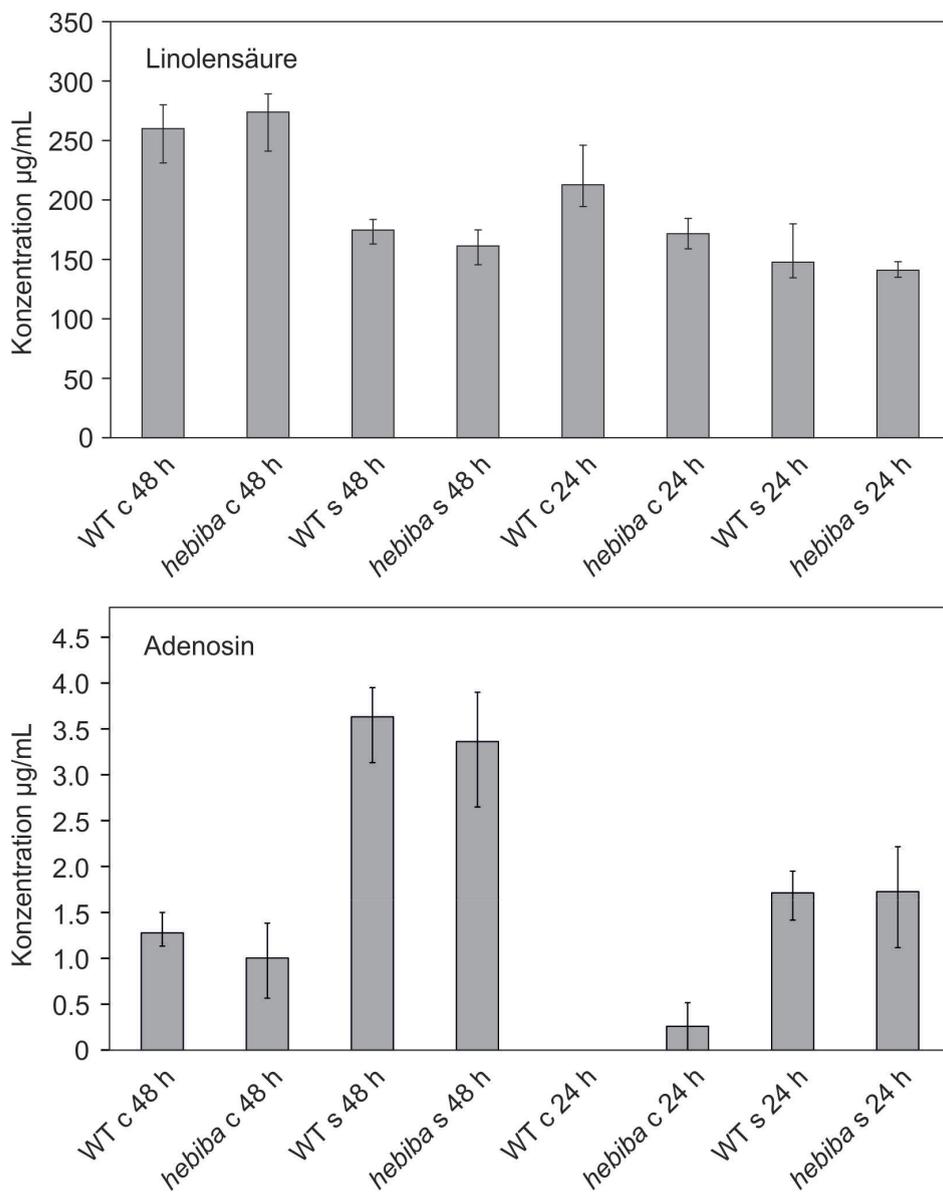


Abbildung 4.25: Diagramme der Konzentration von Adenosin und α -Linolensäure im Vergleich zur Dauer der Salzstressbehandlung. Die für diese Auswertung betrachteten Proben wurden für 24 h und 48 h einer Salzstressbehandlung unterzogen. Die Salz- (s) wie auch die Kontrollproben (c) der Genotypen sind mit der entsprechenden Behandlung auf der Abszisse aufgetragen. Die Substanzkonzentration wurde auf der Ordinate vermerkt. Die Anzucht, Probenpräparation sowie der Vorgang der Auswertung sind dem Kapitel 3 zu entnehmen.

4.2.5 Diskussion

4.2.5.1 Ergebnisse der Datenanalyse von Reis

In der Metabonomics-Studie wurde die Anwendbarkeit auf Reiskeimlinge im Zusammenhang mit Salz- und Trockenstress überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass der Metabonomics-Ansatz unter Einhaltung der SOPs zu reproduzierbaren Ergebnissen hinsichtlich der Charakterisierung der Proben und der Identifizierung und Quantifizierung von Metaboliten geeignet ist. Hierbei stand die Auswertung der NMR spektroskopischen Daten der Extrakte von Sprossachse und Wurzeln im Fokus, wobei, wie bereits in der Literatur beschrieben, die Extrakte der Wurzeln keine Veränderungen im Signalmuster im Zusammenhang mit der Behandlung oder dem Genotyp zeigten.⁹⁷

Die Extraktion wurde mit Methanol durchgeführt, da es sich bei den Modellsystemen um Jasmonsäuremangelmutanten handelte und Jasmonsäure bzw. deren Derivate im Vergleich zu Wasser eher lipophiler Natur sind. Allerdings konnte dennoch keine Jasmonsäure in den Extrakten des Wildtyps identifiziert werden, weil vermutlich Überlagerungen durch andere Signale bzw. eine zu geringe Konzentration vorlag. I. d. R. wird für eine Untersuchung von Jasmonsäure bzw. deren Derivate anstelle von 100% Methanol eine Mischung aus 80% Methanol, 19% Wasser und 1% Essigsäure verwendet.

Die Ergebnisse der 48 h Salzstress-Studie zeigten, dass eine Trennung der Behandlung in Kontroll- und Salzbehandlungsgruppe durchgeführt werden konnte. Des Weiteren konnten die Genotypen trotz abweichender Anzucht und Präparationsbedingungen der Experimentatoren 1 und 2 gruppiert werden. Bei Experimentator 1 erfolgte die Pflanzenanzucht in 0.4%-igem anstatt in 0.3%igem Phytoagar und die Zerkleinerung der Proben war bei einem von drei Ansätzen unterschiedlich (Anzucht 1: 2 min Zerkleinerung, Anzucht 2 und 3: 5 min Zerkleinerung). Die Trennung der Kontroll- und Salzbehandlungsgruppe der 48 h Studie konnte mit den Bereichen 1.7, 1.86, 3.9 und 7.3 ppm realisiert werden. Die zu diesen Signalen gehörigen Metabolite konnten bisher nicht identifiziert werden.

Die Trennung der Genotypen konnte bei allen 48 h Proben anhand der ppm-Bereich 0.97, 1.31, 2.8 und 2.97 durchgeführt werden. Die Bereiche um 1.31, 2.8 und 2.97 ppm konnten nicht identifiziert werden, wohingegen das NMR-Signal bei 0.97 ppm der α -Linolensäure zugeordnet wurden. Da die Signale bei 1.31, 2.8 und 2.97 ppm für die Trennung der Genotypen ausschlaggebend sind, ist eine Identifizierung nach Aufreinigung der Rohextrakte und nachfolgender Analyse geboten. Eine Klärung, welche Substanzen zu der Trennung der Genotypen führt, kann ein Schritt in die Erforschung der höheren Salztoleranz der Mutanten sein. Bei der Gruppentrennung liegt die *cpm2* näher an der WT Gruppe als die

hebiba Proben. Dies bestätigt bestehende Forschungsergebnisse, dass der Mutantenphänotyp von *cpm2* nicht so stark wie bei *hebiba* ausgeprägt ist.^{73,79,98}

Die unbekannt Metabolite der Bereiche um 1.3, 1.37, 1.87, 2.8, 2.97 und 7.3 ppm sind für eine weitere Analyse sehr interessant, da sie für die Unterscheidung der Behandlung wie auch der Genotypen signifikant sind und zu einer Erklärung der besseren Salzverträglichkeit bei Mutanten führen könnte. Hierfür wäre die Aufreinigung der Extrakte mit anschließenden NMR spektroskopischen Untersuchungen denkbar.

4.2.5.2 Identifizierung einzelner Metabolite und Biomarker

Die Signale von 8.17 und 8.3 ppm konnten als Biomarker-Muster bei allen Salzbehandlungsproben identifiziert werden. Bei der zugrunde liegenden Substanz handelt es sich um Adenosin, wobei der Zusammenhang zwischen dem hohen Vorkommen an Adenosin in salzbehandelten Reiskeimlingen jedoch noch nicht erforscht ist. Adenosin ist ein aus Adenin und β -D-Ribose aufgebautes Nucleosid und dient als Baustein der DNA. Es liegen Arbeiten über den Zusammenhang der Aktivität der Adenosinkinase bei Salzstress in Spinat *Spinacia oleracea* und Zuckerrübe (*Beta vulgaris*) vor, wobei der Schwerpunkt auf der Untersuchung der beteiligten Enzyme lag.⁹⁹ Für die hier vorgestellte Arbeit wäre interessant, ob Adenosin ein *Compatible Solute* darstellt oder das Anzeichen der Störung der ursprünglichen Homöostase im Kontext des Salzstress ist. Auszuschließen ist, dass es sich hierbei um ein Anzeichen von Trockenstress handelt, da es bei diesen Proben zu keiner Adenosinakkumulation kam.

Wie bereits erwähnt, konnte der Bereich um 0.97 ppm der α -Linolensäure zugeordnet werden. Das Muster im Bereich um 1.31 ppm zeigte ebenfalls Signale der α -Linolensäure, jedoch sind diese mit weiteren Frequenzen anderer Moleküle überlagert, sodass das Muster, welches hier zur Trennung der Gruppen führt, von mehreren Molekülen herrührt.

Für die Kontrollproben aller Genotypen (WT, *cpm2* und *hebiba*) wurden in den Kontrollen ähnlich hohe Konzentrationen (ca. 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) α -Linolensäure gefunden, wohingegen in den salzbehandelten Proben die Konzentrationen bei allen Genotypen (ca. 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$) signifikant sanken. Eine Erklärung hierfür ist, dass α -Linolensäure für die Synthese von verschiedenen Pflanzenhormonen und Signalstoffen wie Jasmonsäure, deren Vorläufer OPDA (*cis*-(+)-12-Oxophytodiensäure) oder auch Auxin notwendig ist. Zudem sind α -Linolensäure-Analoga als Substanzen, welche eine direkte Rolle in der Pflanzenabwehrstrategie spielen im Gespräch.^{100,101}

Eine erhöhte Jasmonsäurekonzentration ist u. a. ein Indiz auf biotischen und abiotischen Stress. Bei Salzstress handelt es sich um einen starken abiotischen Stress. Es ist bekannt,

dass Reis als Keimling empfindlicher auf Salzstress reagiert als im Reproduktionsstadium. Der Effekt der Salzbehandlung auf die Keimlinge ist dabei größer als der auf osmotischen Stress.^{73,79,98} Dies zeigt sich auch darin, dass die Gruppierung der Trockenstress- zwischen den Salzstress- und den Kontrollproben erfolgte.

Bei *hebiba* und *cpm2* handelt es sich um Jasmonsäuremangelmutanten, deren Mutation die Adenylatcyclase betrifft, einem Enzym kurz vor der Fertigstellung der Biosynthese. Alle Synthesewege davor sind nicht betroffen, d. h., dass alle von α -Linolensäure abhängigen Synthesewege ungestört verlaufen. Dies kann eine Erklärung dafür sein, dass das Vorkommen der α -Linolensäure bei allen Genotypen sowie den Behandlungen durchschnittlich die gleiche Menge aufwies.

Eine Gruppierung der Genotypen konnte bei den 24 h Proben nach Salz- und Trockenstressbehandlung nicht erreicht werden. Dies kann daran liegen, dass die Einwirkdauer zu kurz gewählt wurde, um die metabolischen Veränderungen der jeweiligen Genotypen zu erfassen, wohingegen die unterschiedlichen Behandlungen klar getrennt werden konnten. Wie zu erwarten, gruppieren sich die Trockenstressproben zwischen den Kontroll- und Salzproben. Salzbehandelte Proben sind sowohl Trockenstress sowie auch dem toxischem Ionenstress ausgeliefert. Dies zeigte sich auch dadurch, dass Salzstress- von den Kontrollproben ohne Überschneidungen vorlagen. Die für die Gruppierung verantwortlichen Bereiche um 1.32, 2.8 und 7.3 ppm waren die gleichen wie bei der Trennung der Gruppen der 48 h Proben. Weiterhin wurde der Bereich 8.17 – 8.3 ppm von Adenosin als signifikant angegeben, welches in dieser Arbeit als Biomarker für Salzstress identifiziert wurde.

Die Trennung der 48 h von den 24 h Proben durch α -Linolensäure und einer unbekannt Substanz wird durch die Bereiche um 0.97, 1.31 und 2.8 ppm ermöglicht. Die Ergebnisse des Vergleichs der 48 h mit den 24 h Proben sind jedoch nur tendenziell zu sehen. So konnte durch die Quantifizierung der beiden Metabolite α -Linolensäure und Adenosin festgestellt werden, dass die absoluten Konzentrationen beider Substanzen im Vergleich nicht die gleichen Kontrollkonzentrationen besitzen. So ist die Kontrollkonzentration der α -Linolensäure bei den 48 h Proben wesentlich höher als bei den 24 h Proben. Beiden gemeinsam ist der Trend zur Konzentrationserniedrigung nach Salzstressbehandlung, jedoch sank sie beim 48 h Salzstress-Ansatz deutlicher ab als beim 24 h Ansatz. Es konnte festgestellt werden, dass eine Salzstresseinwirkung von 48 h die Konzentration von α -Linolensäure stärker erniedrigt. Der Effekt der Erniedrigung der α -Linolensäurekonzentration durch Salzstress ist demnach abhängig von der Einwirkdauer. Die Adenosinkonzentration bei den 48 h Kontrollproben war ebenfalls höher als bei den 24 h Salzstressproben. Die Tendenz der Konzentration nach einer Salzbehandlung zu steigen, war jedoch beiden

gemeinsam.

Insgesamt konnten die neun Substanzen α -Linolensäure, Cholinchlorid, Prolin, Betain, Trehalose, Myo-Inositol, Phenylalanin, Adenosin und Glycin identifiziert werden. Den Metaboliten Cholinchlorid, Prolin, Betain, Trehalose, Phenylalanin, Glycin und Myo-Inositol ist gemeinsam, dass es sich um Substanzen zum Schutz vor Salzstress (*Compatible Solutes*) handelt.⁷⁷ So dienen sie z. B. dem Ausgleich des osmotischen Drucks oder sind als Chaperone für die Stabilisierung von Proteinen notwendig. Myo-Inositol z. B. wird unter Salzstressbedingungen synthetisiert und dient als Ausgangssubstanz zur Biosynthese von Inositolphosphaten und ROFs (raffinosem stachyose, verbasose).⁷⁷ Die Aminosäure Prolin wirkt bei Salz- und Trockenstress als Chaperon, sowie als Puffer und Stabilisator zum Erhalt des cytosolischen Redoxstatus. Zusätzlich ist Prolin als Antioxidant beim Neutralisieren freier Radikale beteiligt.^{77,102,103} In salzhaltiger Umgebung schützt das nicht reduzierende Disaccharid Trehalose die Membran vor Denaturierung und kann bei Überexpression in transgenem Reis die Stresstoleranz für abiotischen Stress vermutlich steigern.^{77,104} Das gefundene Osmolyt Betain hingegen entsteht durch die Oxidation von Cholin aus Phosphocholin, welcher als Regulator für den osmotischen Druck wirkt.⁷⁷ Die Quantifizierung dieser *Compatible Solutes*, bis auf Cholinchlorid, konnte aufgrund von Signalüberlagerungen nicht durchgeführt werden. Das Molekül Cholinchlorid konnte quantifiziert werden und zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mutanten und dem Wildtyp. Die Konzentration stieg, wie zu erwarten, nach einer Salzbehandlung bei allen Genotypen vergleichsweise ähnlich an.

Das Projekt wurde in Kooperation mit Dr. Michael Riemann und Dr. Mohamed Hazman durchgeführt. Diese Arbeit wurde noch nicht veröffentlicht.

5. Zusammenfassung Teil 1

Der Metabonomics-Ansatz ist eine vielseitige Methode, welche auf unterschiedliche Fragestellungen in Bezug auf die Analyse von Metaboliten angewendet wird. Hierbei kann er ein globales Bild der untersuchten Organisation eines Organismus geben und das Verständnis über diesen vertiefen.² Die Verwendung analytischer Methoden wie der Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie ermöglicht dabei die Gewinnung großer Datenmengen. Die Herausforderung liegt nun darin, die Fülle an Informationen über das System zu sortieren und zu entschlüsseln. Die Kombination analytischer Techniken, bioinformatischer Werkzeuge und biologischer Forschung bietet dabei die Möglichkeit, das System Organismus ganzheitlich zu verstehen.⁴⁰ Häufig wird von einem Metabonomics-Ansatz auch eine hohe Qualität in Bezug auf die Exaktheit und den Informationsgehalt der Daten erwartet. Manche Studien werden diesem Anspruch aufgrund der nicht im notwendigen Maße standardisierten Arbeitsanweisungen jedoch gerecht.¹³

Das Ziel dieser Arbeit war die Einführung des Metabonomics-Ansatz über bereits intensiv erforschte Modellorganismen, wobei durch das bereits erworbene Wissen, eine Verifizierung der Daten stattfinden konnte und neue Informationen in bereits vorhandene integriert werden konnten. Mit den in dieser Arbeit durchgeführten Metabonomics-Studien konnte gezeigt werden, dass mittels der NMR-Spektroskopie metabolische Fingerabdrücke von komplexen Systemen wie Pflanzenzellkulturen und Reiskeimlingen gewonnen und anhand dieser eine Gruppierung in Genotypen und Behandlungen mithilfe der Hauptkomponentenanalyse durchgeführt werden konnte. Die Einführung dieser Methode und die Entwicklung der jeweiligen SOPs konnte erfolgreich durchgeführt werden. Bei beiden Experimenten konnten einzelne Moleküle identifiziert und quantifiziert werden. Teilweise wurden sie

zur Unterscheidung der Gruppen in der Hauptkomponentenanalyse herangezogen und in den biologischen Kontext integriert. So konnten viele Daten für das jeweilige Experiment mittels einer einzigen Analysestudie gewonnen und der analytische Aufwand mithilfe der hochauflösenden NMR-Spektroskopie erheblich verringert werden.

Das erste Experiment befasste sich mit den Veränderungen der metabolischen Fingerabdrücke der Tabakflüssigzellkulturen durch Lichteinwirkung. Die Unterschiede waren bei beiden verwendeten Genotypen signifikant. Woraus geschlossen werden kann, dass VBI-0 zwar keine morphologischen Merkmale zur Lichtempfindlichkeit aufweist, aber molekulare. Das heißt VBI-0 reagiert auf Licht, jedoch metabolisch anders als VBI-3. Es konnte der Biomarker Fumarsäure für die Zellkultur VBI-3 identifiziert und quantifiziert werden. Fumarsäure wurde in ersten Arbeiten zusammen mit Äpfelsäure als vorübergehender Kohlenstoffspeicher im Zusammenhang mit der Photosynthese in C_3 -Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* diskutiert.^{88–90} Durch die Metabonomics-Studie konnte gezeigt werden, dass der Genotyp VBI-3 signifikant mehr Fumarsäure als VBI-0 enthielt und dass die Konzentration durch Belichtung steigt. Dies sind ähnliche Ergebnisse wie bereits bei *Arabidopsis thaliana*, bei welchen im WT nach langer Belichtungsperiode mehr Fumarsäure synthetisiert wurde als nach kurzen. Der Genotyp VBI-0 dagegen enthielt sowohl nach Belichtung als auch in Dunkelanzucht minimale Mengen an Fumarsäure. Ein Ansatz zur Klärung dieses Ergebnisses ist die Vermutung, dass ähnlich wie bei *Arabidopsis thaliana* zwei Fumarasen bei VBI-3 funktionsfähig sein könnten. Bei VBI-0 hingegen könnte die Fumarase örtlich auf die Mitochondrien (Citratzyklus) begrenzt sein.

Der Citratzyklus ist ein wichtiger Zyklus des Primärstoffwechsels und die Einbindung der Fumarsäure in diesen ist unabdingbar.^{18,88–90} Aus diesem Grund sind minimale Fumarsäurekonzentrationen in VBI-0 vorhanden. Das erhöhte Auftreten der Fumarsäure steht demnach im Zusammenhang mit den chlorophyllhaltigen Plastiden in VBI-3 und den photosynthetischen Aktivitäten während der Belichtung. Die Zusammenhänge des genetischen Hintergrunds in diesen Zellkulturen müssen allerdings noch geklärt werden.

Die gewonnenen Daten zu den nicht identifizierten Signalen, welche für die Gruppierung in belichteten Zellkulturen bzw. in den jeweiligen Genotypen ausschlaggebend waren, sollten in weiteren Analysen erforscht werden. Weiterhin können nun auch 3-Wochenkulturen durch eine Metabonomics-Studie untersucht werden, da zum einen gezeigt wurde, dass sich sowohl die Zellkultur als auch die SOPs für diesen Ansatz eignen. Zum anderen können die bestehenden Informationen zum Zellzyklus und die neu gewonnenen Daten weitere Erkenntnisse über den Metabolismus und dem bereits morphologisch und zellbiologisch erworbenen Wissen liefern. Auch die Etablierung eines Systems in dem Tabakzellenkulturen

als Produktionsstätte für Pflanzenmetabolite unter Lichtkontrolle Verwendung finden, ist denkbar. In diesem Zusammenhang wäre die Untersuchung von 3-Wochenkulturen in der ersten, zweiten und letzten Zykluswoche zu empfehlen, um die für die Produktion interessanten Zeitfenster zu ermitteln. Pharmazeutisch relevante Stoffe könnten so zukünftig z. B. in Microfluidic Chips kultiviert bzw. die Anzucht und Substanzgewinnung optimiert werden.⁸⁷

Das zweite Experiment befasste sich mit den Auswirkungen von Salzstress auf Genotypen von Reiskeimlingen (*Oryza sativa L.*) bei unterschiedlichen Einwirkzeiten. Hierbei konnten verschiedene, metabolische Fingerabdrücke analysiert werden. Zu Beginn stand die Einführung und Validierung der Methode im Vordergrund, wobei die Reproduzierbarkeit der Daten von 48 h Salzstress-Ansätzen bestätigt wurde. In dieser Arbeit konnte der Biomarker Adenosin für Salzstress identifiziert werden. Der biologische Hintergrund des vermehrten Auftretens von Adenosin im Zusammenhang mit Salzstress ist bislang nicht geklärt. Weiterhin konnte die Reduktion von α -Linolensäure festgestellt werden, welche die Vorstufe von Pflanzenhormonen wie Jasmonaten ist. Da Jasmonate zur Bewältigung von abiotischem und biotischem Stress dienen, kann die Erniedrigung der α -Linolensäurekonzentration als Marker für den hohen Stress angesehen werden, welcher durch Salz in Reiskeimlingen ausgelöst wird. Von den untersuchten *Compatible Solutes* konnte in allen Genotypen eine erhöhte Cholinchloridkonzentration nach Salzbehandlung festgestellt werden. Cholinchlorid dient demnach in diesen Reissorten als Schutzmolekül vor Salzstress. Die in dieser Arbeit untersuchten Reissorten *hebiba* und *cpm2* zeigten eine verbesserte Salztoleranz im Vergleich zum WT und sollten durch weitere Analysen im Hinblick auf nicht identifizierte Moleküle erforscht werden, da diese Aufschluss über die höhere Salztoleranz der Mutanten geben könnten.⁹⁷

6. Orientierungsmedien

Neben den klassischen NMR-Parametern wie den skalaren Kopplungen und der chemischen Verschiebung hat sich in den letzten Jahren die Messung von sogenannten anisotropen NMR-Parametern für die Analyse von Molekülstrukturen bewährt. Chemische Verschiebungsanisotropien, dipolare und quadrupolare Kopplungen sind zusätzliche NMR-Parameter, die ergänzende Strukturinformationen enthalten. Innerhalb von isotropen, flüssigen Proben jedoch mitteln sich diese Parameter aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung aus und können nicht detektiert werden. Erst durch die Einbringung in eine anisotrope Matrix richtet sich das zu untersuchende Molekül entlang einer Achse aus und verhindert die gegenseitige Aufhebung der magnetischen Momente.

Seit Saupe und Englert 1963 zum ersten Mal ein Molekül mithilfe partieller Orientierung untersuchten,¹⁰⁵ folgte eine kontinuierliche Weiterentwicklung der Orientierungsmedien bzw. der Methoden zur Messung anisotroper Parameter. Die Entwicklung erstreckte sich hierbei auf flüssigkristalline Phasen, gelbasierte Orientierungsmedien oder die Orientierung auf Basis paramagnetischer Ionen.^{106–112}

Die Ausrichtung der eingebrachten Substanzen findet auf unterschiedliche Weise statt. Während die partielle Orientierung bei flüssigkristallinen Phasen und gestreckten Gelen durch die Wechselwirkungen entlang der ausgerichteten Polymerstränge realisiert wird, wird diese bei paramagnetischen Ionen über deren Ausrichtung im Magnetfeld und einer eventuellen Komplexierung des interessierenden Moleküls, umgesetzt.^{19, 113–121}

6.1 Grundlagen

Die NMR-Spektroskopie ist eine analytische Methode, welche häufig für die Strukturbestimmung und für die Untersuchung von Moleküldynamiken eingesetzt wird. Mithilfe der

NMR-Spektroskopie können z. B. Informationen über die Konstitution, Konfiguration und in bestimmten Zusammenhängen auch über Konformationen eines Molekülsystems erhalten werden.^{122–124}

Im Gegensatz zur NMR-Spektroskopie im Festkörper sind die zu untersuchenden Moleküle in der hochauflösenden NMR-Spektroskopie in ihrer Beweglichkeit nicht eingeschränkt. Anisotrope Parameter wie dipolare Wechselwirkungen, quadrupolare Kopplungen und chemische Verschiebungsanisotropien können daher im Spektrum nicht abgelesen werden. Durch die Verwendung von Orientierungsmedien wie flüssigkristallinen Phasen oder Polymergelen wird das eingebrachte Molekül über intermolekulare Wechselwirkungen jedoch in seiner freien Rotation eingeschränkt, partiell orientiert und anisotrope Parameter können detektiert werden. Anders als in der NMR-Spektroskopie im Festkörper führt diese partielle Orientierung i. d. R. zu einer geringeren Linienverbreiterung, da die dipolaren Wechselwirkungen nicht so stark ausgeprägt sind.

Der Gewinn an zusätzlicher Strukturinformation kann für komplexe Strukturanalysen angewendet werden.^{117, 125} So werden durch die Erfassung von dipolaren (RDCs) und quadrupolaren (RQCs) Restkopplungen zusätzliche Winkelinformationen relativ zum externen Magnetfeld erhalten. Messergebnisse können anhand dieses Magnetfeldes referenziert werden, wobei weitreichende Strukturinformationen von z. B. funktionellen Gruppen gewonnen werden.

Weiterhin können anisotrope NMR-Parameter durch die Verwendung von Streckapparaturen in Kombination mit Polymergelen skaliert bzw. die Komplexität von multiplen Spinsystemen durch Entkopplungssequenzen reduziert werden. Dadurch werden die Linienbreiten verjüngt, wobei dipolare Kopplungen mit einer wesentlich geringeren Fehlertoleranz abgelesen werden können.^{110, 119–121, 126, 127}

6.2 Messung von anisotropen NMR-Parametern

Sowohl synthetisierte und biologische Polymergele, als auch flüssigkristalline Phasen werden in der hochauflösenden NMR-Spektroskopie zur schwachen Ausrichtung von Molekülen verwendet. Hierbei ist die Orientierung wesentlich schwächer ausgeprägt als in der NMR-Spektroskopie im Festkörper, wodurch sich dipolare Kopplungsanteile nur bedingt auf die Spektrenqualität auswirken und Spektren mit höherer Auflösung erhalten werden. Eine starke Orientierung würde zu weitreichenden Kopplungen führen, wobei die Linien verbreitert und die Auflösung reduziert werden würde. Anisotrope NMR-Parameter können daher durch eine schwache Ausrichtung der Moleküle exakter gemessen und abgelesen bzw. die anschließende Molekülstruktur effektiver berechnet werden.^{109, 110, 112, 128–131}

6.2.1 Orientierungsmedien

Für die Anforderungen an die Messung der verschiedenen Substanzklassen existieren eine Vielzahl an Orientierungsmedien (s. Tabelle 6.1). Meist werden bei den Messungen von kleinen bis mittelgroßen Molekülen polyvinylacetat-, polystyrol- oder polyacrylnitrilbasierte Polymere sowie Biopolymere wie Gelatine oder Carageen eingesetzt. Die Orientierung mittels gel-basierter Medien kann mithilfe von Streckapparaturen durchgeführt werden, welche die entsprechende Skalierung der anisotropen Parameter innerhalb einer einzigen Probe ermöglichen. Die Diskriminierung von Enantiomeren bzw. die Bestimmung des Enantiomerenüberschusses ist innerhalb derselben Probe möglich. Allerdings gibt es nur eine begrenzte Auswahl an chiralen Orientierungsmedien für bestimmte Lösungsmittel zur Unterscheidung von Enantiomeren.^{120, 132–134}

Tabelle 6.1: Übersicht über Orientierungsmedien, welche für verschiedene Lösungsmittel eingesetzt werden können.

Polymergele	Kompatibilität	Beschreibung	Ref.
Poly(acrylamid)	D ₂ O		116, 135
Poly(acrylnitril)	DMSO, DMF		110
Gelatine	D ₂ O	chiral	119
e ⁻ -Gelatine	D ₂ O, DMSO	chiral	119
Gellan Gum	D ₂ O, DMSO	chiral	136
Poly(vinylacetat)	CDCl ₃ , CD ₂ Cl ₂ , CD ₃ OD, CD ₃ CN, DMSO, Dioxan, C ₆ D ₆ , THF, TFE, EtOAc, DMF, Aceton		111
Poly(ethylenoxid)	CDCl ₃ , CD ₂ Cl ₂ , CD ₃ OD, CD ₃ CN, Dioxan, DMSO, C ₆ D ₆ , DMF, EtOAc, THF, TFE, D ₂ O, Aceton	ein ¹ H/ ¹³ C NMR Signal	112

6.2.2 Chirale Moleküle

Neben der Strukturaufklärung und den Berechnungen von Moleküldynamiken können anisotrope NMR-Parameter auch für die Überprüfung von chiralen Substanzen genutzt werden. Für die Diskriminierung von Enantiomeren mittels gelbasierter Orientierungsmedien werden entweder die unterschiedlichen, quadrupolaren Aufspaltungen einer deuterierten Substanz oder die Differenz der chemischen Verschiebungsanisotropien gemessen,^{137–139} wobei entweder die helikale Struktur des Polymergels wie z. B. bei Gelatine oder dessen chirale Gruppe wie z. B. bei Polymergelen auf Polyacetylen-Basis auf unterschiedliche Art

und Weise mit den eingebrachten Enantiomeren interagieren.^{119, 132, 140, 141} Die Multipllettstrukturen der chiralen Moleküle spalten dabei unterschiedlich stark auf und durch Integration der jeweiligen Multipllettflächen kann auf den Enantiomerenüberschuss geschlossen werden (s. Abbildung 6.1).

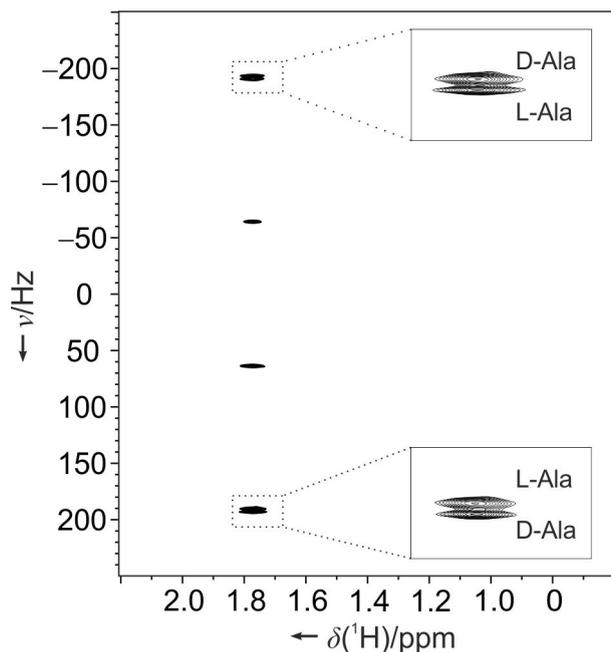


Abbildung 6.1: Diskriminierung von L- und D-Alanin in einer e^- -Gelatine/ D_2O Probe bei verschiedenen Streckungen. Mithilfe eines 2D J -BIRD^{*d,X*} HSQC Spektrum wurden die beiden Enantiomere unterschiedlich stark im Orientierungsmedium ausgerichtet.

6.2.3 Biomoleküle

Durch die Analyse von Biomolekülen mithilfe von anisotropen NMR-Parametern können wertvolle Strukturinformationen zur Konformation und Konfiguration gewonnen werden. Bei der partiellen Orientierung von Biomakromolekülen (>30 kDa) sind im Vergleich zur Orientierung kleiner organischer Moleküle andere Geleigenschaften von Bedeutung, da diese meist nur langsam in die engmaschigen Gelmatrices diffundieren.^{135, 142–144} Für gelbasierte Orientierungsmedien muss daher entweder der Polymeranteil im Gel gering gehalten werden oder das Biomolekül muss bereits vor der Gelpräparation mit dem Polymer vermischt werden.

Weiterhin kann entweder eine zu starke Orientierung oder eine Aggregation der gemessenen Moleküle zu einer Linienverbreiterung in den Spektren führen. Daher wurden gezielt erste Orientierungsmedien mit geringer Orientierungsstärke zur Bestimmung der räumlichen Struktur von ^{15}N , ^{13}C -isotopenmarkierten Proteinen in wässriger Lösung entwickelt.¹¹² Trotz der großen Anzahl an verschiedensten Orientierungsmedien ist es äußerst schwie-

rig, sehr große Makromoleküle (>30 kDA) oder makromolekulare Komplexe genügend schwach zu orientieren.¹¹⁹ Die Entwicklung von Gelen mit geringer Orientierungsstärke ist hier weiter anzustreben.

6.2.4 Extentionsfaktor

Eine partielle Orientierung durch gestreckte Gele mithilfe einer Streckapparatur bietet die Möglichkeit, anisotrope NMR-Parameter zu skalieren. Beliebige Streckungen können an derselben Probe durchgeführt werden, wodurch die Probenpräparation effizienter wird. Um Streckungen und die jeweils gemessenen, anisotropen Parameter vergleichen zu können, wird die Gellänge des gestreckten und ungestreckten Gels zunächst subtrahiert und anschließend durch die Gellänge des ungestreckten Gels dividiert. Der erhaltene Wert wird als Extentionsfaktor Ξ bezeichnet (s. Gleichung 6.1). Durch die Angabe der Konzentration, welche bei der Präparation des Gels eingesetzt wurde und der unterschiedlichen Orientierungsstärken der einzelnen Extentionsfaktoren können entsprechende Kopplungskonstanten für ähnliche Moleküle abgeschätzt werden.

$$\Xi = \frac{\text{gestrecktes Gel [mm]} - \text{ungestrecktes Gel [mm]}}{\text{ungestrecktes Gel [mm]}} \quad (6.1)$$

6.3 Gellan Gum

Gelbasierte Medien sind entweder synthetischen oder biologischen Ursprungs. Das jeweilige Medium zeichnet sich durch bestimmte Lösungs- und Quelleigenschaften aus. Diese Eigenschaften machen eine Untersuchung von Molekülen möglich, welche ähnliche Eigenschaften wie das Orientierungsmedium besitzen. Manche Gelbildner wie e^- -Gelatine, Kollagen oder Carrageen bilden eine chirale Sekundärstruktur aus und finden als chirale Orientierungsmedien Verwendung.^{132,145-149} Die eingebrachten Enantiomere interagieren auf verschiedene Art und Weise mit dem chiralen Medium und werden daher unterschiedlich orientiert. Dies wurde u. a. von Courtieu *et al.* für flüssigkristalline Phasen untersucht und ursprünglich zur Enantiomerenunterscheidung verwendet.^{139,150,151}

Gellan Gum ist ein durch *Sphingomonas elodea* sezerniertes, extrazelluläres, anionisches Heteropolysaccharid, welches vor allem in der Lebensmittelindustrie als Geliermittel genutzt wird. Die Firmen Koltec[®] und Merck[®] entwickelten Gellan Gum, um ein zu Gelatine äquivalentes Geliermittel zu verkaufen.¹⁵²⁻¹⁵⁴

Im Allgemeinen besteht Gellan Gum aus repetitiven Zuckereinheiten von Glucose, Rhamnose und Glucuronsäure im Verhältnis 1:2:1.¹⁵⁵ Gellan Gum ist eine Bezeichnung eines Fermentationsproduktes aus einer gering (LA) und stark (HA) acylierten Komponente (s. Abbildung 6.2). Beide Formen besitzen zwar gelbildende Eigenschaften, unterscheiden sich jedoch wesentlich darin, wodurch die Gelierung ausgelöst wird.

LA Gellan Gum bildet feste und spröde Gele, welche zur Gelierung auf eine Kationenkonzentration von bis zu 0.1 Gew.-% angewiesen sind. Sowohl monovalente Kationen wie z. B. K^+ und Li^+ , als auch bivalente Kationen wie Mg^{2+} und Ca^{2+} können hierzu verwendet werden, wobei die Gelstärke bei Verwendung von bivalenten Kationen grundsätzlich größer ist.

HA Gellan Gum hingegen geliert beim Abkühlprozess ohne Anwesenheit von Kationen aus. Die Gelbildung tritt dabei sofort nach Erreichen der Gelierungstemperatur von 70 °C ein und wird als "snap"-Gelierung bezeichnet.¹⁵⁶ Durch diese Eigenschaft ist bei der Präparation von Gelen unbedingt auf ein Arbeiten über der Gelierungstemperatur zu achten, um ein frühzeitiges Gelieren zu verhindern. Außerdem kann der Gelierungs- und Schmelzpunkt bis zu 70 °C auseinander liegen, je nachdem welcher Gellan Gum Typ bzw. welche Menge an Kationen eingesetzt werden. Gewöhnlich liegt der Gelierungspunkt zwischen 50–70 °C bzw. der Schmelzpunkt bei 90–120 °C. Diese Hysterese ist bei Gellan Gum deutlich stärker ausgeprägt als bei Gelatine. Gellan Gum bildet wie Gelatine Doppelhelices, wobei die einzelnen Polysaccharidketten halbversetzt angeordnet sind und durch intermolekulare Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrücken stabilisiert werden.¹⁵⁷

Eine besondere Eigenschaft von Gellan Gum im Vergleich zu anderen Gelbildnern ist die geringe Gelkonzentration, sowie die pH-Wert- und Temperaturstabilität. Für die Präparation eines festen Gels von LA Gellan Gum z. B. ist eine Menge von 0.1 Gew.-% ausreichend. Über verschiedene Mischungsverhältnisse von HA und LA Gellan Gum können Gele mit sehr unterschiedlichen Geleigenschaften hergestellt werden (s. Kapitel 7).¹⁵⁵

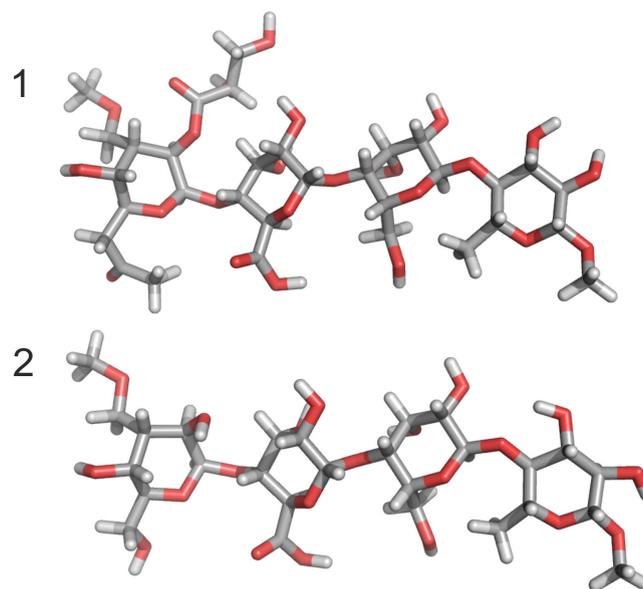


Abbildung 6.2: Struktureller Aufbau von Gellan Gum, welches aus den Untereinheiten Glucose, Rhamnose und Glucuronsäure besteht. Im Gegensatz zur acylierten Form (HA) ist die deacylierte (LA) an den entsprechenden Hydroxygruppe nicht acyliert und weist daher andere Eigenschaften auf.

7. Material und Methoden Teil 2

7.1 Chemikalien, Geräte, Medien

Cytochrom c	Carl Roth GmbH
D-Alanin	Degussa-Hüls
D-Prolin	Degussa-Hüls
Deuteriumoxid	99.9%, Deutero; Eurisotop
Dinatriumhydrogenphosphat	Na_2HPO_4 , Fluka
Einmalspritzen	Inject, B. Braun, 0.01–1 mL, B. Braun
Falcon	Falcon Tubes, 50 mL, 15 mL
Gellan Gum	COLLSTAB [®] HA, COLLSTAB [®] LA
Heizblock	AccuBlock TM , D1100 und D1200
Hyaluronidase	Carl Roth GmbH
L-Alanin	Degussa-Hüls
L-Prolin	Degussa-Hüls
Lysozym	Carl Roth GmbH
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH
Methanol	Carl Roth GmbH
Natriumazid	Carl Roth GmbH
Natriumchlorid	Fisher Scientific

NMR-Spektrometer	600 MHz Avance III, Bruker
NMR-Spektrometer	600 MHz Avance I, Bruker
Parafilm	Laboratory film, American National Can
Pasteurpipetten	Wilmad Lab Glass
pH-Elektrode	WTW SenTix 41
pH-Papier	Macherey-Nagel GmbH & Co KG
Pinzette	Carl Roth GmbH
Pipetten	Research [®] Pipette Eppendorf, autoclavable
Pipettenspitzen	Finnpipette, Rainin, Sarstedt
Probenköpfe	600 MHz ¹ H, ¹³ C, ¹⁵ N-TCI-Cryo- und TBI-Probenkopf von Bruker
Reinstwasseranlage	Millipore
Salzsäure 30%	Carl Roth GmbH
Saugflasche	Carl Roth GmbH
Siebgewebe	F. Eckert GmbH, PA-150 38, MW 150 µm
Silikonschlauch	Lindemann ($\varnothing_{au\beta en} = 4$ mm), Medical Grade
Spatel	Carl Roth GmbH
Standard-NMR-Röhrchen (5 mm)	WG-5 mm
Streckapparatur	Hausanfertigung
Teflonband	Carl Roth GmbH, PTFE Thread Seal Tape
Teflonschlauch	DuPont
Teflonstopfen	Hausanfertigung
Trockenschrank	600, Memmert
Vortexer	Genie K-550-GE, Bender und Hobein AG
Waagen	Sartorius M2P/CP64/analytic
Zentrifugen	centrifuge 5418/5702, eppendorf
Magnesiumsulfat	Carl Roth GmbH
Flüssigstickstoff	Air Liquide
Methanol-d ₄	Eurisotop

7.1.1 NMR-Lösungsmittel für Proteine

Das Lösungsmittel enthielt im Mischungsverhältnis 90:10 die Komponenten H_2O und D_2O . Der pH-Wert wurde bei $23\text{ }^\circ\text{C}$ auf pH 4.6 mit $0.1\text{ g}/10\text{ mL}$ Natriumdihydrogenphosphat eingestellt.

7.1.2 Streckapparatur

Die verwendete Streckapparatur wurde von Kuchel *et al.* eingeführt und von Kummerlöwe *et al.* weiterentwickelt.^{115,119} Die Justierung des Schlauches in verschiedenen Positionen ermöglicht es, Gele regulierbar zu strecken oder zu stauchen (s. Abbildung 7.1, Bild 2). Dadurch lässt sich der Grad der Orientierung bei jeder Probe im gewünschten Maß einstellen und verändern. Der prinzipielle Aufbau der Streckapparatur setzt sich aus einem NMR-Standardröhrchen mit abgeschliffenem Boden, einem Stück Silikonschlauch, einem Teflonstopfen und einer Fixierung zusammen (s. Abbildung 7.1, Bild 1).

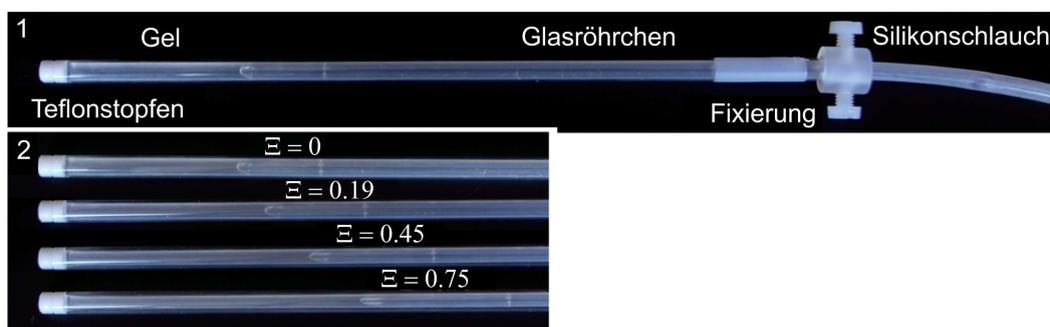


Abbildung 7.1: Darstellung des Aufbaus der Streckapparatur (1) und der Streckungen des verwendeten Silikonschlauchs bei unterschiedlichen Extensionsfaktoren (2).

7.2 Gelpräparationsmethode 1

Es wurden zwei Protokolle zur Herstellung von Gellan Gum Gelen als Orientierungsmedium in dieser Arbeit verwendet. Das erste Protokoll ist an die literaturbekannte Probenpräparation für die Herstellung von Gellan Gum Gelen mit einer Konzentration bis 1.5% angelehnt.¹³³ Auf diese Weise können ebenfalls Gele mit einem DMSO-Anteil von bis zu 60% hergestellt werden. Bei Gelen mit einem Gehalt an DMSO von über 60% werden für die Präparation getrocknete Gellan-Gum-Polymerstäbchen eingesetzt (s. Abschnitt 7.3, 7.4 und 7.5). Im Folgenden wird die Gelpräparationsmethode 1 beschrieben.

- Beide Gellan-Gum-Komponenten (HA/LA) werden in einem Eppendorftube gleichmäßig in kaltem D_2O bzw. der entsprechenden Mischung $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO-d}_6$ durchmischt

- Das Eppendorfgefäß wird auf 90 °C in einem Heizblock erhitzt und immer wieder geschüttelt (Vorsicht heiß; Deckel kann sich öffnen), um das Gellan Gum gleichmäßig zu verteilen
- Zeitgleich wird die Streckapparatur bis auf die Fixierung und den Teflonstopfen im Trockenschrank ebenfalls auf 90 °C erhitzt
- Die flüssige Mischung wird mittels einer Einwegspritze zügig in den Silikonschlauch gefüllt, dieser mit einem Teflonstopfen versehen und die Streckapparatur aufgebaut
- Anschließend wird sie an beiden Enden mit Teflonband umwickelt, um das Verdunsten des Lösungsmittels zu verhindern
- Die Streckapparatur wird dann abwechselnd im Trockenschrank erhitzt und anschließend kurz zentrifugiert, um Luftblasen zu entfernen
- Nachdem das Gemisch Blasenfrei ist, wird die Probe mit einer Salz-Lösung überschichtet (100 mM NaCl oder 50 mM MgCl₂ als Endkonzentration im Gel)
- Die Probe wird dann für 12 h bei 4 – 8 °C gelagert, um die Gelierung zu gewährleisten, welche bei der LA-Komponente über die Zugabe von Kationen, bei der HA-Komponente über die Abkühlung erfolgt.

Die Gele wurden direkt nach der Gelierung verwendet. Temperaturstabile Substanzen (bis 95 °C) können vor der Präparation in D₂O gelöst werden oder nach der Gelierung in das Gel durch Überschichtung mit anschließender Zentrifugation (≤ 2000 rpm) eingebracht werden. Es ist bekannt, dass die Zugabe von großen Mengen an Sucrose, Proteinen oder Aminosäuren die Gelelastizität erhöht. Dementsprechend wird das Gel, je nach Menge des zu untersuchenden Moleküls, voraussichtlich ebenfalls elastischer.

7.3 Gelpräparationsmethode 2

Die zweite Gelpräparationsmethode wurde in dieser Arbeit entwickelt, wobei Gele nun mit Konzentrationen $>1,5\%$ präpariert werden können. Die Gellan-Gum-Gele können entweder direkt nach der Gelierung verwendet werden oder sie dienen der Herstellung von Stäbchen. Temperaturstabile Substanzen (bis 90 °C) können vor der Präparation im Lösungsmittel, temperaturinstabile nach der Gelierung durch Zentrifugation (bis 120 min ≤ 2800 rpm) oder durch Quellen der Stäbchen in Lösung eingebracht werden. Die Präparationsmethode ist für Gellan-Gum-Konzentrationen von 1.2 % bis 40% geeignet. Sie kann mit DMSO-Konzentrationen von bis zu 60% durchgeführt werden. Für die Verwendung

von 100% DMSO werden die Stäbchen in 100% DMSO gequollen. Im Folgenden wird die Gelpräparationsmethode 2 näher beschrieben.

- Beide Gellan-Gum-Komponenten werden in einem Eppendorftube abgewogen und auf ein Stück Parafilm gegeben (s. Abbildung 7.2, Bild 1)
- Das Pulver wird im trockenen Zustand gemischt und vorsichtig mit der Menge an H_2O (zur Stäbchenherstellung), D_2O oder der Mischung $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO-d}_6$ überzogen (s. Abbildung 7.2, Bild 2)
- Es folgt das Vermengen der Masse mit einem Spatel. Eine gute Durchmischung ist notwendig, damit beide Komponenten homogen im Gel vorliegen (s. Abbildung 7.2, Bild 3).
- Die Mischung wird mithilfe des Spatels in eine Einmalspritze (1 mL) gefüllt und in den Silkschlauch gepresst (s. Abbildung 7.2, Bild 4 und 5)
- Anschließend wird die Streckapparatur aufgebaut und mit Teflonband versehen, um ein Austrocknen zu verhindern (s. Abbildung 7.2, Bild 6 und 7)
- Die Streckapparatur wird zwischen 30 bis 120 min, je nach Gelkonzentration zentrifugiert (2000 rpm; Vorsicht, Glas kann brechen), um Blasen zu entfernen (s. Abbildung 7.2, Bild 8)
- Nachdem das Gemisch blasenfrei ist, wird die Probe je nach Gellan-Gum-Gesamtkonzentration für ca. 5 bis 30 min in den Trockenschrank bei $90\text{ }^\circ\text{C}$ gestellt. Bei diesem Schritt ist es wichtig, die Probe immer wieder zu kontrollieren, da durch das Erhitzen Blasen im Gel entstehen können.
- Sobald die Probe erhitzt und blasenfrei ist, wird sie mit einer MgCl_2 -Lösung überschichtet. Bei Gelen bis 10% wird eine Konzentration von 100 mM NaCl oder 50 mM MgCl_2 verwendet. Bei Gelen über 10% wird eine Konzentration von 200 mM NaCl oder 100 mM MgCl_2 eingesetzt (s. Abbildung 7.2, Bild 9)
- Die Probe wird anschließend für 12 bis 168 h (je nach Konzentration) bei $4 - 8\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert, um die Gelierung zu gewährleisten
- Die verwendeten Mischungsverhältnisse sind in Tabelle 1 angegeben

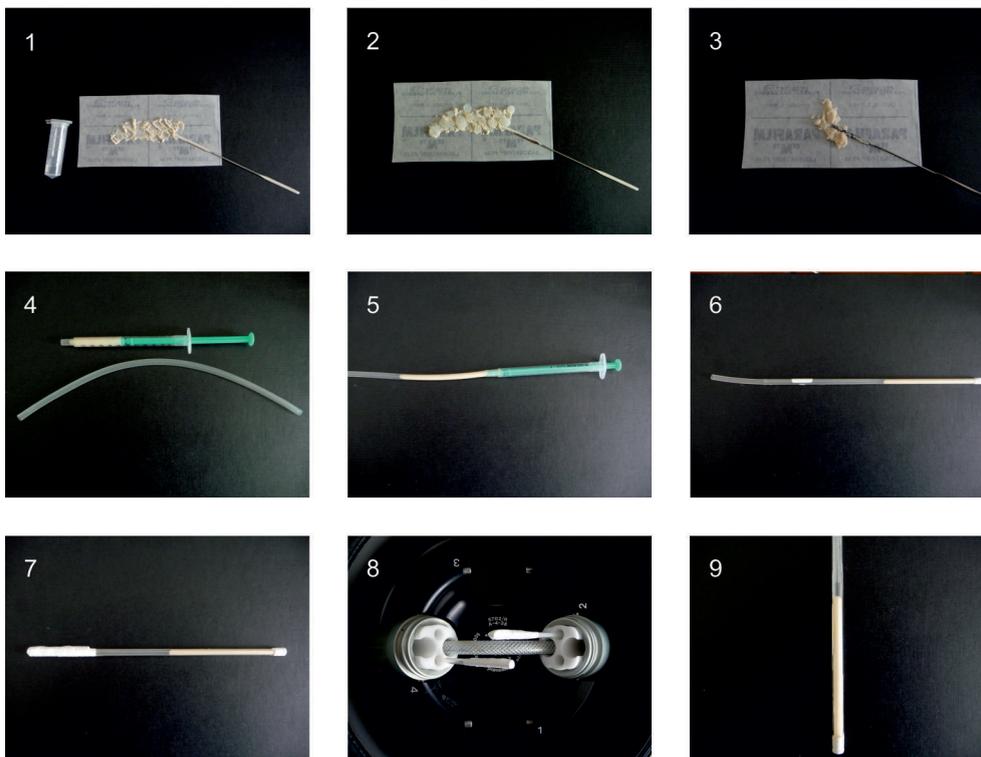


Abbildung 7.2: In neun Bildern wird schrittweise die Präparationsmethode für die Herstellung von Gellan-Gum-Polymerstäbchen beschrieben (s. Abschnitt 7.3)

Tabelle 7.2: Übersicht über die Mischungsverhältnisse, welche in dieser Arbeit hauptsächlich verwendet wurden. Das Mischungsverhältnis bezieht sich auf LA/HA. Die Mischungsverhältnisse wurden nicht bei allen prozentualen Gewichtsanteilen durchgeführt, da die Gele je nach Mischungsverhältnis (MV/[mg/mL]) zu spröde oder zu weich wurden. Die Proben wurden jeweils mit 500 μL D_2O , $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO-d}_6$ oder H_2O angesetzt.

MV [%]	1:12 [mg]	1:16 [mg]	1:20 [mg]
2.5	0.96:11.54	0.74:11.76	–
5	1.92:23.08	1.48:23.52	–
7.5	2.88:43.62	2.22:35.28	1.8:35.7
10	3.84:46.16	2.96:47.04	2.4:47.6
12.5	–	3.7:58.8	3.0:59.5
15	–	4.44:70.56	3.6:71.4
20	–	–	4.8:95.2
30	–	–	7.2:142.8
40	–	–	9.8:190.4

7.4 Stäbchenpräparation

Für die Herstellung von Gellan-Gum-Stäbchen werden die gelierten Gele aus Abschnitt 7.3 zur weiteren Präparation verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten Stäbchen enthielten eine Gellan-Gum-Konzentration von 1.2-40%.

- Die für die Stäbchenherstellung präparierten Gele können anstatt mit D₂O, mit bidestilliertem Wasser angesetzt werden. Die Verwendung von deionisiertem Wasser ist notwendig, da die Gelierung der LA-Komponente durch Kationen erfolgt, eine vorherige Zugabe jedoch die Präparationstemperatur auf bis zu 121 °C erhöht. Durch eine vorherige Ionenbeimengung kann die Präparation demnach nicht mehr nach den hier angegebenen Schritten beschrieben werden
- Die Gele werden aus dem NMR-Röhrchen gezogen und der Silikonschlauch der Streckappatur vorsichtig, ohne das Gel zu beschädigen, zerschnitten
- Das Gel wird mithilfe einer Rasierklinge oder Skalpells in die gewünschte Größe geschnitten
- Die Gelstücke werden anschließend in ca. 5 mL Methanol gegeben und solange darin getrocknet bis kein Wasser mehr aus dem Gel tritt (ca. 2 h)
- Das Gel ist nun sehr hart und es muss darauf geachtet werden, dass es bei der nun folgenden Überführung in ein Probenglas (1 mL) nicht zerbricht
- Das Gel wird im Gläschen bis zur vollständigen Trocknung bei Raumtemperatur getrocknet (1 h bis 2 Tage)
- Das trockene Stäbchen kann nun in einem geschlossenen Gefäß bis zur Verwendung aufbewahrt werden (ca. 6 Monate)

7.5 Probenpräparation mit Stäbchen

- Die Streckappatur wird ohne Gel zusammengesetzt und das Stäbchen darin platziert.
- Auf das Gel wird das gewünschte Lösungsmittel (D₂O oder DMSO) und die darin enthaltene Substanz gegeben. Falls D₂O verwendet wird, muss eine Endkonzentration an Kationen von 50 bis 100 mM (je nach Gellan-Gum-Gesamtkonzentration) zugegeben werden, da durch die Stäbchenpräparation Ionen zum Teil ausgewaschen wurden. Die MgCl₂ Menge für die Präparation von DMSO-Gelen beträgt 1.2 mg

MgCl₂ in 250 µL DMSO. Ohne die entsprechende Kationenmenge ist das Gel nicht stabil

- Das Gel wird je nach Stabilität der zu untersuchenden Substanz bei 4 – 25 °C gequollen und anschließend in der Streckapparatur verwendet. Die Quellzeit beträgt für 2%ige Gele ca. 2 h, für 40%ige bis zu 7 Tage

7.6 Gellan-Gum-Reinigung

Für die Aufreinigung des Gellan-Gum-Pulvers (HA) wurde eine Vorrichtung aus zwei Falcon-Tubes verwendet, um durch Siebung die groben Schmutzpartikel zu entfernen. Dabei wird ein Siebgewebe mit einer Maschenweite von 150 µm verwendet, wobei das Gellan-Gum-Pulver nur durch schütteln mithilfe des Vortexers durch das feine Gewebe gesiebt werden konnte. Im Folgenden wird die Reinigung des Gellan-Gum-Pulvers beschrieben.

- Für die Vorrichtung werden zwei Falcon Tubes verwendet, wobei bei einem der Boden entfernt und der Deckel mit dem Siebgewebe entsprechend präpariert wird (s. Abbildung 7.3, Bild 1 und 2)
- Das Gellan Gum Pulver wird vom abgetrennten Boden her in das präparierte Tube mit eingeschraubtem Siebgewebe gefüllt (s. Abbildung 7.3, Bild 3 und 4). Der Deckel bei diesem Tube wurde mit einem Loch versehen. Darunter wird durch Parafilm das geöffnete, zweite Falcon-Tube (nicht präpariert) befestigt, so dass zwischen beiden Tubes das Siebgewebe platziert ist
- Durch Rütteln auf dem Vortexer wird das Pulver durch das Sieb in das untere Tube geschüttelt
- Das so gereinigte Pulver kann wie oben beschrieben verwendet werden (s. Abschnitt 7.2 und 7.3)

7.7 Substanzrückgewinnung am Beispiel von Ubiquitin

- Das Gel mit dem ¹⁵N-markierten Ubiquitin wurde mit Überstand in ein 15 mL Tube überführt und mit 15 mL bidestilliertem Wasser aufgefüllt
- Anschließend wurde es für 12 h bei 4 – 8 °C gelagert
- Der Überstand wurde abgenommen, gegen frisches bidestilliertes Wasser ausgetauscht und für weitere 2 h bei 4 – 8 °C gelagert

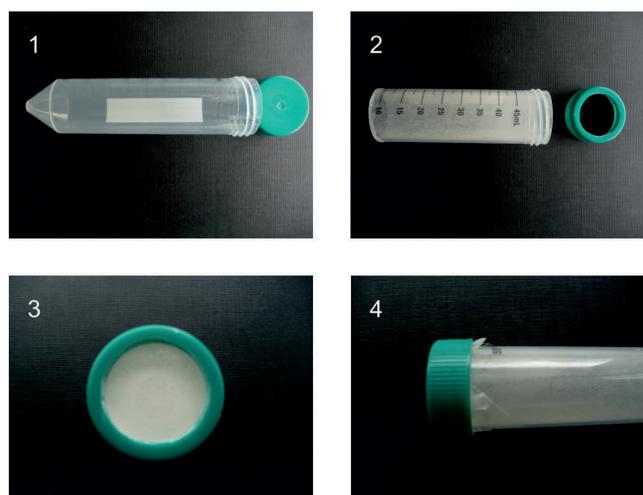


Abbildung 7.3: In vier Bildern wird schrittweise die für die Aufreinigung verwendete Vorrichtung gezeigt.

- Das Gel war sichtbar aufgelöst, so dass der Überstand abzentrifugiert werden konnte
- Die Überstände wurden lyophilisiert, in H₂O/D₂O (90:10) aufgenommen und NMR spektroskopisch untersucht

7.8 NMR-Experimente

7.8.1 *J*-BIRD^{d,X}-HSQC

Die Aufnahme von ²H-1D-Spektren ermöglicht die Messung von Deuteriumsignalen der in der Probe enthaltenen, deuterierten Lösungsmittel. In Proben biologischen Ursprungs wird hierfür häufig D₂O verwendet. Wird eine Gelprobe gestreckt, erhält das Gelnetzwerk eine Vorzugsrichtung. Durch diese Vorzugsrichtung werden die im Gel gelösten Substanzen ebenfalls orientiert. Eine Ausrichtung des D₂O im Gelnetzwerk führt zu einer quadrupolaren Aufspaltung und ist ein Kriterium zur Einschätzung der Verwendbarkeit als Orientierungsmedium.

Strukturinformationen können über anisotrope und isotrope Parameter gewonnen werden. Isotrope Parameter sind z. B. skalare Kopplungen wie ¹J_{CH}-Kopplungen und werden in der hochauflösenden NMR-Spektroskopie beobachtet. Anisotrope Parameter sind z. B. dipolare Kopplungen wie ¹D_{CH}-Kopplungen, welche in der Festkörper-NMR-Spektroskopie sowie durch eine partielle Orientierung messbar werden. Zur Messung dipolarer Kopplungen werden spezielle Experimente, mit welchen anisotrope Parameter wie RDCs oder RCSAs erhalten werden, aufgenommen.

Eine Enantiomerenunterscheidung durch Messung von z. B. RDCs kann mithilfe von gestreckten, chiralen Gelen erfolgen. Die Enantiomere werden durch eine Vorzugsrichtung

im Gelnetzwerk ausgerichtet, wobei das jeweilige Enantiomer mit dem chiralen Polymerstrang unterschiedlich stark interagiert. Bei unterschiedlichen Extensionsfaktoren, von chiralen Gelen als Orientierungsmedium, werden J -BIRD d,X -HSQC-Experimente durchgeführt anhand derer nach erfolgreicher Orientierung der Enantiomere unterschiedlich starke Kopplungen abgelesen werden können. Die skalaren und dipolaren CH-Kopplungen werden hierbei oft in der indirekten Dimension gemessen, da hier die Linienbreite aufgrund längerer Relaxationszeiten, meist schmaler als in der direkten ^1H -Dimension sind. Zusätzlich zur heteronuklearen Entkopplung ist ein BIRD d,X -Element in der indirekten Dimension eingebaut, welches weitreichende skalare und dipolare Kopplungen unterdrückt, so dass eine Auswertung der Spektren mit einem minimalen Multiplett erfolgen kann (s. Abbildung 7.4).

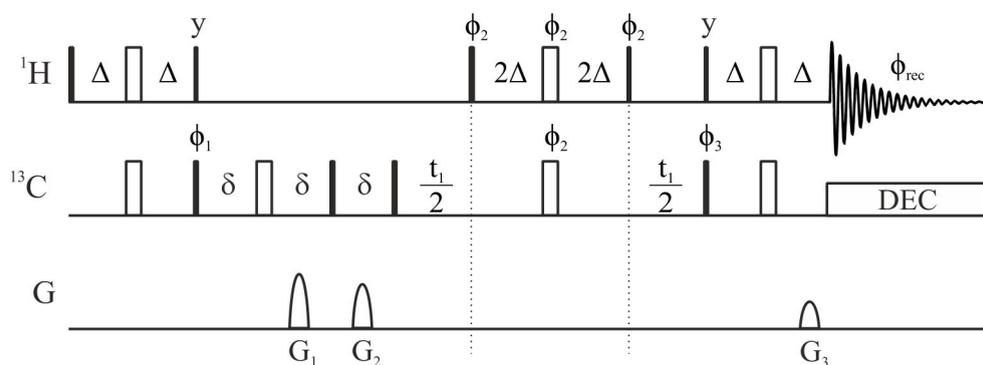


Abbildung 7.4: Darstellung eines J -BIRD d,X -HSQC-Experiments. δ = delay, abhängig von angewendeten Gradienten; $\Delta = 0.5(^1T_{CH})^{-1}$; Phasen: $\Phi_1 = x, -x$; $\Phi_3 = 2(x), 2(-x)$; $\Phi_6 = 4(y), 4(-y)$; $\Phi_{rec_4} = x, -x; x, -x, -x, x, -x, x$. Die Gradienten müssen das Verhältnis $G_1:G_2:G_3 = 80:30:20.1$ für den für Kohlenstoff erfüllen

7.8.2 CLIP-HSQC

Für die Extraktion der dipolaren Kopplungen wurde ein 2D CLIP HSQC-Experiment verwendet (s. Abbildung 7.5). Die anisotropen Parameter sowohl kleiner Moleküle wie Norcampher sowie von Proteinen wurden gemessen, mithilfe des Simulationsprogramms PALES die entsprechenden NMR Parameter zurückberechnet und mit den experimentellen Daten verglichen. Dabei wurden neben dem Cornilescu Faktor Q und der Pearson Korrelation R erhalten.

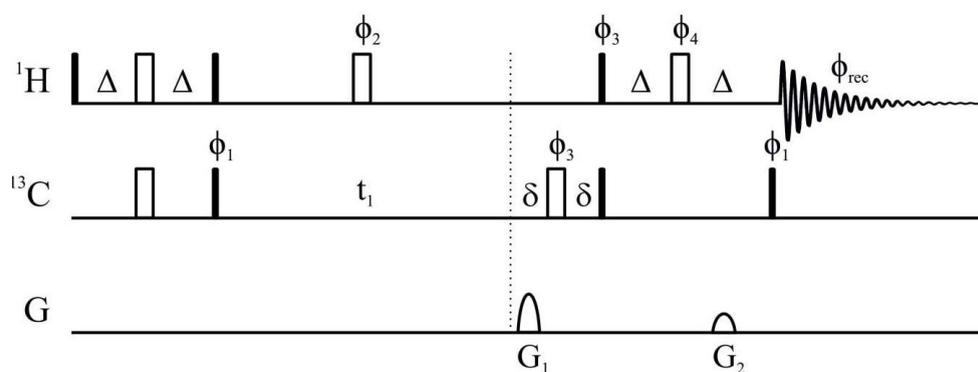


Abbildung 7.5: Darstellung eines CLIP-HSQC- Experiments, welches zur Detektion von rein absorptiven, inphase Signalen von $^1T_{CH}$ Kopplungskonstanten verwendet wird. Phasen: $\Phi_1 = x, -x$; $\Phi_2 = 4(x), 4(-x)$; $\Phi_3 = x, x, -x, -x$; $\Phi_4 = x, -x$; $\Phi_{\text{rec}_4} = -x, x, x, -x$. Die Gradienten müssen das Verhältnis $G_1:G_2 = 80:20.1$ für den Kohlenstoffkern erfüllen.

8. Ergebnisse Orientierungsmedien

8.1 Etablierung als Orientierungsmedium

Gellan Gum ist ein hauptsächlich in der Lebensmittelindustrie verwendetes Geliermittel, welches mit Konzentrationen bis etwa 1.5% benutzt wird. Es besteht aus zwei Komponenten, welche unterschiedliche Geleigenschaften hervorrufen (s. Kapitel 6). In Abhängigkeit vom Mischungsverhältnis der Komponenten, der Präparation, der Art und Menge an zugegebenen Kationen, sowie der Zugabe von Additiven wie Aminosäuren wurden in dieser Arbeit Gele mit vielfältigen Eigenschaften als Orientierungsmedium für die Anwendung in der hochauflösenden NMR-Spektroskopie eingeführt. Die hier gezeigten Ergebnisse beinhalten die Einführung, Weiterentwicklung und Optimierung von Gellan-Gum-Gele für die Gewinnung von anisotropen NMR-Parametern wie RDCs. Für die Einstellung der Orientierungsstärke wurden die Gele mit einer Streckapparatur, welche eine stufenlose Justierung der Streckung ermöglicht, ausgerichtet. Diese Streckapparatur wurde in vorhergehenden Arbeiten vorgestellt.¹¹⁹

Gellan-Gum-Gele wurden zunächst als Orientierungsmedium mit einer Mischung von LA:HA (1:9) und einer Konzentration von 0.6% eingeführt (s. Abbildung 8.1).¹³³ Problematisch für die Orientierung kleiner Moleküle war jedoch die geringe Konzentrierbarkeit durch das herkömmliche, lebensmitteltechnische Präparationsverfahren und die daraus resultierende geringe Orientierungsstärke. Ein erster Ansatz, die Orientierungsstärke zu erhöhen, war es, eine Verbesserung der Gelelastizität durch die Optimierung der Komponentenmischung zu erreichen. Zu diesem Zweck wurde die Elastizität der Gele bei den Mischungsverhältnissen 1:9 bis 1:20 getestet. Hierfür wurde 1 mL Gel mit den unterschiedlichen Mischungsverhältnissen und einer Gesamtkonzentration von 1% Gellan Gum hergestellt, um die Elastizität

manuell zu überprüfen. Des Weiteren wurde die für eine Orientierung notwendige, geringste Konzentration an Gellan Gum im Mischungsverhältnis 1:12 getestet. Sie betrug 0.5% mit einem MgCl_2 Gehalt von 1%. Ansätze mit Konzentrationen unter 0.5% im angegebenen Mischungsverhältnis bilden keine festen Gele, sondern Pasten. Ein Mischungsverhältnis der Gele von 1:12 bis 1:20 und eine Mindestkonzentration an 0.5% Gellan Gum ist zu empfehlen, da diese Gele elastischer sind und dadurch während der Anwendung weniger reißen. Das Mischungsverhältnis sollte an die Gellan-Gum-Gesamtkonzentration angepasst werden. Je höher die Gesamtkonzentration an Gellan Gum gewählt wird, desto höher sollte der HA-Anteil sein, da dieser für die Elastizität notwendig ist. Je niedriger jedoch die Konzentration der Gele ist, desto wichtiger ist eine Erhöhung des Anteils an LA, da dieser für die Stabilität und Festigkeit verantwortlich ist. Die in dieser Arbeit verwendeten Gesamtkonzentrationen mit den Mischungsverhältnissen sind dem Kapitel 7 zu entnehmen.

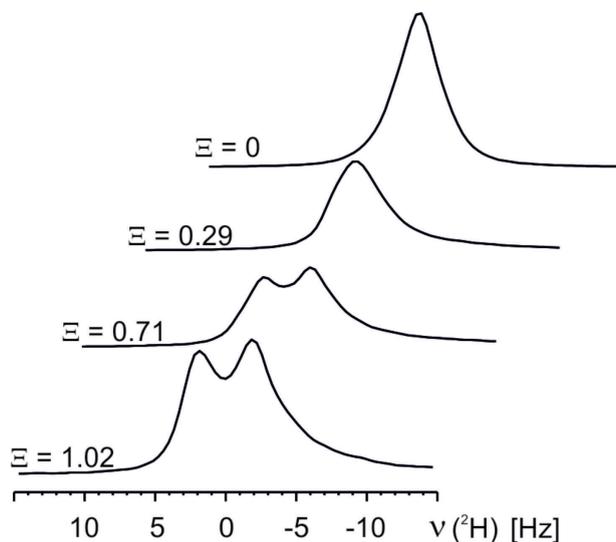


Abbildung 8.1: Gezeigt sind 1D ^2H Spektren eines Gellan-Gum-Gels nach unterschiedlichen Streckungen. Die jeweiligen Kopplungen wurden bei den Extensionsfaktoren $\Xi = 0$ (0 Hz), $\Xi = 0.29$ (0 Hz), $\Xi = 0.71$ (2.4 Hz) und $\Xi = 1.02$ (3.7 Hz) detektiert.¹³³

8.1.1 Messungen kleiner bis mittelgroßer Moleküle

Für die Optimierung der Orientierungseigenschaften wurde eine Präparationsmethode entwickelt, welche Gele mit bis zu 40% Gellan Gum ermöglichte. Mithilfe dieser Gele konnte eine höhere Orientierungsstärke erreicht und eine Unterscheidung des Enantiomergemisches L-/D-Alanin (2:1) durchgeführt werden. Die Präparation wurde anhand der 2. Präparationsvorschrift mit einer Gelkonzentration von 10% durchgeführt. Mithilfe dieser Mischung von L-Alanin und D-Alanin wurde schon zuvor gezeigt, dass eine Enantiomerendiskriminierung in Gelatine und Kollagen nach einer entsprechenden Orientierung stattfindet.

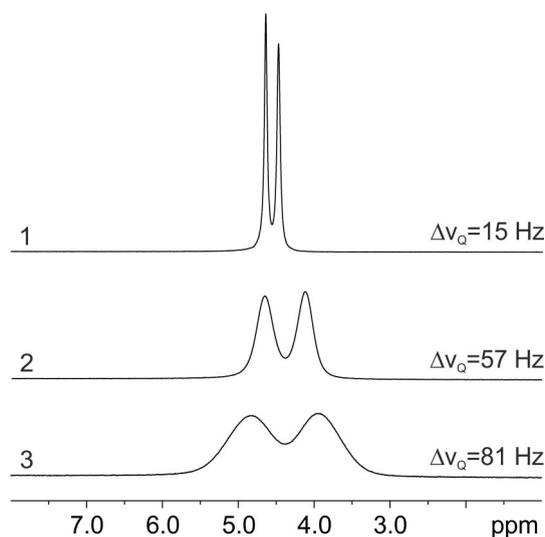


Abbildung 8.2: Gezeigt sind 1D ^2H Spektren von unterschiedlich stark konzentrierten Gellan-Gum-Proben, welche in deuteriertem Wasser gequollen sind. In den Bildern 1 bis 3 nimmt mit steigender Konzentration (2.5%, 7.5%, 12.5%) auch die quadrupolare Aufspaltung (15 Hz, 57 Hz, 81 Hz) bei gleichen Extensionsfaktoren zu

Da Gellan-Gum-Gele ebenfalls eine chirale Überstruktur besitzen, konnten die Enantiomere durch ihre unterschiedlichen Orientierungseigenschaften über $J\text{-BIRD}^{d,X}$ Experimente erfolgreich separiert werden (s. Kapitel 10).^{120,132,147}

Bei den bis dahin hergestellten Gelen konnte die zu untersuchende Substanz entweder vor der Präparation in Lösung eingebracht oder nachträglich durch Überschichtung der Probe in das Gel zentrifugiert werden. Diese Art der Präparation konnte jedoch nur bei temperaturstabilen Substanzen oder konzentrierten Lösungen durchgeführt werden. Sie schloss somit temperaturinstabile und gering konzentrierbare Proben zur Untersuchung aus. Eine Erweiterung der Methode machte die Herstellung von getrockneten Stäbchen notwendig, welche auch nach der Trocknung ihre Quell- und Orientierungseigenschaften behielten. Die Trocknung der Gele direkt nach der Präparation an der Luft, ergab jedoch Stäbchen, welche nicht wieder quollen. Erst eine Trocknung der Gele in Methanol ermöglichte die Herstellung von Stäbchen, welche nach der Verdunstung des Methanols wieder in D_2O und DMSO quollen (s. Kapitel 7).

Eine weitere Schwierigkeit war die Inhomogenität der Gele. Hiermit ist die Ungleichmäßigkeit der Gelbildung durch in dem Geliermittel befindliche Partikel gemeint. Trotz verbesserter Elastizität durch die Optimierung des Komponenten-Mischungsverhältnisses rissen die Gele häufig während der Streckung bzw. bei der Messung. Weiterhin beeinträchtigte die höhere Konzentrierung die Homogenität der Gele insoweit, dass eine deutliche Verbreiterung der NMR Signale detektiert wurde. Da der Hersteller keine fremdpartikelfreie

Variante anbieten konnte, wurde eine Methode zur Reinigung durch Sieben des Pulvers von groben Bestandteilen eingeführt (s. Kapitel 7). Hierfür ist ein spezielles Siebgewebe mit einer Porengröße von 150 μm notwendig. Die erhaltenen Gele zeigten eine Verbesserung hinsichtlich der Elastizität und Orientierungsstärke. Des Weiteren war die Streckung nun auch reversibel, da die Gele nicht mehr rissen.

8.1.2 Temperatur- und pH-Wert-Stabilität

Ein wie Gellan Gum ebenso einfach zu präparierendes, chirales Orientierungsmedium ist Gelatine. Diese hat jedoch den Nachteil, dass sie eine niedrige Schmelztemperatur besitzt und die Unterscheidung von Enantiomeren bei Messungen über 35 $^{\circ}\text{C}$ nicht möglich ist. Aus diesem Grund wurde e-Gelatine entwickelt, eine mit beschleunigten Elektronen vernetzte Gelatine, welche selbst bei höheren Temperaturen bis 55 $^{\circ}\text{C}$ über kurze Zeit stabil bleibt. Die Herstellung ist jedoch aufwendig und im Vergleich zu Gellan-Gum-Gelen mit hohen Kosten verbunden.¹⁴⁵ Daher wurden Gellan-Gum-Stäbchen auf ihre Temperatur- und pH-Wert-Stabilität hin überprüft. Da Gellan Gum nach Ausgelieren mit Salz eine hohe Schmelztemperatur aufweist (121 $^{\circ}\text{C}$) wurde es auf das Orientierungsverhalten während einer Erhitzung von 20 auf 60 $^{\circ}\text{C}$ hin getestet.¹⁵⁵ Für diesen Test wurde ein Enantiomengemisch aus 1 M L-/D-Prolin (1:2; w:w) in einer D_2O -Lösung mit NaOH präpariert (pH 11). Diese Lösung wurde auf ein 10% Gellan-Gum-Stäbchen (1:16) gegeben und zwei Tage bei 4 – 8 $^{\circ}\text{C}$ zur Quellung gelagert. Das Gel wurde mittels Silikonschlauch bis zu einer quadrupolaren Aufspaltung von $\Delta\nu_Q = 102$ Hz gestreckt und nacheinander zweimal in einem Intervall von 5 $^{\circ}\text{C}$ auf 60 $^{\circ}\text{C}$ erwärmt und wieder abgekühlt. Die Temperatur wurde vor jedem Start einer Messung für 10 min konstant gehalten, um eine entsprechende Äquilibration zu gewährleisten. Anschließend wurden ^2H -1D-Spektren aufgenommen, die quadrupolaren Kopplungen bestimmt und gegen die Temperatur aufgetragen. Das Gel zeigte sich äußerst stabil und blieb im Orientierungsbereich konstant, wobei bei Abkühlung eine ähnliche Ausgangskopplungsstärke erreicht wurde. Das Gel ist demnach temperaturstabil. Die gemessene Verringerung der Kopplungen während einer Erwärmung hat ihre Ursache in der Brownschen Molekularbewegung.¹⁵⁸ Das Gel wurde bei einem pH-Wert von 11 angesetzt und anschließend erhitzt, um dessen Stabilität zu überprüfen. Trotz dieser extremen Bedingungen blieb das Gel stabil, so dass eine Enantiomerenunterscheidung von L-/D-Prolin (nicht gezeigt) und L-/D-Alanin (nicht gezeigt) gelang.

Die Proben für die Messung von Ubiquitin wurden in einem Puffer mit einem pH-Wert von 4.6 angesetzt und waren über Wochen stabil, so dass mehrere Messungen durchgeführt werden konnten. Allerdings findet unter sauren pH-Werten ab pH 3,5 eine Hydrolyse von

Gellan Gum statt, so dass eine Messung in Lösungen mit einem pH-Wert $< \text{pH } 3.5$ nicht möglich sind.¹⁵⁵

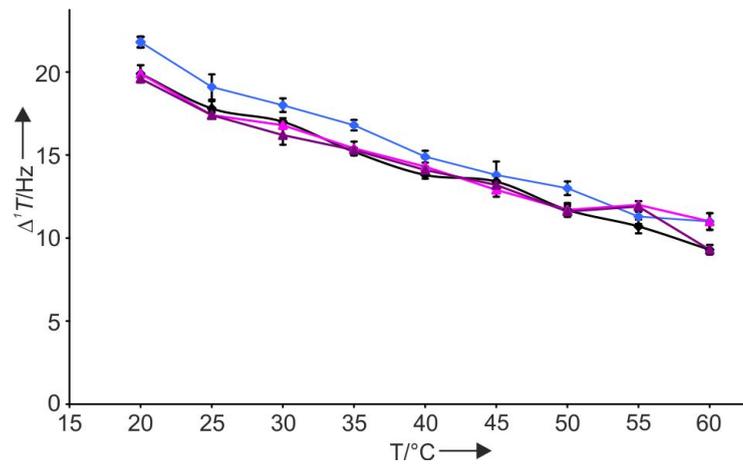


Abbildung 8.3: Diskriminierung von L-/D-Prolin in einem 10% Gellan-Gum-Gel. Das Gel wurde in einem Intervall von 5 °C auf 60 °C erwärmt und wieder auf 20 °C abgekühlt. Dies wurde wiederholt und die dipolaren Restkopplungen gegen die Temperatur aufgetragen. Die erste Erwärmung ist blau, die erste Abkühlung helllila, die zweite Erwärmung schwarz und die zweite Abkühlung dunkellila markiert

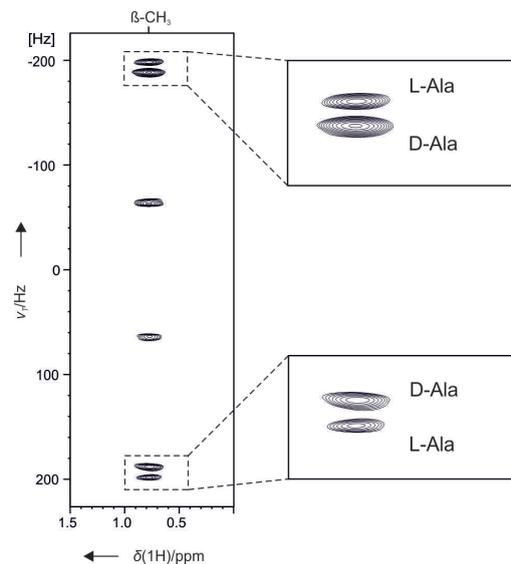


Abbildung 8.4: 2D $^1\text{H } ^{13}\text{C } J\text{-BIRD}^{d,X}\text{-HSQC}$ -Spektrum von L- und D-Alanin in 10% Gellan Gum. Durch unterschiedliche Orientierungen im Gel konnten die beiden Enantiomere voneinander getrennt detektiert werden.

8.1.3 Lösungsmittleigenschaften

Um die Quelleigenschaften von Gellan-Gum-Stäbchen zu überprüfen, wurden diese in verschiedenen Lösungsmitteln gequollen. Während die Stäbchen in Cyclohexan, THF, Chloroform, Ethanol, Aceton, Methanol, Acetonitril, DMF und Ethylenglycol nicht quollen, konnte in DMSO und D₂O eine Quellung beobachtet werden.

Für weitere Untersuchungen zu den Orientierungseigenschaften der Gele in DMSO wurde Norcamphor gewählt. Norcamphor ist ein kleines, bicyclisches Molekül, welches häufig als Testmolekül in der Strukturberechnung Verwendung findet. Für diese Messung wurde ein 15%iges Gellan-Gum-Gel (1:16) mit 1.2 mg MgCl₂ und 1 M Norcamphor angesetzt und für sieben Tage zur Quellung bei RT gelagert. Nach Aufnahme eines CLIP-HSQC wurden die RDCs abgelesen, über PALES mit einer geometrieoptimierten Modellstruktur verglichen und anschließend zurückberechnet (s. Abbildung 8.5). Aus den Daten wurde die Pearson-Korrelation R^2 mit 0.96 und der Cornilescu-Faktor Q mit 0.121 erhalten.

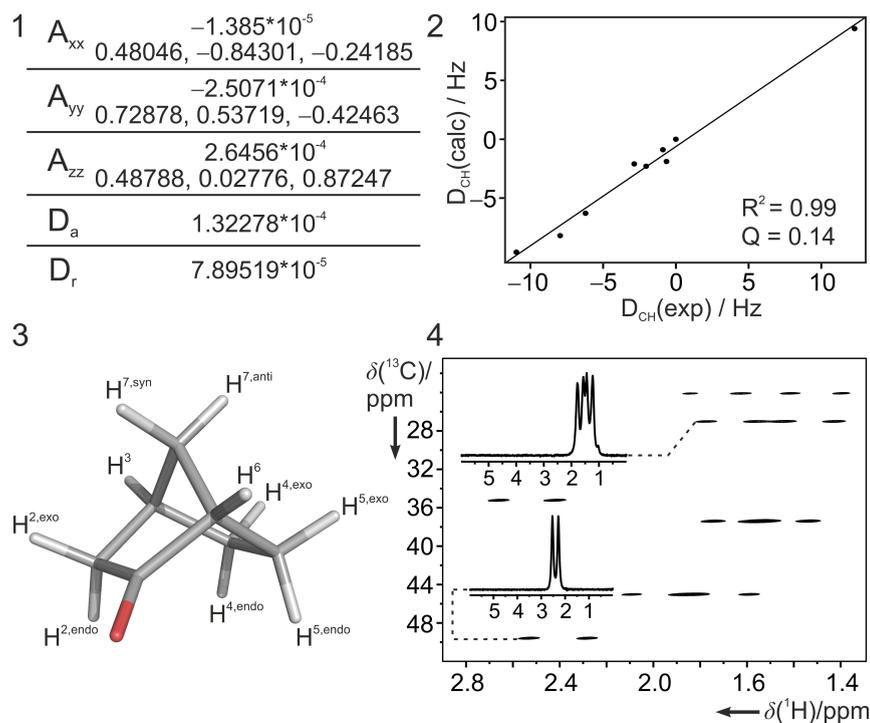


Abbildung 8.5: Gezeigt sind die gewonnenen Strukturinformationen des Testmoleküls Norcampher

8.1.4 Messungen von Makromolekülen

Die Verwendung von Orientierungsmedien für Makromoleküle ist ein wichtiger Aspekt der Strukturaufklärung im Bereich der hochauflösenden NMR Spektroskopie. Jedoch ist die hohe Mindestkonzentration der gängigen Geliermittel (Gelatine, Carrageen usw.) häufig hinderlich für die Auswertung, da die Orientierungstärke zu hoch ist. Da Gellan Gum in sehr geringen Mengen (0.5%) als Orientierungsmedium verwendet werden kann, wurden die Eigenschaften für die Orientierung großer Moleküle wie Proteine untersucht. Eine weitere positive Eigenschaft ist, dass Gellan Gum kein Protein ist und damit Interaktionen und Signalüberlagerungen mit den zu untersuchenden Proteinen gering sind. Auch bei Gelatine wurde die Eigenschaft als Orientierungsmedium für Proteine (Hyaluronidase, Cytochrom c) untersucht, jedoch konnten in keinem Experiment aufgrund breiter NMR-Signale verwertbare Daten gewonnen werden. Danach wurde optisch getestet, ob das intensiv rote Cytochrom c in das Gellan-Gum-Gel durch Zentrifugieren eindringen kann (s. Abbildung 8.6).



Abbildung 8.6: Durch Zentrifugation konnte beobachtet werden, wie Cytochrom c (11 kDa) schrittweise innerhalb von etwa 60 min in das präparierte Gellan-Gum-Gel diffundierte.

Des Weiteren wurde ^{15}N markiertes Ubiquitin in einem 2%igen Gellan Gum Gel gemessen (FAST HSQC) und die zurückberechneten RDCs gegen die gemessenen aufgetragen (s. Abbildung 8.7).

Als nächster Schritt wurde ein Gel mit einer Gesamtkonzentration von 2% mit Hyaluronidase (19.8 mg/250 μL Puffer; 54 kDa) angesetzt und die Qualität der Signale beurteilt (s. Abbildung 8.8). Durch eine zu starke Orientierung der Proteine kann es zu stark verbreiterten Signalen kommen, so dass eine Auswertung erschwert oder nicht durchführbar wird. Die Orientierung durch Gellan Gum ist jedoch wie bereits erwähnt auch schwach justierbar, da es Gele mit einer Gesamtkonzentration von 0.5% ausbildet. Dadurch wurden für Hyaluronidase Linienbreiten erreicht, bei denen die residualen Parameter mit einem akzeptablen Fehlerbereich abgelesen werden konnten. Eine weitere, nützliche Eigenschaft von Gellan Gum ist, dass es bei Entzug der Kationen durch Quellung die intermolekulare Struktur zerstört wird, und die zu untersuchende Substanz zurückgewonnen werden kann. Am Beispiel des ^{15}N markierten Ubiquitins wurde gezeigt, dass etwa 80% der eingesetzten Menge an Ubiquitin wieder aus dem Gel extrahiert werden konnten. Die so erhaltenen Substanzen können für weitere Untersuchungen verwendet werden.

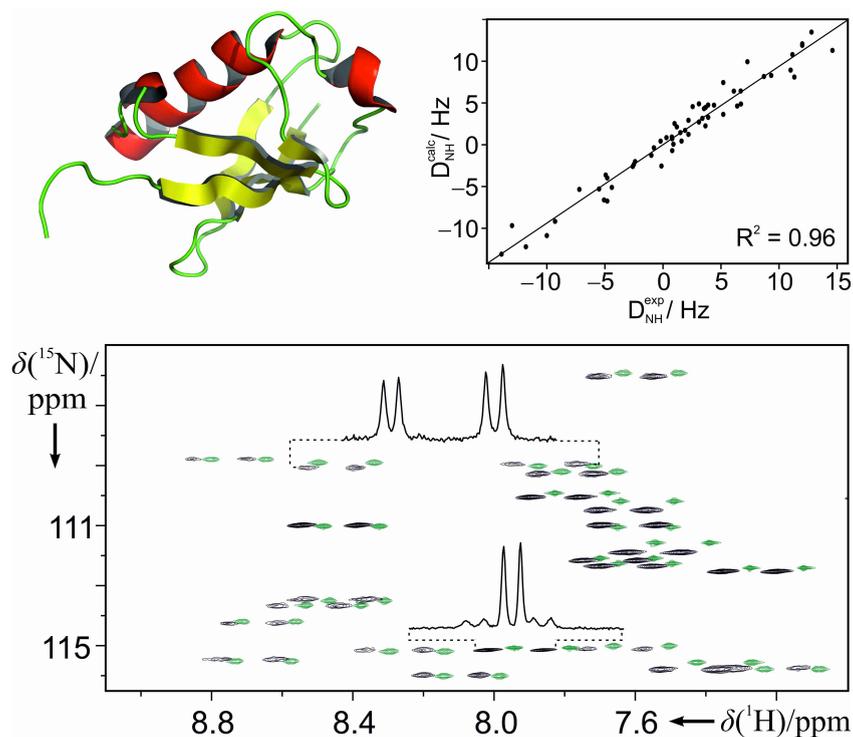


Abbildung 8.7: Gezeigt sind die erhaltenen Daten der NMR-Messungen an dem ^{15}N -markierten Testmolekül Ubiquitin. Durch die Gegenüberstellung der zurückberechneten und experimentellen RDCs wurde ein Korrelationsfaktor R^2 von 0.96 erhalten. Die jeweiligen Kopplungen aus der isotropen (grün) und anisotropen (schwarz) Probe sind dem Kapitel 10 zu entnehmen.

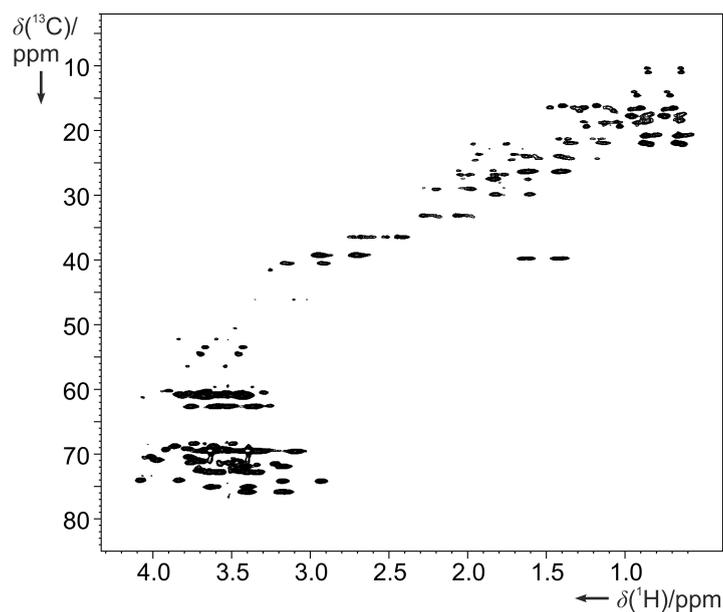


Abbildung 8.8: Nach entsprechender Präparation konnte Hyaluronidase mit natürlicher Häufigkeit in einem ^1H ^{13}C CLIP-HSQC-Experiment detektiert und residuale, dipolare Kopplungen abgelesen werden.

8.1.5 Diskussion

Die Möglichkeit Gellan Gum für die Anwendung als Orientierungsmedium in der hochauflösenden NMR-Spektroskopie verwenden zu können, wurde bereits in einer ersten Arbeit veröffentlicht.¹³³ In der hier vorgestellten Arbeit wurde Gellan Gum für eine breite Anwendung als Orientierungsmedium für kleine Moleküle bis hin zu Makromolekülen erforscht und optimiert. Die bisher bekannten, sowie weitere Eigenschaften konnten bestätigt, erforscht und für die Verwendung als Orientierungsmedium genutzt werden.

Kleine Moleküle benötigen eine höhere Orientierungsstärke als Makromoleküle, welche wiederum häufig mit einer höheren Konzentrierbarkeit des Gelbildners einhergeht.^{112, 159, 160} Eine neu entwickelte Präparationsmethode ermöglichte es, Gele mit Konzentrationen bis zu 40% herzustellen. Diese hochkonzentrierten Gele waren die Voraussetzung für die Verwendung von Gellan Gum als Orientierungsmedium für kleine Moleküle, da die in der Industrie verwendete Methode lediglich Konzentrationen bis 1.5% zuließ. Mithilfe dieser neuen Präparationsmethode konnte im Folgenden erstmals die Eigenschaft als chirales Orientierungsmedium festgestellt werden, indem die Unterscheidung von Enantiomeren mittels anisotroper NMR-Parameter wie RDCs durchgeführt wurde. Insbesondere diese Eigenschaft zur Unterscheidung von Enantiomeren ist ein wichtiges Ziel in der Entwicklung von Orientierungsmedien.

Es zeigte sich im Verlauf der Arbeit, dass sich die Inhomogenität der Gele negativ auf die Orientierungsstärke und die Qualität der Spektren auswirkte. Diese wurde durch grobe Verunreinigungen und staubähnliche Partikel vor allem im HA-Gellan Gum hervorgerufen. Der Ansatz, dieses Problem zu lösen, war die Reinigung des Pulvers durch Siebung mithilfe eines in der Mehlherstellung verwendeten feinmaschigen Siebgewebes. Nach der Siebung zeigten die Gele eine deutliche Verbesserung der Elastizität in dem Sinne, dass sie nicht mehr rissen und somit mehrfach gestreckt und gemessen werden konnten. Zusätzlich nahm die Orientierungsstärke vermutlich wegen der nun höheren Konzentration an reinem Gellan Gum zu.

Des Weiteren konnte die Temperatur- und pH-Wertstabilität der hier eingeführten Mischungsverhältnisse bestätigt werden. Hierbei wurde beobachtet, dass das Gel bei 60 °C und einem pH-Wert von 11 das Potenzial der Enantiomerendiskriminierung beibehält. Das Gel zeigt nach der ersten Erwärmung eine Stabilisierung der Gelstruktur, welche anhand der stabilen Höhe der Kopplung bei 20 °C abzulesen war.

Die Orientierung von Makromolekülen benötigt, anders als bei kleinen Molekülen, eine schwache Orientierungsstärke. Bedingt durch die sehr geringe Konzentration, welche bei

Gellan Gum für die Präparation eines Gels benötigt wird, konnte es ebenfalls für die Untersuchung großer Moleküle wie Proteine eingesetzt werden. Gellan Gum ist mit Collagen das bislang am geringsten konzentrierbare gel-basierte Orientierungsmedium.^{132, 148, 149, 159} Das Gel kann durch den geringen Gewichtsanteil als grobmaschiger beschrieben werden, wobei nach dieser Vorstellung eine große Netzwerkporengröße für die Untersuchung notwendig ist. Makromoleküle würden in einem zu engen Netzwerk zu stark ausgerichtet werden. Bisher sind vor allem Polyacrylamid und negativ geladene Pf1-Phagen sowie Polyacrylate für die Analyse von Proteinen bekannt.^{135, 142–144, 161} Des Weiteren sind Proteine oft instabil in Bezug auf Temperatur, abbauende Enzyme oder Mikroorganismen und die Diffusion in ein hochkonzentriertes Polymergel würde zuviel Zeit in Anspruch nehmen. Die Entwicklung einer schnellen Präparation wurde daher angestrebt. Die Gelpräparation mit Stäbchen dauert, bedingt durch die kurze Quellzeit bei geringkonzentrierten Stäbchen bis 2%, lediglich 2 h. Zudem kann die Präparation auch mit sauren Proteinlösungsmitteln bis pH 4.6 durchgeführt werden, ohne dass die Geleigenschaften beeinträchtigt werden. Das Gel bleibt ca. vier Wochen stabil und kann mehrfach gemessen werden. Durch die Herstellung von Stäbchen konnten auch bereits gelöste, instabile Substanzen, untersucht werden. Dies ermöglichte ein einfaches und schnelles Präparieren der Gele durch Quellen im bereits gelösten Substanzgemisch bei Temperaturen zwischen 4–25 °C. Weiterhin konnte eine gute Quellung der Gele in 100% DMSO festgestellt werden, wodurch das Orientierungsmedium zukünftig auf weitere interessante Substanzklassen angewendet werden kann.

Das Projekt wurde zusammen mit Dr. Christian Merle durchgeführt, der mich bei den Berechnungen mit PALES bzw. bei der Strukturanalyse unterstützte.

9. Zusammenfassung Teil 2

Durch die Entwicklung und Etablierung neuer Orientierungsmedien können anisotrope NMR-Parameter wie dipolare Restkopplungen oder chemische Verschiebungsanisotropien als zusätzliche Strukturinformationen gewonnen werden. Hierfür wurden 2D-Spektren wie das CLIP-HSQC (clean-in-phase HSQC), J -BIRD^{*d,X*} HSQC (bilinear rotation decoupling HSQC) und FAST HSQC aufgenommen.^{162–164} Mithilfe dieser Experimente wurden sowohl die anisotropen NMR Parameter für kleine bis mittelgroße Moleküle, als auch für Proteine wie Ubiquitin gemessen. Die Orientierungsstärke wurde hierbei durch eine Streckung der Probe mittels Kalrez[®]- oder Silikonschlauchs durchgeführt. Die hierfür eingesetzten, gelbasierten Medien sind jedoch durch ihren molekularen Aufbau bzw. ihr Quell- und Lösungsverhalten auf die Untersuchung bestimmter molekularer Strukturen begrenzt. So besitzen nur wenige wie Gelatine oder Kollagen die Eigenschaft, durch ihre chirale Überstruktur Enantiomere erfolgreich zu diskriminieren. Jedoch weisen auch diese Einschränkungen hinsichtlich des Kosten- und Arbeitsaufwands bzw. der Temperatur- und pH-Wert-Stabilität auf.^{141, 145, 149, 155, 165} Daher wurde in dieser Arbeit das aus der Lebensmittelindustrie bekannte Geliermittel Gellan Gum als Orientierungsmedium zur Gewinnung anisotroper NMR-Parameter eingeführt und optimiert. Die bereits bekannten, für die Anwendung als Orientierungsmedium nützlichen Eigenschaften umfassen die variablen Geleigenschaften (spröde, elastisch) der beiden Komponenten, die sehr geringe Konzentration, welche zur Gelbildung benötigt wird, die Thermo- sowie die pH-Wert-Stabilität.¹⁵⁵ Diese Eigenschaften konnten für die Verwendung als Orientierungsmedium genutzt werden und somit ein weiteres, vielseitiges Orientierungsmedium zur Untersuchung von kleinen (<1 kDa) bis großen (<60 kDa) Moleküle etabliert werden. Zudem wurden weitere Eigenschaften wie die Quelleigenschaften in DMSO und die Diskriminierung von Enantiomeren

festgestellt. In Zukunft können Gellan Gum Polymere im Bereich der Strukturanalyse von Makromolekülen wie Proteinen eingesetzt werden, so dass auch in diesem Bereich ein weiteres Orientierungsmedium zur Gewinnung von Strukturinformationen eingesetzt werden kann.

10. Anhang

10.1 Abkürzungsverzeichnis

1D, 2D	ein-/zweidimensional
BIRD	bilinear rotation decoupling
bzgl.	bezüglich
c	Kontrolle
C	Kohlenstoff
CLIP/CLAP	clean inphase/antiphase
<i>cpm2</i>	Coleoptile photomorphogenesis 2
D	dipolare Kopplung
Da	Dalton
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DS	dummy scans
e ⁻	Elektron
gem.	gemessen
H	Wasserstoffatom
H ₂ O	Wasser
Heb	<i>hebiba</i>

<i>hebiba</i>	Japanisch für Schlangenblatt, <i>Oryza sativa L. cv Nihonmasari</i>
HPLC	high pressure liquid chromatography
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
Hz	Hertz
Q	Cornilescu Faktor
IP/AP	inphase/antiphase
<i>J</i>	skalare Kopplung
<i>JRES</i>	<i>J</i> -aufgelöste Spektroskopie
m	Meter
M	molar
MD	Moleküldynamik
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
mL	Milliliter
mM	millimolar
mmol	millimol
N	Stickstoff
NMR	nuclear magnetic resonance
NOE	nuclear Overhauser effect
NOESY	nuclear Overhauser enhancement spectroscopy
O	Sauerstoff
PCA	principle component analysis
PLS	partial least square
ppm	parts per million
<i>R</i>	Pearson Korrelationskoeffizient
RCSA	residual chemical shift anisotropy
RDC	residual dipolar coupling
RF	Radiofrequenz
RQC	residual quadrupolar coupling

s	Salz
s.	siehe
SOP	standard operating procedure, Standardarbeitsanweisung
TSP	Trimethylsilylpropionat
TOCSY	total correlation spectroscopy
u. a.	unter anderem
UV	ultraviolett
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius
δ	chemische Verschiebung
$\Delta\nu_Q$	quadrupolare Aufspaltung
μL	Mikroliter
μM	mikromolar
ν	Frequenz

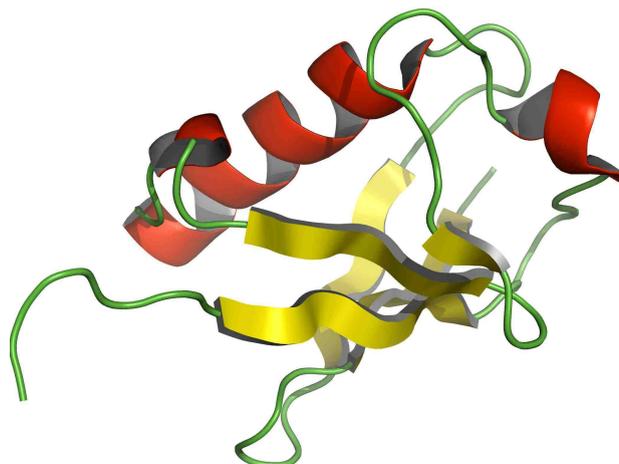
10.2 Aminosäuren

Tabelle 10.2: Temperaturmonitoring von L-/D-Prolin bei einem pH-Wert von 11

T/[K]	$2^*1T_{C\delta H\delta}/[\text{Hz}]$		$\Delta^1T/[\text{Hz}]$
	L-Prolin	D-Prolin	
293	273.1 ± 1.6	301.6 ± 0.1	28.5 ± 1.60
298	276.7 ± 0.2	300.7 ± 0.1	24.0 ± 0.22
303	279.3 ± 0.2	301.4 ± 0.5	22.1 ± 0.54
308	281.0 ± 0.1	301.7 ± 0.1	20.7 ± 0.14
313	283.0 ± 0.1	302.1 ± 0.1	19.1 ± 0.14
318	284.6 ± 0.1	302.4 ± 0.6	17.8 ± 0.61
323	286.2 ± 0.2	302.3 ± 0.4	16.1 ± 0.45
328	287.5 ± 0.3	302.0 ± 0.3	14.5 ± 0.42
333	288.7 ± 0.2	302.5 ± 0.3	13.8 ± 0.36
328	287.8 ± 0.4	302.8 ± 0.1	15.0 ± 0.41
323	286.4 ± 0.3	302.1 ± 0.3	15.7 ± 0.42
318	284.8 ± 0.1	302.6 ± 0.1	17.8 ± 0.14
313	283.2 ± 0.3	302.4 ± 0.2	19.2 ± 0.36
308	281.3 ± 0.5	301.7 ± 0.2	20.4 ± 0.54
303	279.5 ± 0.4	301.8 ± 0.1	22.3 ± 0.41
298	277.5 ± 0.2	300.9 ± 0.4	23.4 ± 0.45
293	275.5 ± 0.6	300.0 ± 0.1	24.5 ± 0.61
298	277.1 ± 0.1	300.8 ± 0.4	23.7 ± 0.41
303	279.2 ± 0.2	300.9 ± 0.2	21.7 ± 0.28
308	281.5 ± 0.5	301.6 ± 0.2	20.1 ± 0.54
313	283.1 ± 0.5	302.1 ± 0.1	19.0 ± 0.51
318	284.8 ± 0.5	301.8 ± 0.3	17.0 ± 0.58
323	286.2 ± 0.2	302.3 ± 0.3	16.1 ± 0.36
328	287.5 ± 0.1	301.7 ± 0.5	14.2 ± 0.51
333	289.0 ± 0.1	302.1 ± 0.7	13.1 ± 0.71
328	287.7 ± 0.1	302.1 ± 0.2	14.4 ± 0.22
323	285.7 ± 0.3	302.6 ± 0.4	16.9 ± 0.50
318	284.9 ± 0.2	301.7 ± 0.3	16.8 ± 0.36
313	283.4 ± 0.4	301.3 ± 0.1	17.9 ± 0.41
308	281.3 ± 0.1	301.1 ± 0.4	19.8 ± 0.41
303	279.5 ± 0.2	301.6 ± 0.3	22.1 ± 0.36
298	277.1 ± 0.4	301.0 ± 0.1	23.9 ± 0.41
293	274.5 ± 0.1	300.3 ± 0.2	25.8 ± 0.22

10.4 Ubiquitin

Für die Messungen der RDCs und RCSAs von ^{15}N markiertem Ubiquitin, wurde ein Gelan Gum Stäbchen in einer $250\ \mu\text{M}$ ^{15}N -markierten Ubiquitin $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ (90:10) Lösung gequollen und ein entsprechendes ^1H - ^{15}N FAST HSQC Spektrum aufgenommen.



DATA N	58
DATA RMS	1.276
DATA Chi2	83.121
DATA CORR R	0.981
DATA Q SAUPE	0.121
DATA REGRESSION OFFSET	-0.042+/-0.167 [Hz]
DATA REGRESSION SLOPE	0.944+/-0.025[Hz]
DATA REGRESSION BAX SLOPE	0.962+/-0.017[Hz]

Abbildung 10.1: Auswertungsdaten nach der Berechnung der anisotropen Parameter von PALES. Neben der Anzahl der verwendeten RDCs N und dem RMS Wert werden die Qualitätsfaktoren χ^2 , R , Q und verschiedene Regressionsdaten ausgegeben.

Die Molekülgruppen des Strukturmodells mit der Kennung 1D3Z aus der BMRB wurde mit NMRPipe aus den aufgenommenen Spektren identifiziert.¹⁶⁶ Nach der geometrischen Optimierung mit COSMOS wurde das Strukturmodell zum Anfitten der experimentellen RDCs verwendet. Die Seitenketten von Ubiquitin waren nicht dokumentiert. Es wurden daher nur die RDCs des Rückgrats für die Zurückberechnung mit PALES eingesetzt. Die zurückberechneten und experimentellen RDCs wurden in einem $D_{CH}^{gem.}-D_{CH}^{ber.}$ -Diagramm gegeneinander aufgetragen.

Tabelle 10.4: Residuale dipolare Kopplungen von 250 μM ^{15}N -markiertem Ubiquitin in Gellan Gum/ $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ (90:10) bei einer quadrupolaren Aufspaltung von $\Delta\nu_Q = 1.3$ Hz

	$\delta(^1\text{H})/[\text{ppm}]$	$\delta(^{15}\text{N})/[\text{ppm}]$	$^1J_{NH}/[\text{Hz}]$	$^1T_{NH}/[\text{Hz}]$	$^1D_{NH}/[\text{Hz}]$
Gln ²	8.86	123.1	92.7±0.2	87.9±0.5	-4.8±0.5
Ile ³	8.21	115.2	92.6±0.2	97.0±0.9	4.4±0.9
Phe ⁴	8.51	118.5	93.2±0.2	99.3±0.5	6.1±0.5
Lys ⁶	8.82	132.8	93.9±0.2	95.8±0.5	1.9±0.5
Thr ⁷	8.65	115.5	93.9±0.2	97.6±1.0	3.66±1.0
Leu ⁸	9.05	121.58	92.05±0.1	98.5±0.6	6.4±1.0
Thr ⁹	7.56	105.9	92.5±0.1	96.04±1.6	3.54±1.6
Gly ¹⁰	7.73	109.2	93.2±0.2	92.2±2.2	-1.0±2.2
Lys ¹¹	7.19	121.9	93.4±0.2	90.9±1.8	-2.5±1.8
Thr ¹²	8.56	120.7	92.4±0.2	95.5±0.5	3.1±0.5
Ile ¹³	8.78	127.8	93.3±0.3	98.5±1.0	5.2±1.0
Thr ¹⁴	8.66	121.9	92.9±0.3	96.3±0.6	3.4±0.7
Leu ¹⁵	8.63	125.1	93.8±0.2	102.5±0.6	8.7±0.5
Glu ¹⁶	8.05	122.5	92.2±0.4	91.42±0.7	-0.78±0.8
Val ¹⁷	8.84	117.6	93.6±0.2	95.2±0.5	1.6±0.5
Glu ¹⁸	8.56	119.3	91.9±0.2	84.7±1.0	-7.2±1.0
Ser ²⁰	6.95	103.5	92.1±0.2	98.9±1.7	6.7±1.7
Asp ²¹	7.96	123.9	93.8±0.2	94.1±0.5	0.3±0.5
Thr ²²	7.80	109.0	93.5±0.5	105.5±0.9	12.0±1.0
Ile ²³	8.45	121.4	93.6±0.2	95.2±1.5	1.5±1.5
Asn ²⁵	7.84	121.3	93.98±0.1	88.91±0.7	5.07±0.7
Val ²⁶	8.02	122.2	93.35±0.2	94.12±2.0	0.77±2.0
Lys ²⁷	8.46	119.1	93.9±0.1	91.5±0.5	-2.4±0.5
Lys ²⁹	7.77	120.3	93.29±0.2	94.1±1.0	0.8±1.0
Ile ³⁰	8.19	121.4	93.5±0.1	94.3±0.5	0.8±0.5
Gln ³¹	8.46	123.6	93.1±0.2	88.3±0.5	-4.8±1.0
Asp ³²	7.95	119.9	93.32±0.2	84.03±0.5	-9.29±1.4
Glu ³⁴	8.64	114.2	90.37±0.1	85.44±2.3	-4.93±2.3
Gly ³⁵	8.41	108.9	94.0±0.2	80.1±0.8	-13.9±0.8
Ile ³⁶	8.41	108.9	94.0±0.2	80.1±0.8	-13.0±1.0

	$\delta(^1\text{H})/[\text{ppm}]$	$\delta(^{15}\text{N})/[\text{ppm}]$	$^1J_{NH}/[\text{Hz}]$	$^1T_{NH}/[\text{Hz}]$	$^1D_{NH}/[\text{Hz}]$
Asp ³⁹	8.38	113.5	93.74±0.1	103.07±1.3	9.33±1.3
Gln ⁴⁰	7.72	116.9	92.16±0.1	103.32±0.8	11.16±0.8
Gln ⁴¹	8.05	118.1	93.8±0.2	99.0±2.0	5.2±2.0
Arg ⁴²	8.42	123.1	93.4±0.2	90.8±2.0	-2.6±0.5
Leu ⁴³	8.74	124.4	92.7±0.3	93.6±0.4	0.9±0.5
Ile ⁴⁴	8.98	122.2	92.3±0.5	92.1±0.6	-0.2±0.8
Phe ⁴⁵	8.74	125.4	93.8±0.2	96.0±0.8	2.2±0.8
Ala ⁴⁶	8.88	132.8	94.0±0.2	95.2±0.5	1.2±0.5
Gly ⁴⁷	8.08	102.6	93.3±0.1	97.0±2.0	3.68±2.0
Lys ⁴⁸	7.89	121.9	92.1±0.1	94.3±0.4	2.2±0.4
Gln ⁴⁹	8.55	122.8	92.8±0.3	104.12±2.8	11.32±2.8
Leu ⁵⁰	8.46	125.7	93.6±0.2	88.1±0.5	-5.5±0.5
Glu ⁵¹	8.32	123.3	92.1±0.1	80.3±1.0	-11.8±1.0
Asp ⁵²	8.08	120.5	92.3±0.2	87.9±0.3	-4.4±0.4
Arg ⁵⁴	7.38	119.5	92.6±0.3	82.5±2.0	-10.0±2.0
Thr ⁵⁵	8.72	108.8	92.6±0.5	90.0±2.0	-2.6±2.0
Leu ⁵⁶	7.38	118.0	93.2±0.1	106.0±0.5	12.8±1.0
Ser ⁵⁷	8.45	113.7	93.3±0.1	105.3±2.1	12.0±2.1
Asp ⁵⁸	7.17	124.6	93.55±0.2	96.11±2.0	2.56±2.0
Tyr ⁵⁹	7.16	115.8	92.2±0.2	106.8±1.0	14.6±1.0
Asn ⁶⁰	8.06	116.0	94.5±0.2	95.5±0.8	1.0±0.8
Ile ⁶¹	7.17	118.9	93.18±0.2	99.9±1.8	6.72±1.8
Gln ⁶²	7.55	125.0	92.55±0.3	96.44±1.6	3.89±1.6
Thr ⁶⁶	8.66	117.4	91.9±0.2	102.9±7.2	11.0±2.3
Leu ⁷¹	8.07	123.3	93.0±0.2	96.9±0.5	3.9±0.5
Arg ⁷⁴	8.35	121.9	92.9±0.2	102.9±1.0	10.0±1.0
Gly ⁷⁵	8.40	111.0	93.9±0.1	97.0±1.5	3.1±1.5
Gly ⁷⁶	7.86	115.1	93.55±0.2	93.42±1.7	-0.13±1.7

10.5 Metabonomics

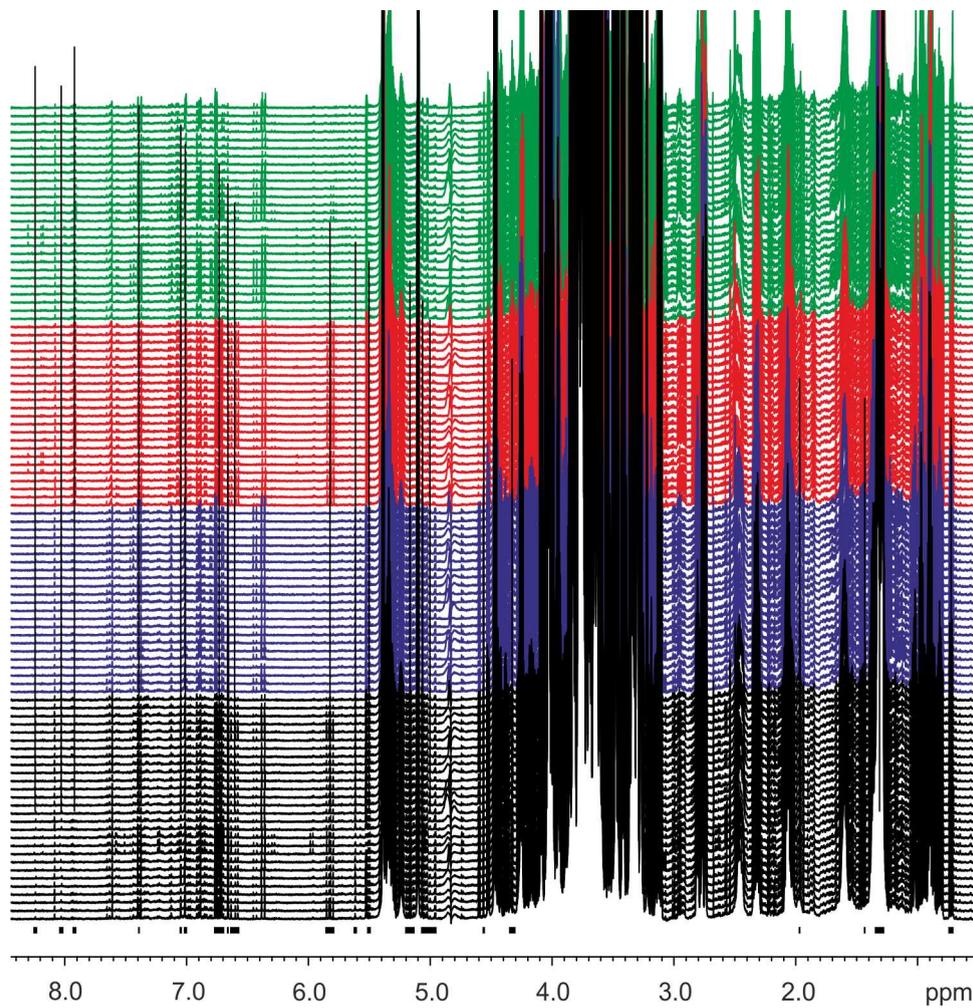


Abbildung 10.2: Muster 1: Signalmuster zur Unterscheidung der Genotypen VBI-0 und VBI-3, sowie der Belichtungs- und Kontrollproben.

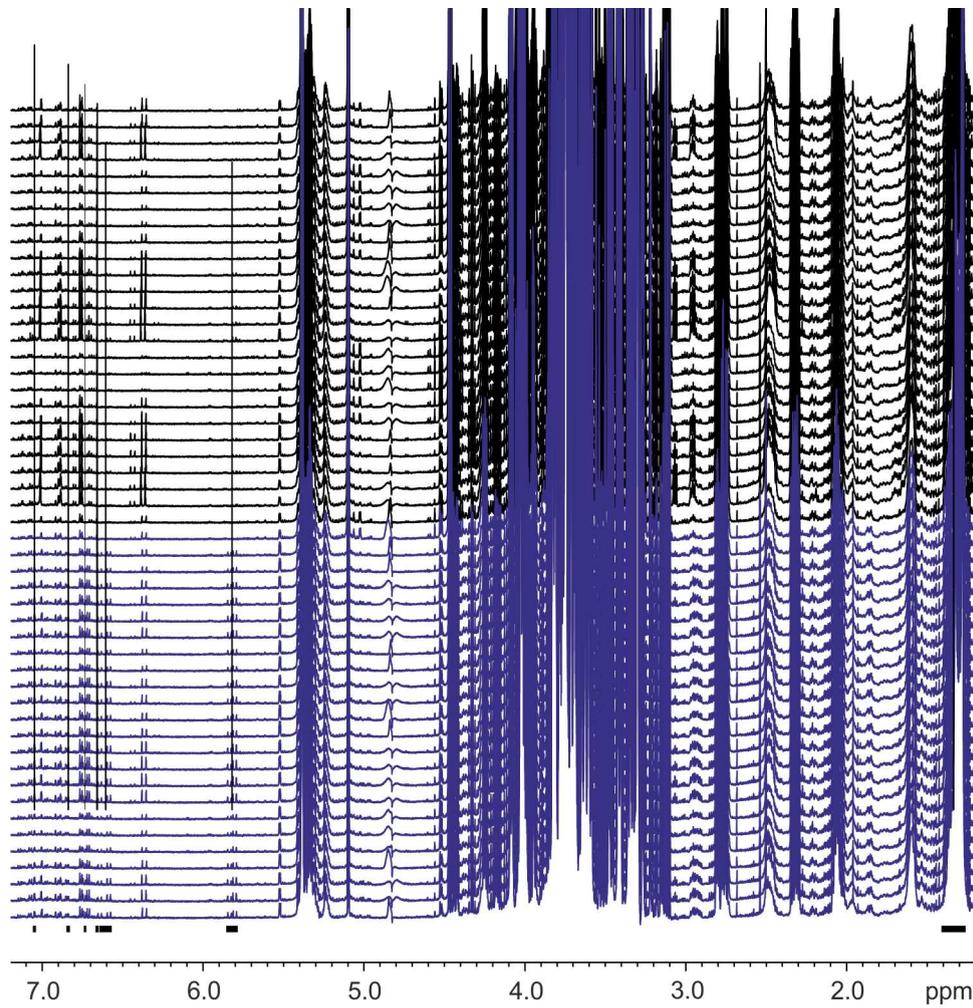


Abbildung 10.3: Muster 3: Signalmuster zur Unterscheidung der belichteten und unbelichteten Proben von VBI-0.

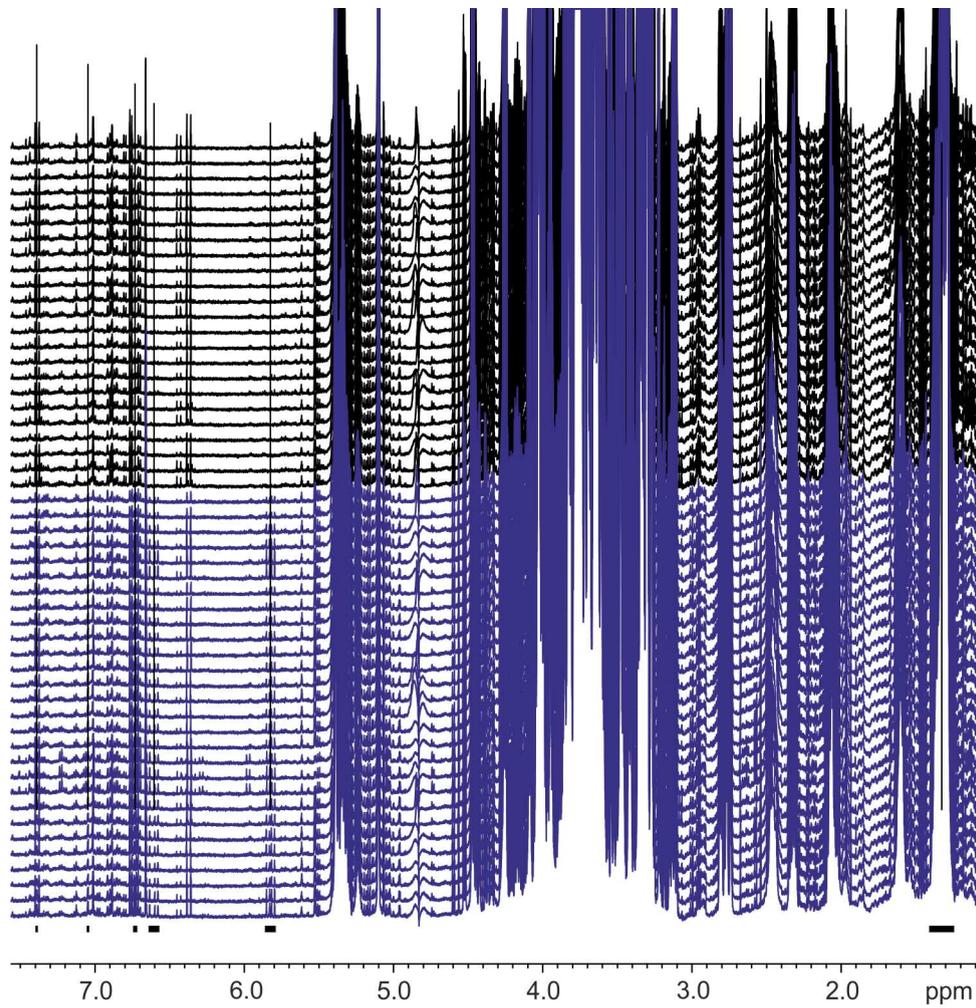


Abbildung 10.4: Muster 3: Signalmuster zur Unterscheidung der belichteten und unbelichteten Proben von VBI-3.

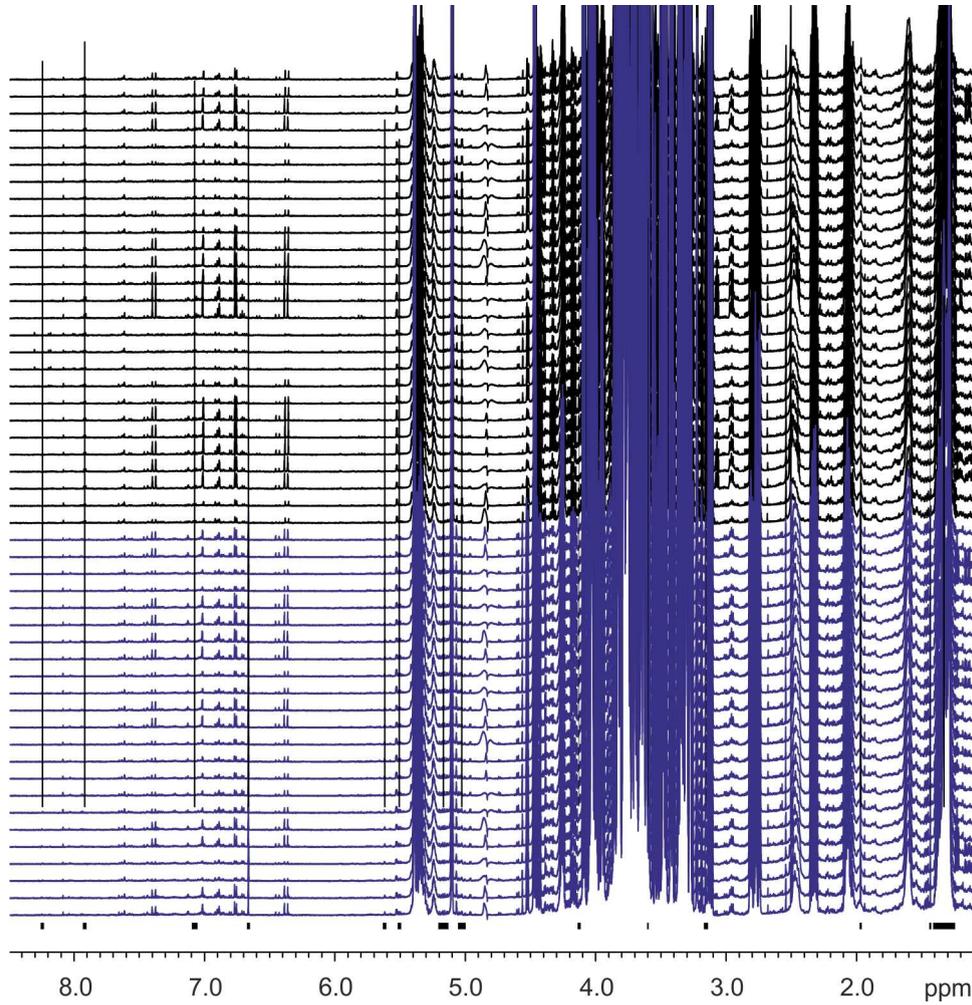


Abbildung 10.5: Muster 4: Signalmuster zur Unterscheidung der unbelichteten Proben von VBI-0 und VBI-3.

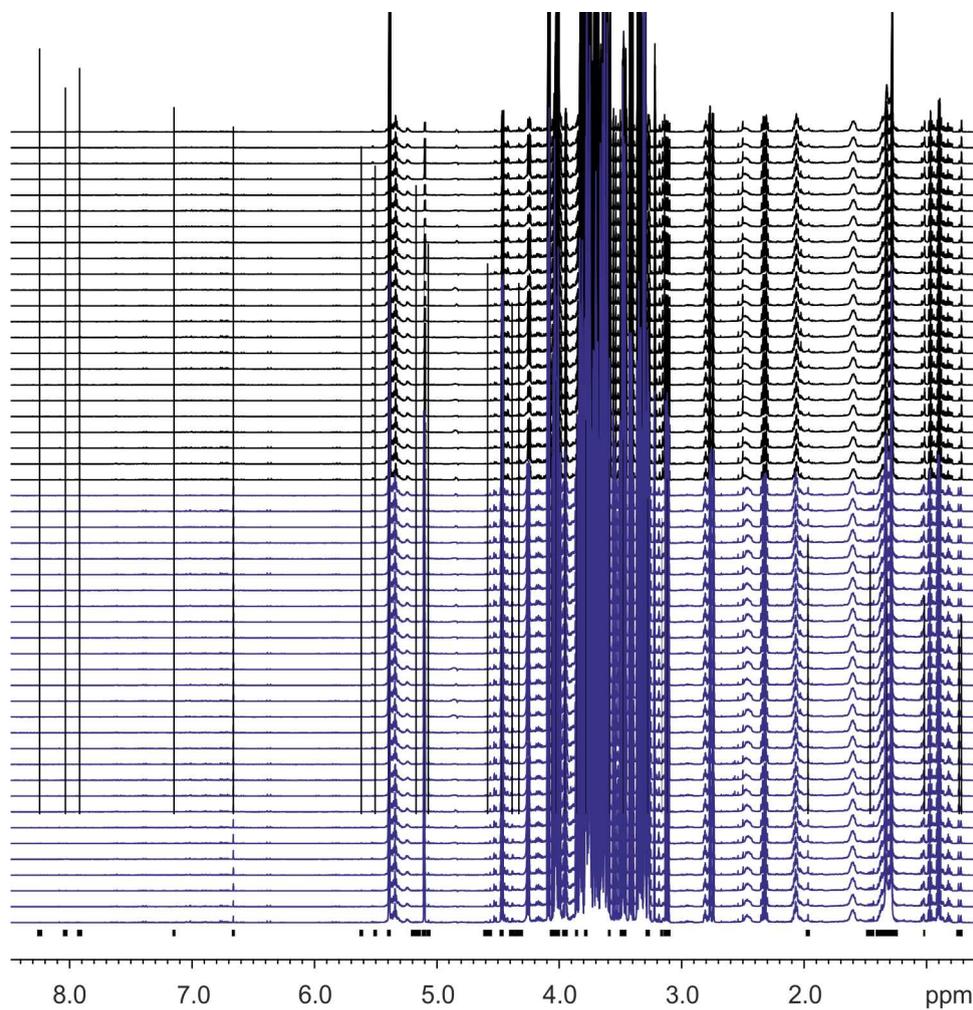


Abbildung 10.6: Muster 5: Signalmuster zur Unterscheidung der belichteten Proben von VBI-0 und VBI-3.

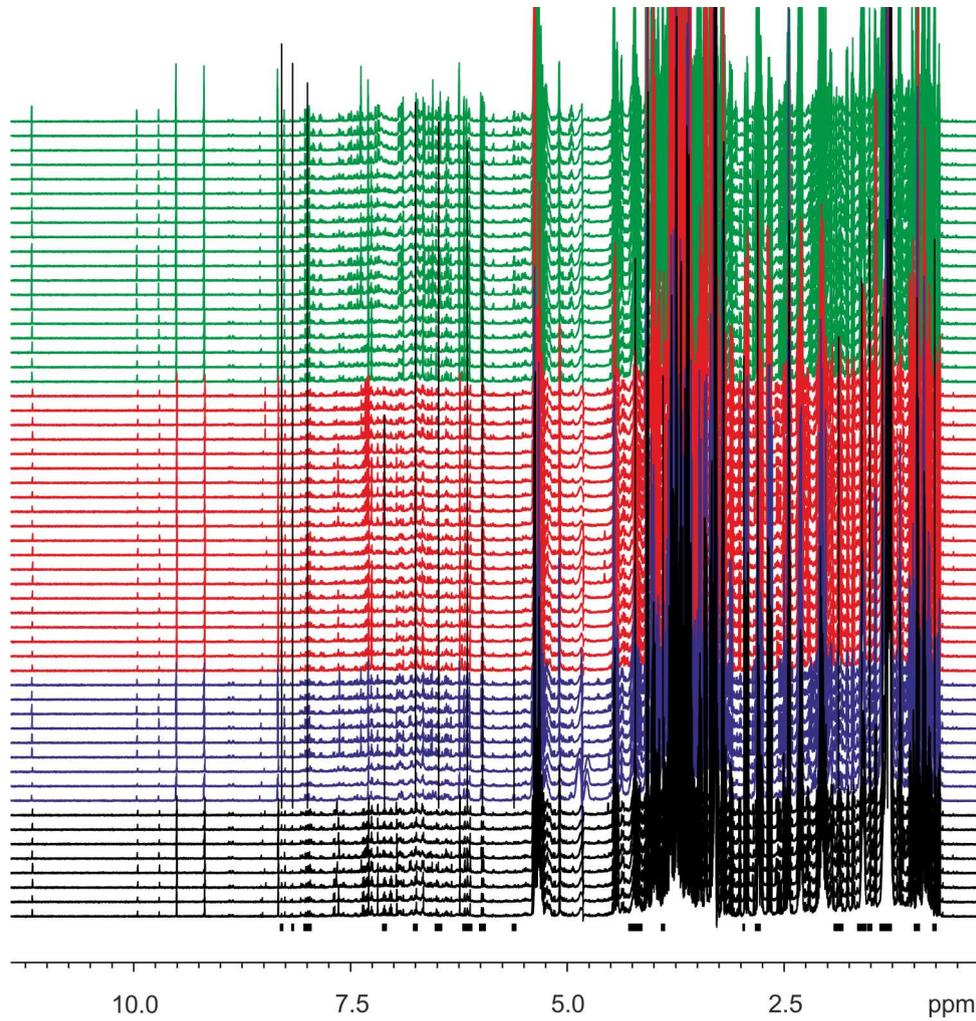


Abbildung 10.7: Muster 6: Signalmuster zur Unterscheidung der Genotypen und Behandlungen der Salzstress- und Trockenstressexperimente

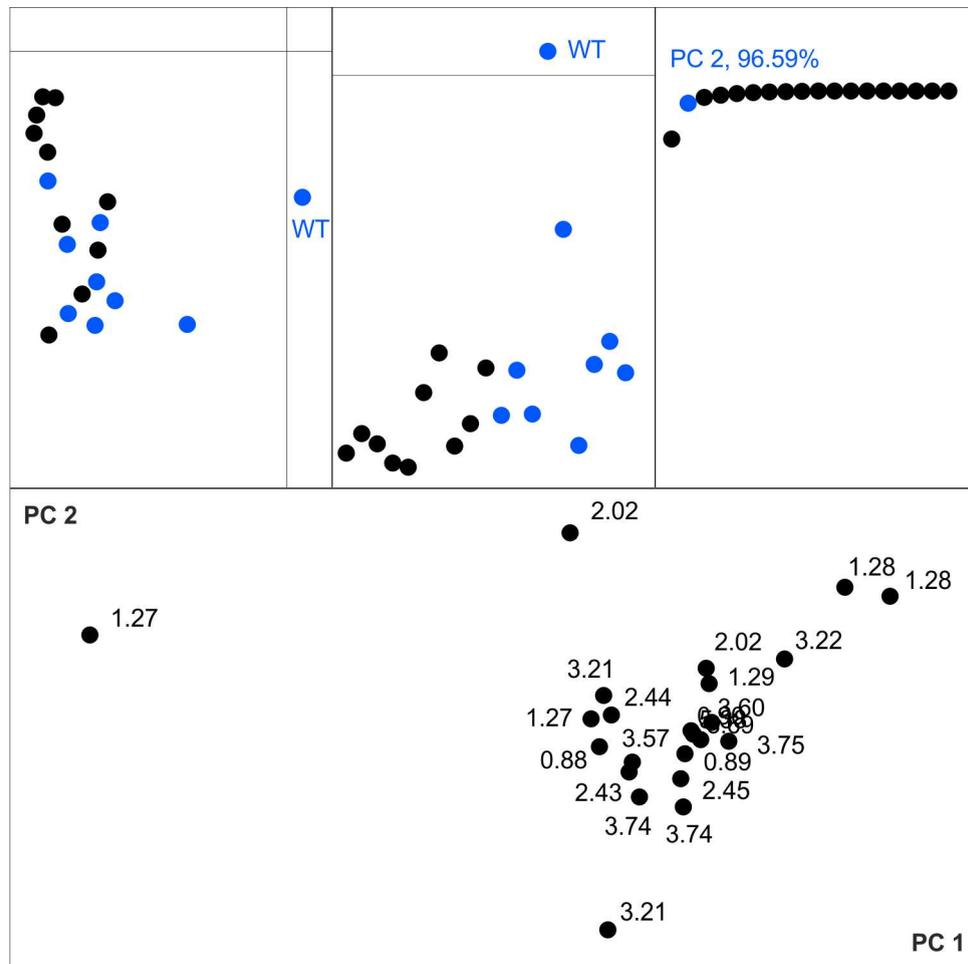


Abbildung 10.8: Darstellung der Plots zur PCA der 24 h-Salzstress-Wurzelextrakte. Im Influence-Plot ist die WT Probe als möglicher Ausreißer gekennzeichnet. Die gezeigte Gesamtvarianz verdeutlicht, dass mit den ersten zwei PCs die größte Varianz zu 96.59% angegeben werden kann.

Literaturverzeichnis

- [1] J. K. Nicholson, J. C. Lindon, Metabonomics, *Nature* **2008**, *455*(23), 1054–1056.
- [2] R. D. Hall, Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic, *New Phytol.* **2005**, *169*, 453–468.
- [3] V. Maloney, Plant metabolomics, *Bio. Teach J.* **2004**, *2*, 92–99.
- [4] W. Weckwerth, *Metabolomics - Methods and Protocols*, 1. Auflage, Humana Press Inc., **2009**.
- [5] M. H. Beale, J. L. Ward, Jasmonates: key players in the Plant defence, *Nat. Prod. Rep.* **1998**, *15*, 533–548.
- [6] H. A. Krebs, The Intermediate Metabolism of Carbohydrates, *The Lancet* **1937**, 736–738.
- [7] T. W.-M. Fan, Metabolite profiling by one- and two-dimensional NMR analysis of complex mixtures, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **1996**, *28*(2), 161–219.
- [8] T. W.-M. Fan, A. N. Lane, Structure-based profiling of metabolites and isotopomers by NMR, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **2008**, *52*(2–3), 69–117.
- [9] J. K. Nicholson, J. C. Lindon, E. Holmes, Metabonomics: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data, *Xenobiotica* **1999**, *29*(11), 1181–1189.
- [10] J. K. Nicholson, I. D. Wilson, Understanding 'Global' Systems Biology: Metabonomics and the Continuum of Metabolism, *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2003**, *2*, 668–676.
- [11] O. Fiehn, Combining Genomics, Metabolome Analysis, and Biochemical Modelling to Understand Metabolic Networks, *Comp. Funct. Genomics* **2001**, *2*(3), 155–168.

- [12] T. Ap Rees, S. A. Hill, Metabolic control analysis of plant metabolism, *Plant, Cell & Environment* **1994**, *17*(5), 587–599.
- [13] J. Trygg, E. Holmes, T. Lundstedt, Chemometrics in metabonomics, *J. Prot. Res.* **2007**, *6*(2), 469–479.
- [14] *Metabolomics Training Course* , vom 17. bis 20. Juli 2011 in Rheinstetten.
- [15] J. L. Griffin, Metabolic profiles to define the genome: can we hear the phenotypes?, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **2004**, *359*, 857–871.
- [16] M. R. Viant, E. S. Rosenblum, R. S. Tjeerdema, NMR-Based Metabolomics: A Powerful Approach for Characterizing the Effects of Environmental Stressors on Organism Health, *Environ. Sci. Technol.* **2003**, *37*, 4962–4969.
- [17] B. Ardrey, *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry: an Introduction*, First Edition, Wiley, **2006**.
- [18] W. Müller-Esterl, *Biochemie - Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*, 1. Auflage, Spektrum akademischer Verlag, **2004**.
- [19] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 7. überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, **2005**.
- [20] J. C. Lindon, J. K. Nicholson, E. Holmes, J. R. Everett, Metabonomics: Metabolic processes studied by NMR spectroscopy of biofluids, *Concepts Magnetic Res.* **2000**, *12*(5), 289–320.
- [21] O. Fiehn, J. Kopka, P. Dörmann, T. Altmann, R. N. Trethewey, L. Willmitzer, Metabolite profiling for plant functional genomics, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *19*(2), 1157–1161.
- [22] P. Kusch, G. Knupp, Headspace-SPME-GC-MS Identification of Volatile Organic Compounds Released from Expanded Polystyrene, *J. Pol. Environ.* **2004**, *12*(2), 83–87.
- [23] T. Toghe, Y. Nishiyama, M. Y. Hirai, M. Yano, J. Nakajima, M. Awazuhara, E. Inoue, H. Takahashi, D. B. Goodenowe, M. Kitayama, M. Noji, M. Yamazaki, K. Saito, Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of Arabidopsis plants over-expressing an MYB transcription factor, *Plant J.* **2005**, *42*(2), 218–235.

- [24] D. V. Huhman, M. A. Berhow, L. W. Sumner, Quantification of saponins in aerial and subterranean tissues of *Medicago truncatula*, *J. Agric. Food. Chem.* **2005**, *53*(6), 1914–1920.
- [25] A. R. Fernie, R. N. Trethewey, A. J. Krotzky, L. Willmitzer, Innovation-Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*(9), 763–769.
- [26] J. L. Ward, J. M. Baker, M. H. Beale, Recent applications of NMR spectroscopy in plant metabolomics, *FEBS J.* **2007**, *274*(5), 1126–1131.
- [27] J. Keeler, *Understanding NMR Spectroscopy*, Second Edition, John Wiley & Sons, Ltd, **2005**.
- [28] M. A. Warne, E. M. Lenz, D. Osborn, J. M. Weeks, J. K. Nicholson, An NMR-based metabolomic investigation of the toxic effects of 3-trifluoromethyl-aniline on the earthworm *Eisenia veneta*, *Biomarkers* **2000**, *5*(1), 56–72.
- [29] S. G., Metabolic fluxes and metabolic engineering, *Metab. Eng.* **1999**, *1*(1), 1–11.
- [30] R. Verpoorte, Y. Choi, H. Kim, NMR-based metabolomics at work in phytochemistry, *Phytochemistry Rev.* **2007**, *6*(1), 3–14.
- [31] H. Kacser, J. A. Burns, The control of flux, *Symb. Soc. Exp. Biol.* **1973**, *27*, 65–104.
- [32] R. Heinrich, T. A. Rapoport, A Linear Steady-State Treatment of Enzymatic Chains, *Eur. J. Biochem.* **1974**, *42*(1), 89–95.
- [33] E. Holmes, I. D. Wilson, J. K. Nicholson, Metabolic Phenotyping in Health and Disease, *Cell* **2008**, *134*, 714–717.
- [34] <http://www.simplyscience.ch/teens-liesnach-archiv/articles/dna-kann-man-lesen.html> **Stand 09/2014**.
- [35] <http://www.babonline.org/bab/044/0119/bab0440119f03.htm> **Stand 09/2014**.
- [36] <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/mobileimages> **Stand 09/2014**.
- [37] <http://www.scienceticker.info/2008/06/25/miniatur-naehzeug-baendigt-dna> **Stand 09/2014**.
- [38] <http://huemanelement.com/?portfolio=hearing-aid-model> **Stand 09/2014**.
- [39] <https://encrypted-tbn1.gstatic.com> **Stand 09/2014**.

- [40] O. Fiehn, S. Kloska, T. Altmann, Integrated studies on plant biology using multi-parallel techniques, *Curr. Opin. Biotech.* **2001**, *12*(1), 82–86.
- [41] J. K. Nicholson, Global systems biology, personalized medicine and molecular epidemiology, *Mol. Syst. Biol.* **2006**, *52*, 1–6.
- [42] P. Krishnan, N. J. Kruger, R. G. Ratcliffe, Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR, *J. Exp. Bot.* **2004**, *56*(410), 255–265.
- [43] J. Schripsema, Application of NMR in plant metabolomics: techniques, problems and prospects, *Phytochem. Anal.* **2010**, *21*(1), 14–21.
- [44] P. Nick, Signalling to the Microtubular Cytoskeleton in Plants, *Int. Rev. Cyt.* **1998**, *184*, 33–80.
- [45] R. Brendel, K. Svyatyna, Y. Jikumaru, M. Reichelt, A. Mithöfer, M. Takano, Y. Kamiya, P. Nick, M. Riemann, Effects of Light and Wounding on Jasmonates in Rice phyA phyC Mutants, *Plants* **2014**, *3*, 143–159.
- [46] A. Bouchereau, P. Guenot, F. Larher, Analysis of amines in plant materials, *J. Chromatogr. B* **2000**, *747*(1–2), 49–67.
- [47] P. Nick, Vorlesungsskript: Methodik - Proteinchemie **2008**.
- [48] H. K. Kim, R. Verpoorte, Sample preparation for plant metabolomics, *Phytochem. Analysis* **2010**, *21*(1), 4–13.
- [49] P. S. Belton, I. Delgadillo, A. M. Gil, P. Roma, F. Casuscelli, I. J. Colquhoun, M. J. Dennis, M. Spraul, High-field proton NMR studies of apple juices, *Magnetic Resonance in Chemistry* **1997**, *35*(13), S52–S60.
- [50] G. Giddings, G. Allison, D. Brooks, A. Carter, Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 1151–S1155.
- [51] C. Merle, T. Horn, S. S. D. Büchler, S. Pfannkuchen, P. Nick, B. Luy, *in Vorbereitung* **2014**.
- [52] S. Y. Yang, H. K. Kim, A. W. Lefeber, C. Erkelens, N. Angelova, Y. H. Choi, R. Verpoorte, Application of two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy to quality control of ginseng commercial products., *Planta Med.* **2006**, *72*(4), 364–369.
- [53] C. Manetti, C. Bianchetti, M. Bizzarri, L. Casciani, C. Castro, G. Ascenzo, M. Delfini, M. E. Di Cocco, A. Lagana, A. Micheli, M. Motto, F. Conti, NMR-based metabonomic study of transgenic maize, *Phytochem.* **2004**, *65*, 3187–3198.

- [54] H. P. J. M. Noteborn, A. Lommen, R. C. van der Jagt, J. M. Wesemann, Chemical fingerprinting for the evaluation of unintended secondary metabolic changes in transgenic food crops, *J. Biotechnol.* **2000**, *77*(1), 103–114.
- [55] F. Boeker, *www.statoek.wiso.uni-goettingen.de*, *Vorlesungsskript: Multivariate Verfahren, Kapitel 4* .
- [56] *Dokumentation von AMIX* , Stand 2011.
- [57] E. Holmes, A. W. Nicholls, J. C. Lindon, S. Ramos, M. Spraul, P. Neidig, S. C. Connor, J. Connelly, S. J. P. Damment, J. Haselden, J. K. Nicholson, Development of a model for classification of toxin-induced lesions using ¹H NMR spectroscopy of urine combined with pattern recognition, *NMR in Biomedicine* **1998**, *11*(4-5), 235–244.
- [58] M. R. Viant, Improved methods for the acquisition and interpretation of NMR metabolomic data, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2003**, *310*(3), 943 – 948.
- [59] W. P. Aue, J. Karhan, R. R. Ernst, Homonuclear broad band decoupling and two-dimensional J-resolved NMR spectroscopy, *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*(10), 4226–4227.
- [60] P. J. Foxall, J. A. Parkinson, I. H. Sadler, J. C. Lindon, J. Nicholson, Analysis of biological fluids using 600 MHz proton NMR spectroscopy: application of homonuclear two-dimensional J-resolved spectroscopy to urine and blood plasma for spectral simplification and assignment, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1993**, *11*, 21–31.
- [61] P. Nick, Noise Yields Order - Auxin, Actin, and Polar Patterning, *Plant Biol.* **2006**, *8*, 360–370.
- [62] Z. Opatrny, J. Opatrna, The Specificity of the Effect of 2,4-D and NAA of the Growth, Micromorphology, and Occurrence of Starch in Long-Term *Nicotiana tabacum* L. Cell Strains, *Biol. Plantarum* **1976**, *18*(5), 359–365.
- [63] P. Campanoni, B. Blasius, P. Nick, Auxin Transport Synchronizes the Pattern of Cell Division in a Tobacco Cell Line, *Plant Physiol.* **2006**, *133*, 1251–1260.
- [64] J. Petrasek, A. Freudenreich, A. Heuing, Z. Opatrny, P. Nick, Heat-shock protein 90 is associated with microtubules in tobacco cells, *Protoplasma* **1998**, *202*, 161–174.
- [65] F. Qiao, J. Petrasek, P. Nick, Light can rescue auxin-dependent synchrony of cell division in a tobacco cell line, *J. Exp. Bot.* **2010**, *61*(2), 503–510.

- [66] E. Fumagalli, E. Baldoni, P. Abbruscato, P. Piffanelli, A. Genga, R. Lamanna, R. Consonni, NMR Techniques Coupled with Multivariate Statistical Analysis: Tools to Analyse *Oryza sativa* Metabolic Content under Stress Conditions, *J. Agron. Crop. Sci.* **2009**, *195*(2), 77–88.
- [67] A. Grover, D. Pental, Breeding objectives and requirements for producing transgenic for the major field crops of india, *Curr. Sci.* **2003**, *84*, 310–320.
- [68] I. P. Abrol, J. S. P. Yadav, F. I. Massoud, *Salt-Affected Soils and their Management*, **1988**.
- [69] J. Zhu, Salt and Drought Stress Signal Transduction in Plants, *Annu. Rev. Plant. Biol.* **2002**, *53*, 247–273.
- [70] P. M. Hasegawa, R. A. Bressan, J. Zhu, B. H. J., Plant Cellular and Molecular Responses to High Salinity, *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* **2000**, *51*, 463–499.
- [71] A. Ismail, M. Riemann, P. Nick, The jasmonate pathway mediates salt tolerance in grapevines, *J. Exp. Bot.* **2012**, *63*(5), 2127–2139.
- [72] A. K. Parida, A. B. Das, Salt tolerance and salinity effects on plants: a review, *Ecotox. Environ. Safe.* **2005**, *60*(3), 324–349.
- [73] K. Svyatyna, M. Riemann, Light-dependent regulation of the jasmonate pathway, *Protoplasma* **2012**, *249*(2), 137–145.
- [74] A. Goossens, L. Pauwels, *Jasmonate Signaling Methods and Protocols*, First Edition, Springer, **2013**.
- [75] A. Moons, E. Prinsen, G. Bauw, M. Van Montagu, Antagonistic effects of abscisic acid and jasmonates on salt stress-inducible transcripts in rice roots, *Plant Cell.* **1997**, *9*, 2243–2259.
- [76] D. Kang, Y. Seo, J. D. Lee, R. Ishii, D. H. Shin, S. K. Park, I. Lee, Jasmonic acid differentially affects growth, ion uptake and abscisic acid concentration in salt tolerant and salt sensitive rice cultivars, *J. Agro. Crop. Sci.* **2005**, *191*, 273–282.
- [77] K. Kumar, M. Kumar, S. Kim, H. Ryu, Y. Cho, Insights into genomics of salt stress response in rice, *Rice* **2013**, *6*(27), 1–15.
- [78] rice seedling , Homepage ikisan, Stand 09.2014.

- [79] M. Riemann, K. Haga, T. Shimizu, K. Okada, S. Ando, S. Mochizuki, Y. Nishizawa, U. Yamanouchi, P. Nick, M. Yano, E. Minami, M. Takano, H. Yamane, M. Iino, Identification of rice Allene Oxide Cyclase mutants and the function of jasmonate for defence against *Magnaporthe oryzae*, *Plant J.* **2013**, *74*(2), 226–238.
- [80] M. Riemann, A. Müller, A. Korte, M. Furuya, E. W. Weiler, P. Nick, Impaired Induction of the Jasmonate Pathway in the Rice Mutant *hebiba*, *Plant Physiol.* **2003**, *4*, 1820–1830.
- [81] R. Heller, Recherches sur la nutrition minerale des tissus vegetaux cultives in vitro, *Ann. Sci. Nat. Bot. biol. Veg.* **1953**, *14*, 1–223.
- [82] J. Lewis, Standard Operating Procedure GARNet 10 Analysing *Arabidopsis thaliana* plants by NMR Analysis, www.metabolomics.bbsrc.ac.uk/techniques.htm **09/2014**.
- [83] P. Styles, N. F. Soffe, C. A. Scott, D. A. Crag, F. Row, D. J. White, P. C. White, A high-resolution NMR probe in which the coil and preamplifier are cooled with liquid helium, *J. Magn. Reson.* **1984**, *60*(3), 397–404.
- [84] Praktikum - Modul 417 Strukturbiochemie, <http://www.chemie.uni-hamburg.de> , Stand 09/2014.
- [85] A. Boisson, E. Gout, R. Blygny, C. Rivasseau, A simple and efficient method for long-term preservation of plant cell suspension cultures, *Plant Methods* **2012**, *8*, 1–12.
- [86] J. Schripsema, R. Verpoorte, Investigation of extracts of plant cell cultures by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Phytoch. Anal.* **1991**, *2*(4), 155–162.
- [87] J. Maisch, K. Kreppenhof, S. Büchler, C. Merle, S. Sobich, B. Luy, R. Ahrens, P. Nick, A. Guber, Time-resolved NMR metabolomics of plant cells based on a microfluidic chip, *Lab on chip eingereicht*.
- [88] D. W. Chia, T. J. Yoder, W.-D. Reiter, S. I. Gibson, Fumaric acid: an overlooked form of fixed carbon in *Arabidopsis* and other plant species, *Planta* **2000**, *211*, 743–751.
- [89] J. Lopez-Bucio, M. F. Nieto-Jacobo, V. Ramirez-Rodriguez, L. Herrera-Estrella, Organic acid metabolism in plants: From adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils, *Plant Sci.* **2000**, *160*, 1–13.
- [90] M. B. Zell, H. Fahnenstich, A. Maier, M. Saigo, E. V. Voznesenskaya, G. E. Edwards, C. Andreo, F. Schleifenbaum, C. Zell, M. F. Drincovich, V. G. Maurino, Analysis

- of Arabidopsis with Highly Reduced Levels of Malate and Fumarate Sheds Light on the Role of These Organic Acids as Storage Carbon Molecules, *Plant Physiol.* **2010**, *152*(3), 1251–1262.
- [91] E. Gout, R. Bligny, N. Pascal, R. Douce, ^{13}C Nuclear Magnetic REsonance Studies of Malate and Citrate Synthesis and Compartmentation in Higher Plant Cells, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*(6), 3986–3992.
- [92] A. Kratochwil, R. Scheibe, H. Wiczorek, N. Campbell, *Biologie*, 8., aktualisierte Auflage, Pearson Verlag, **2009**.
- [93] A. Bresinsky, C. Körner, J. W. Kadereit, G. Neuhaus, U. Sonnewald, *Lehrbuch der Botanik*, 36. Auflage, Spektrum Verlag, **2008**.
- [94] H. Fahnenstich, M. Saigo, M. Niessen, M. I. Zanon, A. R. Andreo, C. S. Fernie, M. F. Drincovich, U. I. Flügge, V. G. Maurino, Alteration of Organic Acid Metabolism in Arabidopsis Overexpressing the Maize C_4 NADP-Malic Enzyme Causes Accelerated Senescence during Extended Darkness, *Plant Physiol.* **2007**, *145*(3), 640–652.
- [95] Y. Gibon, O. E. Bläsing, N. Palacois-Rojas, D. Pankovic, J. H. Hendriks, J. Fisahn, M. Höhne, M. Günther, M. Stitt, Adjustment of diurnal starch turnover to short days: depletion of sugar during the night leads to a temporary inhibition of carbohydrate utilization, accumulation of sugars and post-translational activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in the following light period., *Plant J.* **2004**, *39*(6), 847–862.
- [96] I. Pracharoenwattana, W. Zhou, O. Keech, P. B. Francisco, T. Udomchalothorn, H. Tschoep, M. Stitt, Y. Gibon, S. M. Smith, Arabidopsis has a cytosolic fumarase required for the massive allocation of photosynthate into fumaric acid and for rapid plant growth on high nitrogen, *Plant J.* **2010**, *62*(5), 785–795.
- [97] M. Hazman, B. Hause, E. Eiche, P. Nick, M. Riemann, Increased tolerance to salt stress in rice jasmonate-biosynthesis mutants, *Plant J.* **eingereicht**.
- [98] T. J. Flowers, A. R. Yeo, Variability in the resistance of dodium chloride salinity within rice (*Oryza sativa* L.) varieties, *New Phytol.* **1981**, *88*, 363–373.
- [99] E. A. Weretilnyk, K. J. Alexander, M. Drebenstedt, J. D. Snider, P. S. Summers, B. A. Moffatt, Maintianing Methylation Activities during Salt Stress. The Involvement of Adenosine Kinase, *Plant Physiol.* **2001**, *125*(2), 856–865.
- [100] R. Mittler, Abiotic stress, the field environment and stress combination, *Trends Plant. Sci.* **2006**, *11*(1), 15–19.

- [101] N. Suzuki, R. Mittler, Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction, *Physiol. Plantarum* **2006**, *126*(1), 45–51.
- [102] N. Verbruggen, H. C., Proline accumulation in plants: a review, *Amino Acids* **2008**, *35*, 753–759.
- [103] Q. J. Smirnov, N. and Cumbes, Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes, *Phytochem.* **1989**, *28*, 1057–1060.
- [104] A. K. Garg, T. G. Owens, A. P. Ranwala, Y. D. Choi, L. V. Kochian, R. J. Wu, Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 15898–15903.
- [105] A. Saupe, G. Englert, High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Orientated Molecules, *Phys. Rev. Lett.* **1963**, *11*, 462–464.
- [106] J. C. Freudenberger, P. Spittler, R. Bauer, H. Kessler, B. Luy, Stretched Poly(dimethylsiloxane) Gels as NMR Alignment Media for Apolar and Weakly Polar Organic Solvents: An Ideal Tool for Measuring RDCs at Low Molecular Concentrations, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*(45), 14690–14691.
- [107] M. Rückert, G. Otting, Alignment of Biological Macromolecules in Novel Nonionic Liquid Crystalline Media for NMR Experiments, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*(32), 7793–7797.
- [108] S. M. Douglas, J. J. Chou, W. M. Shih, DNA-nanotube-induced alignment of membrane proteins for NMR structure determination, *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*(16), 6644–6648.
- [109] A. Marx, C. Thiele, Orientational Properties of Poly- γ -benzyl-L-glutamate: Influence of Molecular Weight and Solvent on Order Parameters of the Solute, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*(1), 254–260.
- [110] G. Kummerlöwe, J. Auernheimer, A. Lendlein, B. Luy, Stretched Poly(acrylonitrile) as a Scalable Alignment Medium for DMSO, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*(19), 6080–6081.
- [111] J. C. Freudenberger, S. Knör, K. Kobzar, D. Heckmann, T. Paululat, H. Kessler, B. Luy, Stretched Poly(vinyl acetate) Gels as NMR Alignment Media for the Measurement of Residual Dipolar Couplings in Polar Organic Solvents, *Angew. Chem.* **2005**, *117*(3), 427–430.

- [112] C. Merle, G. Kummerlöwe, J. C. Freudenberger, F. Halbach, S. Wolfgang, C. Lierse v. Gostomski, J. Höpfner, T. Beskers, M. Wilhelm, B. Luy, Crosslinked Poly(ethylene oxide) as a Versatile Alignment Medium for the Measurement of Residual Anisotropic NMR Parameters, *Angew. Chem.* **2013**, *52*(39), 10309–10312.
- [113] C. M. Thiele, Skalierung der Ausrichtung kleiner organischer Moleküle in substituierten Polyglutamaten durch Probenrotation bei unterschiedlichen Winkeln (VASS), *Angew. Chem.* **2005**, *117*(18), 2847–2850.
- [114] J. Courtieu, J. Bayle, B. Fung, *Variable Angle Sample Spinning NMR in Liquid Crystals*, Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc., Pergamon Press Bd. 26, Teil 2, **1994**.
- [115] P. W. Kuchel, B. E. Chapman, N. Müller, W. A. Bubb, D. J. Philp, A. M. Torres, Apparatus for rapid adjustment of the degree of alignment of NMR samples in aqueous media: Verification with residual quadrupolar splittings in ^{23}Na and ^{133}Cs spectra, *J. Magn. Reson.* **2006**, *180*(2), 256–265.
- [116] Y. Ishii, M. Markus, R. Tycko, Controlling residual dipolar couplings in high-resolution NMR of proteins by strain induced alignment in a gel, *J. Biomol. NMR* **2001**, *21*, 141–151.
- [117] D. Intelmann, G. Kummerlöwe, G. Haseleu, N. Desmer, K. Schulze, R. Fröhlich, O. Frank, B. Luy, T. Hofmann, Structures of Storage-Induced Transformation Products of the Beer's Bitter Principles, Revealed by Sophisticated NMR Spectroscopic and LC-MS Techniques, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*(47), 13047–13058.
- [118] T. Cierpicki, J. H. Bushweller, Charged Gels as Orienting Media for Measurement of Residual Dipolar Couplings in Soluble and Integral Membrane Proteins, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*(49), 16259–16266.
- [119] G. Kummerlöwe, E. F. McCord, S. F. Cheatham, S. Niss, R. W. Schnell, B. Luy, Tunable Alignment for all Polymer Gel/Solvent Combinations for the Measurement of Anisotropic NMR Parameters Using a Perfluorinated Elastomer Tube, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 7087–7089.
- [120] C. Naumann, W. A. Bubb, B. E. Chapman, P. W. Kuchel, Tunable-Alignment Chiral System Based on Gelatin for NMR Spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*(17), 5340–5341.
- [121] C. Gayathri, N. Tsarevsky, R. Gil, Residual Dipolar Couplings (RDCs) Analysis of Small Molecules Made Easy: Fast and Tuneable Alignment by Reversible Compression/Relaxation of Reusable PMMA Gels, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*(12), 3622–3626.

- [122] J. R. Tolman, H. M. Al-Hashimi, L. E. Kay, J. H. Prestegard, Structural and Dynamic Analysis of Residual Dipolar Coupling Data for Proteins, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*(7), 1416–1424.
- [123] G. Kummerlöwe, B. Crone, M. Kretschmer, S. F. Kirsch, B. Luy, Residual Dipolar Couplings as a Powerful Tool for Constitutional Analysis: The Unexpected Formation of Tricyclic Compounds, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*(11), 2648–2648.
- [124] C. M. Thiele, Residual Dipolar Couplings (RDCs) in Organic Structure Determination, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *2008*(34), 5673–5685.
- [125] J. Klages, C. Neubauer, M. Coles, H. Kessler, B. Luy, Structure Refinement of Cyclosporin A in Chloroform by Using RDCs Measured in a Stretched PDMS-Gel, *ChemBioChem* **2005**, *6*(9), 1672–1678.
- [126] G. Kummerlöwe, F. Halbach, B. Laufer, B. Luy, Precise measurement of RDCs in water and DMSO based gels using a silicone rubber tube for tunable stretching, *Open Spectrosc. J.* **2008**, *2*, 29–33.
- [127] B. Luy, K. Kobzar, H. Kessler, An Easy and Scalable Method for the Partial Alignment of Organic Molecules for Measuring Residual Dipolar Couplings, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*(9), 1092–1094.
- [128] G. Kummerlöwe, S. Knör, A. O. Frank, T. Paululat, H. Kessler, B. Luy, Deuterated Polymer Gels for Measuring Anisotropic NMR Parameters with Strongly Reduced Artifacts, *Chem. Commun.* **2008**, 5722–5724.
- [129] G. Kummerlöwe, M. Behl, A. Lendlein, B. Luy, Artefact-Free Measurement of Residual Dipolar Couplings in DMSO by the Use of Cross-Linked Perdeuterated Poly(acrylonitrile) as Alignment Medium, *Chem. Commun.* **2010**, 8273–8275.
- [130] T. Montag, C. M. Thiele, Cross-Linked Helically Chiral Poly-(γ -benzyl-L-glutamate) as Enantiodiscriminating Alignment Medium, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*(7), 2271–2274.
- [131] A. Marx, B. Böttcher, C. Thiele, Enhancing the Orienting Properties of Poly(γ -benzyl-L-glutamate) by means of Additives, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*(5), 1656–1663.
- [132] K. Kobzar, H. Kessler, B. Luy, Stretched Gelatin Gels as Chiral Alignment Media for the Discrimination of Enantiomers by NMR Spectroscopy, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*(20), 3145–3147.

- [133] S. S. D. Büchler, G. Kummerlöwe, B. Luy, Naturally occurring biodegradable polymers as the basis of chiral gels for the distinction of enantiomers by partially oriented NMR spectroscopy, *Int. J. Artif. Organs* **2011**, *34*(2), 134–138.
- [134] M. Dama, S. Berger, Polyacetylenes as a new alignment medium to measure residual dipolar couplings for chiral organic molecules, *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*(47), 6439–6442.
- [135] H.-J. Sass, G. Musco, S. Stahl, P. Wingfield, S. Grzesiek, Solution NMR of proteins within polyacrylamide gels: Diffusional properties and residual alignment by mechanical stress or embedding of oriented purple membranes, *J. Biomol. NMR* **2000**, *18*(4), 303–309.
- [136] S. S. D. Büchler, C. Merle, B. Luy, Gellan Gum Biopolymer Gels for Measurement of Anisotropic NMR Parameters of Large Proteins and for the Distinction of Enantiomers by Partially Oriented NMR Spectroscopy, *in Vorbereitung*.
- [137] F. Hallwass, M. Schmidt, H. Sun, A. Mazur, G. Kummerlöwe, B. Luy, A. Navarro-Vázquez, C. Griesinger, U. M. Reinscheid, Residual Chemical Shift Anisotropy (RC-SA): A Tool for the Analysis of the Configuration of Small Molecules, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*(40), 9487–9490.
- [138] P. Lesot, D. Merlet, A. Loewenstein, J. Courtieu, Enantiomeric visualization using proton-decoupled natural abundance deuterium NMR in poly(γ -benzyl-L-glutamate) liquid crystalline solutions, *Tetrahedron-Asymmetr.* **1998**, *9*(11), 1871–1881.
- [139] L. Ziani, P. Lesot, A. Meddour, J. Courtieu, Empirical determination of the absolute configuration of small chiral molecules using natural abundance ^2H NMR in chiral liquid crystals., *Chem. Commun.* **2007**, 4737–4739.
- [140] N.-C. Meyer, A. Krupp, V. Schmidts, C. M. Thiele, M. Reggelin, Polyacetylenes as Enantiodifferentiating Alignment Media, *Angew. Chem.* **2012**, *124*(33), 8459–8463.
- [141] M. Schmidt, H. Sun, A. Leonov, C. Griesinger, U. M. Reinscheid, Chiral discrimination of amines by anisotropic NMR parameters using chiral polyacrylamide-based gels, *Magn. Reson. Chem.* **2012**, *50*, S38–S44.
- [142] J. H. Prestegard, C. M. Bougault, A. I. Kishore, Residual Dipolar Couplings in Structure Determination of Biomolecules, *Chem. Rev.* **2004**, *104*(8), 3519–3540.
- [143] A. Bax, Weak alignment offers new NMR opportunities to study protein structure and dynamics, *Protein Sci.* **2003**, *12*(1), 1–16.

- [144] M. R. Hansen, L. Mueller, A. Pardi, Tunable alignment of macromolecules by filamentous phage yields dipolar coupling interactions., *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*(12), 1065.
- [145] G. Kummerlöwe, M. Kiran, B. Luy, Covalently Cross-linked Gelatin Allows Chiral Distinction at Elevated Temperatures and in DMSO, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*(45), 12192–12195.
- [146] J. Ma, G. I. Goldberg, N. Tjandra, Weak Alignment of Biomacromolecules in Collagen Gels: An Alternative Way to Yield Residual Dipolar Couplings for NMR Measurements, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*(48), 16148–16149.
- [147] U. Eliav, G. Navon, Collagen Fibers as a Chiral Agent: A Demonstration of Stereochemistry Effects, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*(50), 15956–15957.
- [148] C. Naumann, P. W. Kuchel, NMR of Na⁺, glycine and HDO in isotropic and anisotropic carrageen gels, *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 1109–1116.
- [149] C. Naumann, P. W. Kuchel, NMR (Pro-)chiral Discrimination Using Polysaccharide Gels, *Chemistry* **2009**, *15*(45), 12189–12191.
- [150] C. Aroulanda, M. Sarfati, J. Courtieu, P. Lesot, Investigation of the enantioselectivity of three polypeptide liquid-crystalline solvents using NMR spectroscopy, *Enantiomer* **2001**, *6*, 281–287.
- [151] J. P. Bayle, J. Courtieu, E. Gabetty, A. Loewenstein, J. M. Pechine, Enantiomeric Analysis in a Polypeptide Lyotropic Liquid-Crystal through Proton Decoupled Deuterium NMR, *New J. Chem.* **1992**, 837–838.
- [152] K. S. Kang, G. T. Veeder, P. J. Mirrasoul, T. Kaneko, I. W. Cottrell, Agar-like polysaccharide produced by *Pseudomonas* species: production and basic properties, *Appl. Environ. Microbiol.* **1982**, *43*, 1086.
- [153] P. E. Jansson, B. Lindberg, P. A. Sandford, Structural studies of gellan gum, an extracellular polysaccharide elaborated by *Pseudomonas elodea*, *Carbohydr. Res.* **1983**, *124*, 135.
- [154] M. A. O'Neill, R. R. Selvendran, V. J. Morris, Structure of the acidic extracellular gelling polysaccharide produced by *Pseudomonas elodea*, *Carbohydr. Res.* **1983**, *124*, 123.
- [155] *KELCOGEL gellan gum Book*, 5th Edition, www.cpkelco.com, **2007**.

- [156] H. Grasdalen, O. Smidsrod, Gelation of gellan gum, *Carbohydr. Polym.* **1987**, 7, 371.
- [157] R. Chandrasekaran, S. Maillane, R. P. and Arnott, The crystal structure of gellan, *Carbohydr. Res.* **1988**, 175, 1–15.
- [158] N.-C. Meyer, *Helikale chirale Polyacetylene in Katalyse und Analytik*, Dissertation: Technische Universität Darmstadt, **2012**.
- [159] G. Kummerlöwe, B. Luy, Residual dipolar couplings as a tool in determining the structure of organic molecules, *TrAC-Trend. Anal. Chem.* **2009**, 28(4), 483–493.
- [160] R. Schrieber, H. Gareis, *Gelatine Handbook*, First Edition, Wiley-VCH, **2007**.
- [161] G. Lund, T. Cierpicki, Solution NMR studies reveal no global flexibility in the catalytic domain of CDC25B, *Proteins* **2014**, 1–7.
- [162] D. Uhrin, T. Liptaj, K. Kover, Modified BIRD Pulses and Design of Heteronuclear Pulse Sequences, *J. Magn. Reson. A* **1993**, 101(1), 41–46.
- [163] A. Enthart, J. C. Freudenberger, J. Furrer, H. Kessler, B. Luy, The CLIP/CLAP-HSQC: Pure absorptive spectra for the measurement of one-bond couplings, *J. Magn. Reson.* **2008**, 192(2), 314–322.
- [164] S. Mori, C. Abeygunawardana, M. Johnson, P. Vanzijl, Improved Sensitivity of HSQC Spectra of Exchanging Protons at Short Interscan Delays Using a New Fast HSQC (FHSQC) Detection Scheme That Avoids Water Saturation, *J. Magn. Reson.* **1995**, 108(1), 94–98.
- [165] M. Schmidt, H. Sun, P. Rogne, G. K. E. Scriba, C. Griesinger, L. T. Kuhn, U. M. Reinscheid, Determining the Absolute Configuration of (+)-Mefloquine HCl, the Side-Effect-Reducing Enantiomer of the Antimalaria Drug Lariam, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134(6), 3080–3083.
- [166] F. Delaglio, S. Grzesiek, G. W. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer, A. Bax, NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes, *J. Biomol. NMR* **1995**, 6, 277–293.

10.6 Publikationen

- S. S. D. Büchler, G. Kummerlöwe, B. Luy, Naturally Occuring Biodegradable Polymers as the Basis of Chiral Gels for the Distinction of Enantiomers by Partially Oriented NMR Spectroscopy in *Int. J. Artif. Organs* **2011**, *34* (2), 134–8.
- Maisch, J. and Kreppenhöfer, K. and Büchler, S. and Merle, C. and Sobich, S. and Luy, B. and Ahrens, R. and Nick, P. and Guber, A. *Lab Chip* Time-resolved NMR metabolomics of plant cells based on a microfluidic chip, eingereicht
- S. S. D. Büchler, C. Merle, P. Klausmann, B. Luy, P. Nick, M. Riemann, Metabonomics of Rice Extracts, in Vorbereitung.
- S. S. D. Büchler, B. Luy, P. Nick, Metabonomics of Tobacco Cell Culture, in Vorbereitung.
- S. S. D. Büchler, C. Merle, B. Luy, Gellan Gum Biopolymer Gels for Measurement of Anisotropic NMR Parameters of Large Proteins and for the Distinction of Enantiomers by Partially Oriented NMR Spectroscopy, in Vorbereitung.
- C. Merle, T. Horn, S. S. D. Büchler, S. Pfannkuchen, P. Nick, B. Luy, NMR can Authenticate Plant Products Used in Traditional Chinese Medicine: the *Rheum* Case, in Vorbereitung.

10.7 Danksagung

Herrn Prof. Burkhard Luy danke ich sehr für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die Betreuung meiner Arbeit. Des Weiteren danke ich den Mitgliedern des AK Luy für die lustige und entspannte Arbeitsatmosphäre, für die Hilfen und Diskussionen rund um das Thema NMR. Benjamin Göring danke ich für die vielen Gespräche, Diskussionen und sein offenes Ohr! Dr. Christian Merle danke ich für das Korrekturlesen meiner Arbeit und für das Auffinden so mancher Tippfehler.

Herrn Prof. Dr. Peter Nick danke ich sehr herzlich für die Betreuung des Metabonomics-Teils ebenso wie Herrn Dr. Michael Riemann. Vielen Dank für die vielen Diskussionen, Ideen und Hilfestellungen. Ebenso möchte ich mich beim Arbeitskreis Nick für die vielen Diskussionen, Hilfen, wertvollen Gesprächen und die freundliche Aufnahme bedanken.

Dem AK Ulrich danke ich sehr herzlich für die Hilfen und den herzlichen Umgang.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für ihre Unterstützung und die wertvollen Gespräche während meines Studiums. Besonders danke ich von Herzen Andrea für die gemeinsame Zeit und die Ermutigung, Stefanie für die Ablenkung und die vielen interessanten Gespräche und Selina für alle Ermunterung!

Christian, ich danke Dir von ganzem Herzen für die Zusammenarbeit, Deine Freundschaft und Liebe.