

**Untersuchungen zu zellulären Effekten von Allicin, einem physiologisch
aktiven Vertreter Reaktiver Schwefelspezies, aus Knoblauch (*Allium sativum*
L.), in verschiedenen biologischen Systemen**

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der RWTH Aachen University
zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigte
Dissertation

vorgelegt von

Dipl. Biol. Martin Clemens Horst Gruhlke

aus

Heidelberg

Berichter: Universitätsprofessor Alan J. Slusarenko, PhD
 Universitätsprofessor Dr. Lothar Rink

Tag der mündlichen Prüfung: 25. August 2014

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar

Meiner Großmutter

„Der Anfang der Weisheit ist aufrichtiges Verlangen nach Bildung“

(Weish. 6,17)

Bereits veröffentlichte Teile der Arbeit

Teile dieser Arbeit sind bereits unter folgenden Titeln veröffentlicht:

[1] Gruhlke MCH, Portz D, Stitz M, Anwar A, Schneider T, Jacob C, Schlaich NL, Slusarenko AJ (2010) Allicin disrupts the cell's electrochemical potential und induces apoptosis in yeast. *Free Rad. Biol. Med.* 49: 1916-1924

[2] Gruhlke, M.C.H., und Slusarenko, A.J. (Im Druck). The cellular 'thiolstat' as an emerging target of many plant secondary metabolites. In: *Recent Advances in Redox Active Plant und Microbial Products: From Basic Chemistry to Widespread Applications in Medicine und Agriculture*, C. Jacob, A.J. Slusarenko, G. Kirsch, und P. Winyard (Edit). Springer, Berlin/Heidelberg.

[3] Doering, M., Diesel, B., Gruhlke, M.C.H., Viswanathan, U.M., Mániková, D., Chovanec, M., Burkholz, T., Slusarenko, A.J., Kiemer, A.K., Jacob, C. (2012). Selenium- und tellurium-containing redox modulators with distinct activity against macrophages: possible implications for the treatment of inflammatory diseases. *Tetrahedron* 68, 10577-10585.

Zusammenfassung

Allicin ist die quantitativ bedeutendste antimikrobielle schwefelhaltige Substanz von frisch verletztem Knoblauchgewebe mit einer großen Bandbreite von antimikrobieller und biozider Wirkung. Allicin ist als Thiosulfinat ein Vertreter der Klasse der sogenannten „Reaktiven Schwefelspezies (RSS)“, die in der Lage sind, aufgrund ihrer redox-modulierenden Reaktivität gegenüber Thiolgruppen physiologische Bedingungen in biologischen Systemen zu verändern. Die dieser Arbeit zugrunde liegende Hypothese ist, dass die unterschiedlichen biologischen Aktivitäten in weiten Teilen von den redox-modulierenden Eigenschaften des Allicins abhängen.

Eine wichtige Voraussetzung dieser Arbeit war die Etablierung eines effizienten Syntheseprotokolls von Allicin im Labor. Die biologische Wirkung von Allicin wurde auf *Saccharomyces cerevisiae* als Modellpilz, in *Arabidopsis thaliana* als Modellpflanze und in verschiedenen Säugetierzellkulturen getestet. Unter Zuhilfenahme eines enzymbasierten Assays wurde die Konzentration von reduziertem und oxidiertem Glutathion nach Behandlung mit Allicin ermittelt. Ferner wurden genetische und zellbiologische Methoden herangezogen, um die Induktion von Apoptose, Signalkomponenten und Resistenzmechanismen gegenüber Allicin zu ermitteln. In *Arabidopsis* wurden gezielt ausgewählte Mutanten getestet, um Faktoren zu entdecken, die bei der Antwort der Pflanze auf Allicin von Bedeutung sind. Ferner wurden verschiedene Säugetierzelllinien verwendet, um mit unterschiedlichen fluoreszenz- bzw. absorptionsbasierten Assays einen breiten Konzentrationsbereich von chemisch synthetisiertem Allicin bzw. Knoblauchsaff Informationen über Unterschiede zwischen den Zelllinien hinsichtlich Redoxstatus, Proliferationsinhibition und Induktion von (apoptotischem) Zelltod zu erhalten.

Es konnte gezeigt werden, dass Allicin das Verhältnis der absoluten Konzentration von oxidiertem und reduziertem Glutathion in Hefezellen verschiebt. Mithilfe von Mutanten konnte gezeigt werden, dass Glutathion tatsächlich bedeutsam ist für die Resistenz gegenüber Allicin. Durch cytologische und genetische Tests konnte gezeigt werden, dass Allicin in Hefe Apoptose induziert. Dabei scheint Actin ein Ziel der Wirkung von Allicin zu sein und nachfolgend der RAS/cAMP/Protein Kinase A (PKA)-Weg bedeutsam für sowohl Zelltod als auch Inhibition der Proliferation. Bedeutsam für die Resistenz gegenüber Allicin ist ein redoxsensitiver Transkriptionsfaktor, YAP1, dessen Aktivierung und funktionelle Notwendigkeit für die Resistenz gezeigt werden konnte.

Phytotoxische Effekte von Allicin sind vielfältig und in besonderer Weise markant für oxidativen Stress typisches (lichtabhängiges) Ausbleichen von Pflanzen, Keimungsinhibition und die Behinderung des Wurzelwachstums. Auch hier ist Glutathion ein wichtiger Resistenzfaktor, was dadurch gezeigt werden konnte, dass in allen getesteten Assays die *pad2* (enthält etwa 20 % Glutathion im Vergleich zum Wildtyp)-Mutante markant sensitiver war als der Wildtyp. Auch in Säugetierzellkulturen führte die Behandlung mit chemisch synthetisiertem Allicin wie Knoblauchsaff zu einer Abnahme des reduzierten Glutathions. Effekte auf Zellproliferation, Zelltod und Apoptose-Induktion werden im Detail diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die redoxmodulierenden Eigenschaften von Allicin bedeutsam sind für seine breite Toxizität und dass die Induktion von Apoptose mit dieser Verschiebung korreliert. Die Identifikation des RAS/cAMP/Proteinkinase A (PKA)-Weges als wichtigem Faktor der allicininduzierten Apoptose in Hefe, dessen Beteiligung auch am allicininduzierten Zelltod in humanen Krebszelllinien gezeigt worden ist, qualifiziert das Hefemodell als ein geeignetes Modell für die mechanistische Untersuchung der Allicintoxizität. Erstmals wurde in dieser Arbeit eine ursachenorientierte Untersuchung phytotoxischer Effekte von Allicin durchgeführt. Die redox-korrelierte Inhibition der Zellproliferation und Verringerung der Überlebensrate in unterschiedlichen Säugetierzellkulturen gibt erste Evidenzen für das Potential von Allicin für eine medizinische Applikation, beispielsweise im Bereich der Chemotherapie.

Summary

Allicin is the quantitatively most important sulfur-containing volatile compound produced in damaged garlic tissue. Since allicin is a thiosulfinate, it acts as a 'Reactive Sulfur Species' (RSS) which oxidizes thiols under physiological conditions and thus has redox-modulating activity. The central hypothesis reported in this thesis is that the redox-modulatory properties are important for the biological activity of allicin.

An important prerequisite of this project was to establish an efficient synthesis-protocol for allicin. Allicin's effects were studied in *Saccharomyces cerevisiae* (baker's yeast, a model fungus), *Arabidopsis thaliana* (model plant) and various mammalian cell lines. Changes in the absolute concentrations of reduced (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) after allicin treatment were determined using the glutathione reductase recycling assay. Mutants and cell-biological methods were used to study the induction of apoptosis and the role of signalling components that contribute to the resistance or susceptibility of yeast cells to allicin. Also in *Arabidopsis* a mutant-based approach was used to identify putative factors that contribute to the response of plants to allicin. In mammalian cell cultures, changes in redox status, cell proliferation and induction of (apoptotic) cell death were followed upon treatment with either synthetic allicin or garlic juice using standard staining assays.

Allicin decreased the total concentration of the GSH in the glutathione pool and increased the proportion of GSSG in yeast cells. Furthermore, mutants in glutathione metabolism were hypersensitive to allicin. Actin was shown to be a target for allicin and the subsequent RAS/cAMP/Protein Kinase A (PKA) signalling route is important for allicin-induced cell death as well as inhibition of cell proliferation in yeast. The redox-sensitive transcription factor YAP1, which coordinates the oxidative stress response in yeast, was activated by sub-lethal doses of allicin shown both by localization studies and expression of a YAP1-target gene and is necessary for full resistance,.

Various phytotoxic effects of allicin were observed, *e.g.* light-dependent bleaching which is typical for oxidative stress, inhibition of seed germination and root development. Furthermore, GSH is important in resistance as illustrated by the enhanced sensitivity of the *pad2* mutant (20% of wt GSH).

In mammalian cell lines, treatment with synthetic allicin or garlic juice, lead to an increase in oxidation of the glutathione pool. Effects of chemically synthesized allicin or garlic juice on cell proliferation, viability and apoptosis induction and correlation to the redox-status will be discussed in detail.

The data presented in this thesis show that the effects of allicin on cellular redox-conditions are important for its toxicity and correlate with the induction of apoptosis in yeast. The identification of the RAS/cAMP/PKA pathway that previously was shown for allicin-induced apoptosis in human cancer cells, validates the yeast model for mechanistic studies of the molecular basis of allicin's

toxicity. Phytotoxic effects of allicin were investigated for the first time and show that allicin is suitable model substance to study the impact of Reactive Sulfur Species (RSS) in plants. The redox-correlated effects on different mammalian cell-cultures provide evidences for a medical application potential.

Inhaltsverzeichnis

Bereits veröffentlichte Teile der Arbeit	4
Zusammenfassung	5
Summary	7
Inhaltsverzeichnis	9
Abbildungsverzeichnis.....	14
Tabellenverzeichnis	17
Abkürzungsverzeichnis	18
1 Einleitung.....	20
1.1 Allicin als Beispiel eines Redox-aktiven Naturstoffs.	20
1.2 Grundsätzliche chemische und biochemische Mechanismen der Redoxregulation unter besonderer Berücksichtigung der Thiolgruppe.....	20
1.2.1 Grundlagen der Redoxchemie der Zelle	20
1.2.2 Oxidativer Stress und zelluläre Redoxregulation.....	21
1.2.3 Thiole sind ein zentraler Regulator der zellulären Redoxumgebung	24
1.2.4 Zur Biochemie und Biologie des Glutathions als bedeutendstem Nicht-protein-Thiol.....	30
1.2.5 Der Thiolstat als physiologische Größe und seine Regulation mittels des „Redox-Switch“ Konzeptes	32
1.2.6 Zelluläre Thiole und ihre Kinetik: Eine Ergänzung zum ausschließlich Redoxpotential-definierten „Thiolstat“	36
1.2.7 Allicin als Redox toxin und Vertreter Reaktiver Schwefelspezies – eine Übersicht	37
1.3 Das Modellsystem Hefe: Zelltodmechanismen und Prozesse der Oxidationsabwehr und Reparaturmechanismen durch oxidative Schäden	42
1.3.1 Apoptose in Hefe und Tieren – ein Vergleich unter besonderer Berücksichtigung des Redoxgleichgewichts	42
1.3.2 RAS2/PKA Signalling in Hefe und seine Entsprechungen in anderen biologischen Systemen.....	48
1.3.3 Zur Bedeutung des YAP1- Transkriptionsfaktors für die Resistenz von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> gegenüber Allicin	53
1.4 Redox-Effekte in pflanzlichen Systemen am Beispiel von <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.	56
1.5 Ein methodischer Aspekt – Überlegungen zur Physik und Biologie des Hemmhof-tests als Methode zur Feststellung antibiotischer Potenz.....	58
1.6 Fragestellung.....	60

2	Material und Methoden.....	62
2.1	Materialien.....	62
2.2	Biologisches Material.....	62
2.2.1	Plasmide und Vektoren.....	62
2.2.2	Oligonukleotide.....	63
2.2.3	Bakterien.....	63
2.2.4	Hefestämme.....	63
2.2.5	Zelllinien.....	65
2.2.6	Pflanzenmaterial.....	66
2.3	Methoden.....	67
2.3.1	Pufferlösungen.....	67
2.3.2	Antibiotika-Stammlösungen.....	70
2.3.3	Nährmedien.....	70
2.4	Herstellung und Analyse von Knoblauchsft.....	72
2.4.1	Herstellung von Knoblauchsft.....	72
2.4.2	HPLC Analyse von Knoblauchsft.....	72
2.5	Chemische Methoden.....	74
2.5.1	Permanganometrische Titration zur Bestimmung der Wasserstoffperoxid- konzentration.....	74
2.5.2	Destillation und Analytik von Diallyldisulfid.....	74
2.5.3	Synthese von Allicin ausgehend von Diallyldisulfid (DADS).....	75
2.6	Proteinchemische Methoden.....	76
2.6.1	Proteinmengenbestimmung mittels Bradford-Assay.....	76
2.7	Molekularbiologische Methoden.....	77
2.7.1	Präparation von Nukleinsäuren.....	77
2.7.2	Reverse Transkription.....	80
2.7.3	Modifikation und Amplifikation von DNA.....	80
2.7.4	Amplifikation von DNA-Fragmenten.....	82
2.7.5	Auftrennung von Nukleinsäuren.....	85
2.8	Mikrobiologische Methoden.....	85
2.8.1	Kultivierung.....	85
2.8.2	Dauerkulturen und Glycerolstocks.....	86
2.8.3	Transformationsmethoden.....	86
2.8.4	Bestimmung von Suszeptibilität gegenüber Substanzen im Hemmhoftest.....	87
2.8.5	Bestimmung von Überlebensraten im „Drop test“.....	88
2.8.6	Kinetik der Proliferation von Hefe.....	89
2.9	Methoden an Säugetierzellkulturen.....	89
2.9.1	Kultivierung.....	89
2.9.2	Zellzahlbestimmung und Vitalitätstest.....	89

2.9.3	Messung des Glutathionstatus mittels Monobromobiman	89
2.9.4	Testung auf Akkumulation Reaktiver Spezies mittels DCFDA.....	89
2.9.5	MTT-Assay.....	90
2.9.6	Quantifizierung der Zellproliferation mittels ³ H-Thymidin.....	90
2.9.7	YO-PRO1 zur Quantifizierung apoptotischer Zellen.....	90
2.10	Pflanzenmethoden.....	90
2.10.1	Kultivierung und Propagierung auf Erde.....	90
2.10.2	Kultivierung auf Petrischalen	91
2.10.3	Kultivierung auf Filterpapier	91
2.10.4	Bestimmung der Wurzellängen	91
2.10.5	Floating-Leaf Assay	91
2.10.6	Chlorophyll-Messung	92
2.11	Physiologische und biochemische Methoden	92
2.11.1	Quantifizierung von Glutathion mittels Glutathion-Reductase-Bioassay.....	92
2.11.2	Quantifizierung von ROS-Akkumulation in Hefe.....	95
2.11.3	Mikroskopische Verlagerung des AIF Proteins in den Zellkern	96
2.12	Mikroskopische Methoden	97
2.12.1	Durchlichtmikroskopie von Hefezellen.....	97
2.12.2	Fluoreszenzmikroskopie von GFP bzw. RFP exprimierenden Hefezellen.....	97
2.12.3	Färbemethoden	97
2.12.4	Phalloidin-Alexa- Färbung zur Visualisierung des Actin-Cytoskeletts.....	98
2.13	Statistik.....	98
3	Resultate.....	99
3.1	Etablierung einer Syntheseprozedur von Allicin.....	99
3.2	Untersuchungen zum Signalweg der Apoptose - Induktion durch Allicin in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100
3.2.1	Glutathion-Messung zur Ermittlung des elektrochemischen Redoxpotentials der Zelle.....	100
3.2.2	Glutathion-defizitäre Hefemutanten zeigen eine verringerte Resistenz gegenüber Allicin.....	103
3.2.3	Signalweg der Apoptose-induktion durch Allicin in Hefe	105
3.2.4	Zur Bedeutung des ORF YKL071w auf die Resistenz gegenüber Allicin und der YAP-1 abhängigen Stressantwort.....	134
3.3	Physiologische Untersuchungen zur Wirkung von Allicin auf menschliche- und Säugetierzellen.....	143
3.3.1	Auswirkungen von Allicinexposition auf den Redoxzustand von Glutathion in verschiedenen Zelllinien	143
3.3.2	Nach Allicinexposition akkumulieren Zellen Reaktive (Sauerstoff)Spezies	145
3.3.3	Nach Allicinexposition sinkt die Proliferationsrate deutlich ab.....	147
3.3.4	Allicin-exponierte Zellen haben eine drastisch reduzierte Überlebensrate.....	149

3.3.5	Beeinflussung der Überlebensrate durch Allicinexposition und Abschätzung der Apoptose-induktion	151
3.4	Untersuchungen zur Phytotoxizität des Allicins am Beispiel von <i>Arabidopsis thaliana</i>	154
3.4.1	Allicin beeinflusst die Keimungsrate von Arabidopsis-Pflanzen	154
3.4.2	Allicin führt zu einer starken Veränderung der Wurzelmorphologie durch Veränderung der Auxin-Verteilung	156
3.4.3	Allicin bewirkt ein Ausbleichen von Blattorganen	160
4	Diskussion	163
4.1	Etablierung einer Allicinsynthese als Voraussetzung für die Arbeit	163
4.2	Hefe als experimentelles System, um auf genetischem Wege die Frage nach der Wirkweise von Allicin auf Pilze zu klären	165
4.3	Glutathion ist ein Resistenzfaktor von Zellen gegenüber Allicin und ein Regulator des zellulären physiologischen Status	166
4.3.1	Apoptose-Induktion durch Allicin in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	170
4.3.2	Wirkungen von Allicin auf das Actin-Cytoskelett	173
4.3.3	Zur Bedeutung von RAS2 und PDE2 für die Resistenz gegen Allicin	174
4.3.4	Proteinkinase A ist bedeutsam für die Resistenz gegenüber Allicin	176
4.3.5	Beteiligung von Reaktiven Spezies an der Toxizität des Allicins in Hefe	179
4.3.6	Proteinkinase A reguliert die Apoptose via AIF1	181
4.3.7	Zwischenfazit: Modellübersicht und ein erster Ausblick	184
4.4	Beteiligung des YAP1-Transkriptionsfaktors an der Resistenz gegenüber Allicin	186
4.5	Wirkungen von Allicin und Knoblauchsaff auf Säugetierzellen	190
4.5.1	Einfluss von Knoblauchsaff und synthetischem Allicin auf die Zellproliferation	192
4.5.2	Allicin verringert die Überlebensrate unterschiedlicher Zelllinien	193
4.5.3	Induktion apoptotischen Zelltods durch Allicin in verschiedenen Zell-Linien	194
4.6	Relevanz der Untersuchung der Toxizität von Allicin auf Pflanzen	195
4.7	Allicin inhibiert die Keimung und Keimlingsentwicklung von <i>Arabidopsis thaliana</i>	196
4.8	Allicin beeinflusst Keimlingsentwicklung	197
4.9	Allicin bedingt Ausbleichen von photosynthetisch aktiven Organen	199
4.10	Gesamtüberblick: Wirkung von Allicin auf verschiedene biologische Systeme	200
	Erklärung	202
5	Literatur	203
6	Danksagung	226
	Lebenslauf	228

7	Anhang	233
7.1	Ergänzungen zur Einleitung	233
7.1.1	Cystein-Metallkomplexe als Redoxtargets: Metall-Nanoswitches von Zink und Eisen.	233
7.1.2	Aufoxidation des Disulfids zu höheren Oxidationsstufen.....	233
7.1.3	Geschichte der Entdeckung des Glutathions und Abwandlungen des Glutathions in verschiedenen Organismen.	235
7.1.4	Details zur Biosynthese des Allicins in Knoblauch	236
7.1.5	Einige Anmerkungen zu Abbauprodukten des Allicins	237
7.1.6	Detaillierte Diskussion der Chemie Reaktiver Schwefelspezies (RSS)	240
7.2	Ergänzungen zum Material und Methodenteil.....	244
7.2.1	Chemikalien.....	244
7.2.2	Verbrauchsmaterialien	248
7.2.3	Software	249
7.2.4	Geräte	250
7.2.5	Oligonukleotide.....	252
7.3	Referenz NMR-Daten von Allicin	254
7.4	Reinheit von DADS	259

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Foyer-Halliwell-Asada Zyklus	24
Abbildung 2: Prinzip der Thiol-Disulfid-Austauschreaktion mit einem Homodisulfid („symmetrisches Disulfid“)	26
Abbildung 3: Der physiologische Status der Zelle ist abhängig vom Glutathion-definierten Redoxpotential der Zelle.	27
Abbildung 4: Abhängigkeit des zellulären Redoxpotentials von der Gesamtkonzentration an Glutathion	33
Abbildung 5: Illustration des Thiolstat als Regler am Glutathion	34
Abbildung 6: Biosynthese des Allicins, ausgehend von Alliin	38
Abbildung 7: Allicin oxidiert Thiole unter Bildung von Mischdisulfiden	39
Abbildung 8: Reaktion von Allicin mit Glutathion zu GSSA und dessen Folgereaktionen	40
Abbildung 9: Zusammenfassende und vereinfachte Darstellung der Apoptose in Säugetieren	45
Abbildung 10: Vereinfachtes Schema der Biochemie des RAS-Proteins	49
Abbildung 11: Übersicht über die cAMP/PKA Signalkaskade in Hefe	51
Abbildung 12: Hypothetischer Weg, wie Glucose-Signalling-Wege, den PKA-Weg eingeschlossen, die Stressantwort beeinflussen (verändert nach (Ruckenstuhl et al., 2010))	52
Abbildung 13: Vereinfachte Darstellung der YAP1-Aktivierung durch Oxidantien	55
Abbildung 14: Schematische Darstellung des Agar-Diffusionstests (Cooper,	59
Abbildung 15: Absorptionsspektrum von Allicin im Wellenlängenbereich von 230 – 800 nm ...	73
Abbildung 16: Prinzip der Allicinsynthese durch Oxidation des Diallyldisulfids durch H ₂ O ₂	75
Abbildung 17: Prinzip der Glutathionquantifizierung mit Hilfe des GR-Assays	93
Abbildung 18: Reaktionsmechanismus von Lucigenin nach Reduktion durch Superoxid	96
Abbildung 19: Exemplarisches Chromatogramm einer Allicinsynthese nach Aufreinigung	99
Abbildung 20: Beispiel für eine Kalibration des Glutathion-Reduktase-Assays	101
Abbildung 21: Vergleich der Wirkung von Allicin auf verschiedene Glutathion-mutanten und den Wildtyp BY4742	104
Abbildung 22: Effekt einer AIF-Deletion auf die Überlebensrate nach Behandlung mit H ₂ O ₂ , Knoblauchsaff (K) und chemisch synthetisiertem Allicin (A)	105
Abbildung 23: Effekt einer Bcl _{XL} Expression auf die Überlebensrate von Hefezellen nach Behandlung mit Allicin und H ₂ O ₂ im Vergleich mit einer inaktiven Variante des Bcl _{XL} Proteins (ΔC)	107
Abbildung 24: Actin-Cytoskelett nach Färbung mit Phalloidin-Alexa 488	109
Abbildung 25: Empfindlichkeit der Δ <i>ras2</i> Mutante gegenüber Allicin im Vergleich zum Wildtyp BY4742	110
Abbildung 26: Empfindlichkeit der Δ <i>pde2</i> Mutante gegenüber Allicin und H ₂ O ₂ im Vergleich zum Wildtyp BY4742	111
Abbildung 27: Hemmhoftest mit den unterschiedlichen PKA-Untereinheiten im Vergleich zum Wildtyp	112
Abbildung 28: Hemmhoftest mit den unterschiedlichen Δ <i>bcy1</i> Mutanten bei Behandlung mit H ₂ O ₂ und Allicin	113
Abbildung 29: Droptest von allen Protein-Kinase A Untereinheiten 16 h nach Behandlung mit 5 mM H ₂ O ₂ oder 0,31 bzw. 0,62 mM Allicin	114

Abbildung 30: Droptest von den unterschiedlichen zur Verfügung stehenden $\Delta bcy1$ Mutanten 5 mM H_2O_2 oder 0,31 bzw. 0,62 mM Allicin	115
Abbildung 31: Wachstumskinetik der unterschiedlichen PKA-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp nach Behandlung mit Allicin und H_2O_2 als Positivkontrolle.....	117
Abbildung 32: Vergleich des Nettowachstums der unterschiedlichen Hefekulturen in Abhängigkeit von der Allicin-exposition	119
Abbildung 33: Vergleich des Nettowachstums der unterschiedlichen Hefekulturen nach Behandlung mit H_2O_2	120
Abbildung 34: Akkumulation von Reaktiven Sauerstoffspezies 3 Stunden nach Allicin-Behandlung	122
Abbildung 35: Etablierung der ROS-Messung mittels Lucigenin, indem den Zellen Naphthochinon als Superoxid-formierendes Agens zugesetzt wurde	123
Abbildung 36: Kinetik der ROS-Akkumulation nach Allicinbehandlung im Lucigenin-Assay	124
Abbildung 37: Empfindlichkeit von Mutanten, die im ROS-Metabolismus beeinflusst sind, gegenüber Allicin	125
Abbildung 38: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der AIF-Translokation nach Behandlung mit Allicin und H_2O_2	127
Abbildung 39: Lokalisation des AIF-Proteins nach Behandlung mit Allicin oder Wasserstoffperoxid als Positivkontrolle	128
Abbildung 40: Versuch zur Klärung der Frage, ob die AIF-GFP-Konstrukte als funktionale Überexpressionen des AIF1 Proteins in Hefe verwendet werden können	130
Abbildung 41: Einfluss einer AIF1-Überexpression auf den H_2O_2 - und Allicin-induzierten Zelltod sowie die modulierende Rolle der PKA auf diesen Effekt	131
Abbildung 42: Allicin induziert Kernfragmentierung in einer von PKA regulierten Weise	133
Abbildung 43: Änderung der Expression von <i>OSI1</i> (YKL071) nach Behandlung mit Allicin (100 μ M) bei einer Inkubationsdauer von einer Stunde	134
Abbildung 44: Nukleotidsequenz von <i>OSI1</i> plus 1 kb vor dem Startcodon ATG und 1 kb nach dem Stoppcodon.....	135
Abbildung 45: Aktivität des <i>OSI1</i> -Promoters nach Behandlung mit verschiedenen oxidativen Stressoren, gemessen anhand der Lichtemission durch Luciferase.....	136
Abbildung 46: Aktivität des <i>OSI1</i> -Promoters nach Behandlung mit verschiedenen oxidativen Stressoren im $\Delta yap1$ -Hintergrund, gemessen anhand der Lichtemission durch Luciferase	137
Abbildung 47: Testung der Empfindlichkeit der <i>osi1</i> Mutante und einer <i>OSI1</i> -Überexpressionslinie hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegen Allicin und Wasserstoffperoxid im Hemmhoftest	139
Abbildung 48: Allicin und H_2O_2 führen zu einer erhöhten Rate an kernlokalisiertem YAP1	140
Abbildung 49: Unterschiedliche Anfälligkeit der $\Delta yap1$ Mutante im Vergleich zum Wildtyp gegen Allicin und H_2O_2 im Hemmhoftest	141
Abbildung 50: Vergleich der Wirkung von Allicin auf verschiedene Thioredoxinmutanten und den Wildtyp BY4742	142
Abbildung 51: Fluoreszenzänderungen von Monobromobiman in verschiedenen Zelllinien nach Exposition mit Knoblauchsaff (A) und chemisch synthetisiertem Allicin (B).....	144
Abbildung 52: Akkumulation Reaktiver Spezies, getestet mit 2,7-Dichlorofluorescein-Diacetat (DCFDA)	146
Abbildung 53: Zellproliferation mittels 3H -Thymidin-Assay	148

Abbildung 54: MTT-Assay der unterschiedlichen getesteten Zelllinien bei Behandlung mit Knoblauchsaff bzw. Allicin	150
Abbildung 55: YOPRO-1 Assay zur Abschätzung der Apoptose-Induktion in Zelllinien nach Behandlung mit Knoblauchsaff bzw. synthetischem Allicin 30 Minuten (A + B) bzw. 60 Minuten (C+D) nach Behandlung	153
Abbildung 56: Zwischenstand des Modells der Wirkung von Allicin auf Hefezellen	184
Abbildung 57: BLAST-Analyse des YKL071w-Peptids	186
Abbildung 58: Erweiterung des Modells der Wirkung von Allicin auf Hefezellen.....	190
Abbildung 59: Korrelation zwischen Biman-Fluoreszenz und MTT-Absorption als Maß für die Überlebensrate von Zellen	194
Abbildung 60: Oxidationsprodukte der Oxidation von Proteinthiolen.	234
Abbildung 61: Postulierte Biosynthesemechanismen des Allicins	236
Abbildung 62: Schematische Übersicht über die bedeutendsten Abbauprodukte des Allicins	238
Abbildung 63: Übersicht über chemische Natur und Entstehung Reaktive Schwefelspezies..	242
Abbildung 64: Entstehung und Reaktionen des Thiylradikals	243

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über bedeutende redoxregulierende Enzymsysteme.....	28
Tabelle 2: Übersicht über identifizierte Hefehomologe von bedeutenden Apoptose-regulatoren (gemäß YEASTGENOME Datenbank)	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Tabelle 3: Lösungsmittelgradienten-programm bei der HPLC-Analyse von Allicin und Knoblauchsft.....	74
Tabelle 4: Typische Verdünnungen zur Kalibration des Bradford-Assay im Bereich von 0 bis 1 mg mL ⁻¹ BSA.....	76
Tabelle 5: Effekt von Allicinbehandlung auf den Glutathionpool des Hefestamms RS453. Die minimalen und maximalen Werte geben die Annahme wieder, dass die Zellen eine Vakuole mit einem angenommenen Zellvolumen von 20% haben oder dieses fehlt. Die maximale Auflösung dieses Testes, die Konzentrationsunterschiede zuverlässig wiedergeben kann, liegt bei 0,03 mM. Die dargestellten Werte sind gemittelt über vier unabhängige Replikate. Der Unterschied zwischen den Absolutkonzentrationen behandelter und unbehandelter Proben ist statistisch nicht signifikant (p<0,05). Werte mit unterschiedlichen Buchstaben repräsentieren statistische Unterschiede (p<0,05), bestimmt mittels One-way ANOVA (Holm-Šídák -Methode).	101
Tabelle 6: Effekt von Allicinbehandlung auf das elektrochemische Redoxpotential des Hefestammes RS453. Die minimalen und maximalen Werte geben die Annahme wieder, dass die Zellen eine Vakuole mit einem angenommenen Zellvolumen von 20% haben oder dieses fehlt. Die dargestellten Werte wurden gemittelt über vier unabhängige Replikate. Der Unterschied zwischen den Absolutkonzentrationen behandelter und unbehandelter Proben ist statistisch nicht signifikant (p<0,05). Werte mit unterschiedlichen Buchstaben repräsentieren statistische Unterschiede (p<0,05), bestimmt mittels One-way ANOVA (Holm-Šídák-Methode).	102

Abkürzungsverzeichnis

AIF	Apoptosis inducing factor
ADP	Adenosin-Diphosphat
AMP	Adenosin-Monophosphat
AO	Acridinorange
ATP	Adenosin-Triphosphat
BSO	Buthionin-Sulfoximine
CSM	Complete Supplement Mixture
CYR	Adenylat-Cyclase
DAS	Diallylsulfid (S=1)
DADS	Diallyldisulfid (S=2)
DATS	Diallyltrisulfid (S=3)
DATTS	Diallyltetrasulfid (S=4)
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTNB	5,5-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure
EtOH	Ethanol
F-GSH-EE	Ethylester des Fluoresceinisothiocyanat-gelabelten Glutathions
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GFP	“green fluorescent protein” – Grün fluoreszierendes Protein
GDP	Guanosin-Diphosphat
GEF	Guanosinnucleotid-Exchange-Factor (Austausch von GDP durch GTP)
GR	Glutathione-Reductase
GRX	Glutaredoxin
GSH	Glutathion (reduziert)
GSSA	Allylmercaptoglutathion
GSSG	Glutathion-Dimer (oxidiert)
GTP	Guanosin-Triphosphat
IP ₃	Inositoltriphosphat

K	Kelvin
MeOH	Methanol
NMR	Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (Kernspinresonanzspektroskopie)
MOPS	3-(N-morpholino)propansulfonsäure
mV	Millivolt
PI	Propidium-Iodid
PKA	Protein-Kinase A
PLC	Phospholipase C
PNP	<i>p</i> -Nitrophenol
RAS	<u>R</u> at <u>S</u> arcoma Protein, kleines monomeres G-Protein
RNS	Reaktive Stickstoffspezies („Reactive Nitrogen Species“)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies („Reactive Oxygen Species“)
RSS	Reaktive Schwefelspezies („Reactive Sulfur Species“)
SOD	Superoxid-Dismutase
TNB	Thio-2-Nitrobenzoesäure
TRX	Thioredoxin
V	Volt
2-VP	2-Vinylpyridin

1 Einleitung

1.1 Alliin als Beispiel eines Redox-aktiven Naturstoffs.

Pflanzen sind als sessile Organismen auf eine effektive Abwehr gegen sowohl abiotische als auch biotische Stressoren angewiesen (Huey et al., 2002). Eine bedeutende Strategie in der Abwehr gegen biotische Stressoren wie Pathogene oder Fraßfeinde sind chemische Abwehrsubstanzen, die entweder nach einem Kontakt mit einem biotischen Stressor *de novo* synthetisiert werden (Phytoalexin) oder bereits vor einem Angriff in der Pflanze vorhanden sind bzw. ohne Energieaufwand aus inaktiven Vorstufen gebildet werden (Phytoanticipin) (Van Etten et al., 1994).

Die Knoblauchpflanze (*Allium sativum* L.) verfolgt die Strategie, dass sie nach Angriff durch einen Fraßfeind bzw. ein Pathogen aus einer inaktiven Vorstufe, der nichtproteinogenen Aminosäure Alliin ohne Aufwand von Energie die schwefelhaltige Substanz Allicin bildet. Somit stellt Allicin ein Phytoanticipin dar (Curtis et al., 2004). Als Thiosulfonat zeigt Allicin eine hohe Reaktivität gegenüber Thiolgruppen, indem die Thiolgruppen oxidiert werden. Diese Redox-Aktivität des Allicins wird als Grundlage für seine Vielfalt an biologischen Wirkungen angesehen. Deshalb werden zunächst einige grundsätzliche Fakten zur zellulären Redoxchemie genannt, die für das Verständnis der Wirkung von Allicin bedeutsam sind.

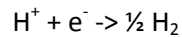
1.2 Grundsätzliche chemische und biochemische Mechanismen der Redoxregulation unter besonderer Berücksichtigung der Thiolgruppe.

1.2.1 Grundlagen der Redoxchemie der Zelle

Die Aufnahme und Abgabe von Elektronen – Reduktion und Oxidation – ist ein zentraler Aspekt für das Verständnis der Biochemie. Eine Vielzahl von Biomolekülen in der Zelle kann oxidiert oder reduziert werden und die biologische Funktion oder ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften gravierend verändert werden (Karlson et al., 1994). Aus diesem Grund muss eine Zelle die Bedingungen, unter denen Elektronenübertragungen geschehen können, genau kontrollieren und regulieren, damit nicht unerwünschte Veränderungen der Funktion von Biomolekülen durch Reduktion oder Oxidation erfolgen (Gruhlke und Slusarenko, im Druck).

Wenn Substanzen Redoxreaktionen eingehen, also chemische Reaktionen, bei denen ein Reaktand Elektronen abgibt, während der andere Reaktand Elektronen aufnimmt (Atkins, 2001), bilden die beiden Reaktanden der Redoxreaktion ein Redoxpaar. Welcher der Reaktanden im Zuge der Reaktion Elektronen abgibt und welcher Elektronen aufnimmt, wird beschrieben durch das Standardredoxpotential E^0 , das einen empirisch bestimmten Wert für die Affinität eines Elektronenakzeptors für die Aufnahme von Elektronen darstellt. Dieser Wert wird in Volt angegeben (Nelson und Cox, 2001). Dabei fließen Elektronen von Substanzen niedrigeren Redoxpotentials zu

Substanzen mit höherem Redoxpotential. Das Redoxpotential der Reaktanden hängt von der Aktivität der jeweilig beteiligten Reaktionspartner ab und entspricht annähernd der Konzentration der jeweils an der Reaktion beteiligten Moleküle (Karlson et al., 1994). Normalisiert wurden Redoxpotentiale auf die s.g. Wasserstoffelektrode, bei der die Halbzellreaktion die Reduktion eines Protons zu Wasserstoff darstellt:



Dieser Reaktion wurde der Wert 0 V zugewiesen. Weil eine Halbzellreaktion nicht für sich alleine ablaufen kann, ist sie – im Falle der standardisierten Halbzellelektrode – mit einer anderen Halbzelle verbunden, in der unter Standardtemperatur (298,15 K = 25°C) in Standardkonzentration (bei gelösten Stoffen 1 M, Gas bei einem Druck von 103,3 kPa = 1 Atmosphäre (atm)) reduzierte und oxidierte Spezies des zu untersuchenden Redoxpaares vorliegen. Es fließen in der Reaktion Elektronen von der Halbzelle des niedrigeren Redoxpotentials zu der Halbzelle höheren Redoxpotentials, so dass das Potential durch die sich zwischen den beiden Halbzellen aufbauende Spannung (in Volt) ausgedrückt werden kann. Dieser Wert wird als Standardredoxpotential (E°) bezeichnet.

Aufgrund der annähernden Abhängigkeit des Redoxpotentials von der Konzentration der beteiligten Reaktionspartner lässt sich die von Walter Nernst erstmalig beschriebene Gleichung, die als Nernst'sche Gleichung bekannt ist, aufstellen, die es erlaubt, bei Kenntnis der Konzentrationen der beteiligten Reaktionspartner, Temperatur, dem Standard-Redoxpotential des Redoxpaares und der Anzahl der übertragenen Elektronen, das Redoxpotential des Redoxpaares zu errechnen (Nelson und Cox, 2001).

An vielen biochemischen Redoxreaktionen sind Protonen beteiligt. Um ein Standardredoxpotential zu ermitteln, wäre es also *per definitionem* notwendig, die Messung bei einer Wasserstoffkonzentration von $c = 1$ M durchzuführen. Gemäß der Definition des pH-Wertes, der sich aus dem negativ dekadischen Logarithmus der Protonenkonzentration ergibt, würde diese Konzentration bedeuten, dass die Messung des Redoxpotentials bei einem $\text{pH}=0$ erfolgte. Eine Vielzahl von Substanzen, die in biochemische Prozesse eingehen, ist unter diesen Bedingungen nicht stabil, so dass der Nullpunkt der biochemischen Redoxskala auf einen pH-Wert von 7 bezogen worden ist. Daraus ergibt sich das biochemische Standardredoxpotential E'° , das eine Potentialdifferenz zum chemischen Standardredoxpotential von -143 mV aufweist (Karlson et al., 1994).

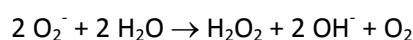
1.2.2 Oxidativer Stress und zelluläre Redoxregulation.

Eine Vielzahl biochemischer Prozesse basiert auf der Übertragung von Elektronen von einem Donator (=Reduktans; niedriges Redoxpotential) zu einem Elektronenakzeptor (=Oxidans; hohes Redoxpotential). Insbesondere im Bereich der Stoffwechselvorgänge des Energiemetabolismus sind solche Elektronenübertragungsprozesse, die einen reduzierten und einen oxidierten Partner einschließen und somit Redoxprozesse darstellen, von elementarer Bedeutung und für Lebensprozesse absolut unabdingbar.

Zwei zentrale Stoffwechselkaskaden seien in diesem Zusammenhang genannt: Zum einen die Photosynthese als *reduktiver Stoffwechselpfad*, der oxidierte Edukte (Kohlendioxid [CO₂] und Wasser [H₂O]) mit Hilfe von Elektronen, die durch Sonnenlicht in einen angeregten Zustand versetzt worden sind, zu reduzierten Produkten (Kohlenhydrate, v.a. Sucrose) umsetzt. Zum anderen die Atmungskette als *oxidativer Stoffwechselpfad*, inklusive der Glycolyse, dem Citratzyklus und der anschließenden oxidativen Phosphorylierungskaskade, wobei Elektronen aus reduzierten Spezies wie Kohlenhydraten auf s.g. Reduktionsäquivalente, vor allem NAD(P)⁺, übertragen werden.

Derartige Elektronenübertragungen stehen stets in der Gefahr, dass unerwünschte Seitenreaktionen ablaufen, indem Elektronen auf andere Substanzen als die in der Reaktion vorgesehenen Substrate übertragen werden. Zum optimalen Ablauf ist also die sowohl zeitlich wie räumlich optimale Verfügbarkeit von allen benötigten Substraten unerlässlich, um das Stattfinden von Nebenreaktionen zu vermeiden. Die wohl prominentesten Beispiele sind die Überreduktion des Sauerstoffs zu Superoxid am Komplex III der Atmungskette oder im Photosystem I der Chloroplasten in Pflanzen. Die Reaktion sieht vor, dass Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor die durch die Atmungskette geschleusten Elektronen aufnimmt und dabei mit Protonen zu Wasser reagiert. Stehen allerdings für diese Reaktion z.B. nicht ausreichend Protonen zur Verfügung, indem der Aufbau des Protonengradienten beispielsweise inhibiert wird, kommt es zu einem Elektronenstau – schließlich werden die sich in der Atmungskette stauenden Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen, was zur Bildung einer überreduzierten Form des molekularen Sauerstoffs, Superoxid, O₂⁻, führt (Karlson et al., 1994). Generell kann man festhalten, dass für derartige Seitenreaktionen besonders diejenigen Moleküle und Atome betroffen sind, die aufgrund ihrer physiko-chemischen Eigenschaften in der Lage sind, mehrere Redoxzustände einzunehmen. Die Bildung von Superoxid im Zuge der Atmung ist dabei ein normaler Prozess; eine einzelne menschliche Zelle produziert unter normalen metabolischen Bedingungen etwa 10¹⁰ Moleküle Superoxid pro Tag (lpi.oregonstate.edu/f-w97/reactive).

Superoxid ist ein sehr reaktives Molekül, das in der Lage ist, mit vielen Molekülen zu reagieren; dabei ist zu bedenken, dass Superoxid unter physiologischen Bedingungen ein starkes Reduktionsmittel darstellt. In Gegenwart von Wasser disproportioniert Superoxid zu Wasserstoffperoxid, Sauerstoff und Hydroxylionen nach folgender Gleichung:

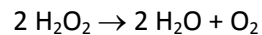


Um das hochreaktive Superoxid zu beseitigen, besitzen Zellen ein Enzym, das die Dismutation des Superoxids katalysiert, die Superoxid-Dismutase (SOD), deren Reaktionsprodukt Wasserstoffperoxid (H₂O₂), ein starkes Oxidationsmittel, ist. Wasserstoffperoxid ist langlebiger und somit einfacher nachweisbar als Superoxid ist, aber ebenfalls hoch reaktiv. Deshalb kann H₂O₂ Biomoleküle durch Oxidation verändern. Diese Veränderung von Biomolekülen, insbesondere von Proteinen und DNA, aber auch beispielsweise von Membranlipiden, hat weitreichende Konsequenzen für die Physiologie der Zelle.

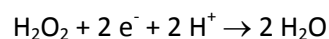
Aufgrund ihrer hohen Reaktivität werden derartige sauerstoffhaltige Verbindungen Reaktive Sauerstoffspezies (= „*Reactive oxygen species, ROS*“) genannt. Durch die Vielfältigkeit der möglichen

Schäden in der Zelle, die durch ROS bedingt werden können, haben Lebewesen verschiedene Schutzmechanismen gegen Reaktive Sauerstoffspezies entwickelt, die im Folgenden näher beschrieben werden sollen:

Der enzymatische Abbau der Reaktiven Sauerstoffspezies kann im Falle von Superoxid durch die Superoxiddismutase und im Falle von Wasserstoffperoxid durch die Catalase (CAT) katalysiert werden, die die Reaktion



katalysiert. Ferner ist ein Abbau von H_2O_2 durch Peroxidasen möglich, die nicht, wie Catalasen, die Dekomposition des H_2O_2 katalysieren, sondern die Reduktion des Peroxids (nicht nur H_2O_2 , sondern auch organische Peroxide (z.B. Lipidperoxide)), wofür die Bereitstellung von Elektronen durch verschiedene Elektronendonatoren (z.B. Glutathion) notwendig ist. Eine Möglichkeit der Klassifizierung von Peroxidasen erfolgt anhand der die Elektronen zur Verfügung stellenden Komponenten. Im Falle von Wasserstoffperoxid wäre die durch die Peroxidasen katalysierte Reaktion also:



Im Gegensatz zur direkten enzymatischen Beseitigung von ROS akkumulieren Zellen ferner Substanzen, die aufgrund ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften in hohem Maße mit ROS zu reagieren in der Lage sind, und somit die ROS abfangen und unschädlich machen. Sie sind insbesondere bedeutsam für oxidierende Vertreter der ROS wie H_2O_2 bzw. $\cdot\text{OH}$. Prominente Beispiele für solche *Antioxidantien* sind das Tripeptid Glutathion (γ -L-Glutamyl-L-cysteinylglycin, siehe Abschnitt 1.1.4.) und Ascorbat. Durch die Reaktion mit oxidierenden ROS werden die Antioxidantien selbst oxidiert, können aber durch zelluläre Reduktasen wieder in ihre reduzierte Form überführt werden. In lipophilen Kompartimenten kann Tocopherol (Vitamin E) als Antioxidans dienen, in vornehmlich hydrophilen Zellbereichen ist die Interaktion mit den Antioxidantien Glutathion und Ascorbat bedeutsam, deren Reaktionskaskade im s.g. Foyer-Halliwell-Asada Zyklus (Foyer und Noctor, 2005) beschrieben ist (siehe Abbildung 1).

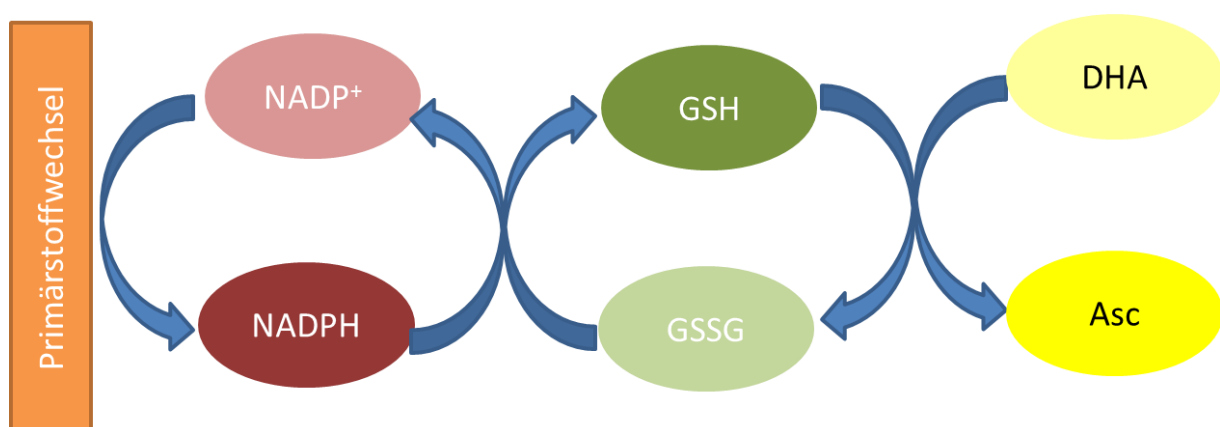


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Foyer-Halliwell-Asada Zyklus

Gekoppelt an den energieliefernden Primärstoffwechsel, bei dem Elektronen auf den Elektronencarrier NADP^+ übertragen werden, kann durch die Katalyse der Glutathionreduktase oxidiertes Glutathiondimer (GSSG) in seine reduzierte, monomere Form (GSH) überführt werden. Dieses kann entweder direkt mit ROS reagieren oder steht als Elektronendonator für die Dehydroascorbat-Reduktase zur Verfügung. Dehydroascorbat entsteht als Oxidationsprodukt bei der Reaktion von Ascorbat mit H_2O_2 , wobei H_2O_2 zu Wasser reduziert und somit detoxifiziert wird. (Aus Gründen der Vereinfachung wurde die Möglichkeit der Reaktion zu Monodehydroascorbat ausgelassen.)

Diese vielfältigen Detoxifizierungsmöglichkeiten, die Zellen im Zuge der Evolution gegen ROS entwickelt haben, machen deutlich, dass die Akkumulation von Redox-modulierenden Komponenten, insbesondere von oxidierenden Substanzen, eine Stresssituation für die Zelle darstellt. Diese Stresssituation wird *Oxidativer Stress* genannt und ist definiert als **eine Störung der Balance aus prooxidativen und antioxidativen Komponenten, bei der die Prooxidantien überwiegen, was zu einer potentiellen Schädigung der Einzelzelle oder des Gesamtorganismus führt (Sies, 1985).**

Neben ROS gibt es eine Vielzahl weiterer Substanzen, die in der Lage sind, in Zellen oxidativen Stress zu induzieren. Abgesehen von Sauerstoff können auch Stickstoff bzw. Schwefel reaktive Spezies produzieren, in Analogie zu den Reaktiven Spezies des Sauerstoffs. Bei der Detoxifizierung dieser Substanzklassen sind offenbar auch enzymatische Prozesse beteiligt.

1.2.3 Thiole sind ein zentraler Regulator der zellulären Redoxumgebung

Thiole („Schwefelalkohole“) sind reduzierte Schwefelverbindungen, die in einer Vielzahl von Biomolekülen (z.B. Coenzym A) von Bedeutung sind. Ferner weist die Aminosäure Cystein eine Thiolgruppe auf, bei Methionin ist diese als *Thioether* des Thiols modifiziert. Insbesondere bei Proteinen spielt die freie Thiolgruppe des Cysteins (die des Methionins aufgrund der geringeren Reaktivität der Methythioether in geringerem Umfang) für die Struktur (durch Bildung von Disulfiden) und die Katalysiefähigkeit von Proteinen (Netto et al., 2007) eine bedeutende Rolle. Die Ursache für die überragende Bedeutung von Thiolgruppen für die Funktion und Struktur von Proteinen ist in der Redoxaktivität der Thiolgruppe zu suchen, die wiederum in der redoxchemischen Variabilität des Schwefelatoms begründet liegt (Gruhlke und Slusarenko, 2012; Jocelyn, 1972). Schwefel gehört, wie Sauerstoff, zur Klasse der *Chalcogene*, der 16. Gruppe des Periodensystems. Obwohl sowohl Schwefel wie Sauerstoff 6 Valenzelektronen in der äußersten Schale aufweisen, kann Schwefel Oxidationsstufen von -2 bis +6 einnehmen, während Sauerstoff lediglich Oxidationsstufen zwischen -2 und 0 einnehmen kann. Aufgrund dieser Fähigkeit, eine Vielzahl unterschiedlicher Redoxzustände einzunehmen, wird Schwefel in der Literatur als *Redox-Chamäleon* bezeichnet (Jacob und Anwar, 2008). Die prominenteste Oxidationsreaktion von Thiolen ist die Ausbildung von Disulfiden, die sowohl bei Proteinen (dort insbesondere für die Ausbildung von Tertiärstrukturen) elementar ist. Die Ausbildung von Disulfiden kann dabei in zwei Mechanismen erfolgen, einerseits durch direkte Oxidation des Thiols, zum anderen durch Reaktion einer Sulfensäure (R-SOH) mit einem

Thiol unter Abspaltung von Wasser. In Bezug auf Proteinthiole unterscheidet man zwischen drei grundsätzlichen Formen der Disulfide:

Intramolekulare Disulfide werden gebildet durch Oxidation von Thiolen innerhalb eines Peptids bzw. Proteins; ihre Lage im Peptid ist bestimmt durch die Abfolge der Aminosäuresequenz (Primärstruktur). Intramolekulare Disulfidbrücken sind zentrale Regulatoren für die Protein-Tertiärstruktur. Ihre Ausbildung kann spontan geschehen oder vermittelt durch Katalyse einer Proteinfamilie, der Protein-Disulfid Isomerasen (PDI); diese Proteine können, je nach Lokalisation oder zellulärem Zustand Disulfide reduzieren, Thiole zu Disulfiden oxidieren oder Disulfide isomerisieren; im Endoplasmatischen Retikulum sind PDIs vornehmlich als Oxidasen bzw. Isomerasen aktiv, während in den Endosomen des Cytoplasmas oder membranlokalisiert PDIs als Reduktasen fungieren. Diese Proteinfamilie weist dabei eine geringe Spezifität hinsichtlich ihrer Substrate auf, so dass eine Vielzahl von Proteinen durch PDIs modifiziert werden kann (Fedoroff, 2006; Noiva, 1999). Im Falle einer oxidativen Aktivität der PDIs erfolgt die Oxidation des PDI-Proteins, das in einer Redoxreaktion Elektronen des Substratthiols übernimmt, durch das ERO1 Protein (Tu und Weissman, 2004; Tu und Anders, 1998). Unterbleibt die Proteinfaltung durch PDIs oder stehen Zellen unter starkem reduktiven Stress (z.B. durch Behandlung mit hohen Konzentrationen Dithiothreitol, DTT), so bilden sich typische Stresssymptome aus, die dem s.g. *unfolded protein response* zugeordnet werden. Dieser Stress wiederum induziert Proteine, die an der Faltung der Proteine (z.B. heat-shock proteins, HSPs) beteiligt sind (Travers et al., 2000).

Nicht nur für die Struktur von Proteinen kann die Ausbildung von Disulfiden entscheidend sein, sondern dieser Vorgang kann auch als Perzeptionsmechanismus für Redoxänderungen verwendet werden. Der bakterielle Transkriptionsregulator OxyR wird durch die Ausbildung eines Disulfides aktiviert (Zheng et al., 1998), ähnlich wie der YAP1-Transkriptionsfaktor in Hefe, auf den im Folgenden noch genauer eingegangen werden wird, oder der Transkriptionsregulator NRF2 (Fourquet et al., 2010).

Neben der Ausbildung intramolekularer Disulfide kann es auch zur Ausbildung von Disulfiden zwischen zwei unterschiedlichen Peptiden bzw. Proteinen kommen, der Bildung sogenannter intermolekularer Disulfide. Ein Beispiel für ein intermolekulares Disulfid ist das NPR1-Protein aus *Arabidopsis thaliana*, ein regulatorisches Protein der Abwehrgenexpression (Després et al., 2000). NPR1 liegt als über Disulfidbrücken verknüpftes Tetramer in nichtgestressten Zellen vor; in diesem Zustand ist NPR1 nicht in der Lage, in den Kern zu gelangen, um dort modulatorisch auf die Genexpression einzuwirken. Eine Reduktion der intermolekularen Disulfidbrücken ermöglicht es NPR1 in den Zellkern zu gelangen, wo es mit einem TGA-Transkriptionsfaktor interagieren und die Expression von Abwehrgenen regulieren kann (Despres et al., 2003; Després et al., 2000; Mou et al., 2003; Tada et al., 2008).

Gleichsam als Abwandlung des intermolekularen Disulfids kann das s.g. Mischdisulfid zwischen Proteinen und niedermolekularen, thiolhaltigen Verbindungen betrachtet werden. Beispielhaft und bedeutsam für diese Art der Disulfide ist der Prozess der Glutathiolierung (und in geringerem Umfang der Cysteinylierung), die das kovalente Binden des thiolhaltigen Tripeptids Glutathion an ein

Proteinthiol beschreibt und regulatorische und protektive Aufgaben am Thiol erfüllen kann (Dalle-Donne et al., 2007; Hill und Bhatnagar, 2012; Pastore und Piemonte, 2012; Zaffagnini et al., 2012).

Als oxidierte Spezies sind Disulfide selbst in der Lage, mit Thiolen ein Redoxpaar darzustellen und somit Redoxreaktionen einzugehen, wodurch das vormalige Thiol oxidiert wird, das Elektron an einen der beiden Partner des Disulfids abgegeben wird, so dass dieses reduziert wird. Diese Form der Redoxreaktion zwischen *Disulfid* und *Thiol* nennt man Thiol-Disulfid-Austauschreaktion (TDER) (für *thiol-disulfide exchange reaction*) (Jocelyn, 1972; Lumper und Zahn, 1965) (siehe Abbildung 2).



Abbildung 2: Prinzip der Thiol-Disulfid-Austauschreaktion mit einem Homodisulfid („symmetrisches Disulfid“)

Ein Thiolbestand (grün unterlegt) reagiert mit einem Homodisulfid (rot unterlegt), wobei es zu einer Übertragung des Elektrons des vormaligen Thiols kommt, wodurch ein Teil des vormaligen Disulfids zum Thiol reduziert wird, während das vormalige Thiol mit dem verbleibenden Teil des Disulfids ein Mischdisulfid ausbildet.

Ein Thiol (A) bildet mit einem Disulfid, das an einen Rest B gebunden ist, ein Redoxpaar; im Zuge der anschließenden Redoxreaktion reduziert das Thiol A das Disulfid unter Bildung eines Mischdisulfids mit A, während einer der an B gebundenen Schwefelatome zum Disulfid reduziert wird.

Bereits erwähnt worden ist, dass die Bildung von Disulfiden durch Protein-Disulfid-Isomerasen katalysiert wird und unter gewissen Bedingungen auch durch PDIs reduziert werden kann. Die Reduktion von Disulfiden kann ferner durch verschiedene Reduktasen geschehen, die verschiedene reduzierte Verbindungen als Elektronendonatoren verwenden können. Von besonderer Bedeutung für die Reduktion von Protein-Disulfiden sind Thioredoxine (TRX) und Glutaredoxine (GRX).

Thioredoxine sind kleine Proteine, deren Funktion eng an den Primärmetabolismus gekoppelt ist, in dem sie von spezifischen Reduktasen (Thioredoxin-Reduktasen) in Abhängigkeit von NADPH oder Ferredoxin reduziert werden (Balmer et al., 2004). Die Struktur von Thioredoxinen ist hoch konserviert und besteht aus vier parallel verlaufenden Alphahelices, die von fünf, ebenfalls parallelen Beta-Faltblattstrukturen umgeben werden (Buchanan und Balmer, 2005).

Glutaredoxine sind ebenfalls kleine Proteine (üblicherweise ~170 Aminosäuren; (Rouhier et al., 2008)), die im Gegensatz zu Thioredoxinen nicht NADPH als Elektronenquelle, sondern Glutathion als primäre Elektronenquelle verwenden. Dabei ist das GRX-System auf die Regeneration des Glutathions durch Glutathion-Reduktasen angewiesen, die GSSG NADPH-abhängig zu GSH reduzieren.

Cystein ist in vielerlei Hinsicht in der Lage, die Funktion von Proteinen zu regulieren, indem es Einfluss nimmt auf die Protein-Konformation, die Koordinierung von Metallen, die als Cofaktor dienen (beispielsweise Zink) oder im aktiven Zentrum der Proteine vorkommt und für die katalytische Aktivität notwendig ist (Nagahara, 2011b; Nagahara et al., 2009a, b). Enzyme, die katalytisch wichtige Cysteinreste in ihrem aktiven Zentrum aufweisen, werden Thiolenzyme (*ibid.*) genannt. Thiolenzyme sind somit grundsätzlich redox-aktiv; die Cysteine in Thiolenzymen weisen üblicherweise einen

niedrigen pK_a -Wert auf, so dass sie leicht Elektronen abgeben bzw. aufnehmen; somit sind derartige katalytische Cysteine typisch für Oxidoreduktasen, aber auch die hohe Reaktivität nucleophiler Cysteine findet Anwendung in Transferasen (z.B. Desulfurasen, Phosphatasen), Hydrolasen (Caspasen und andere Proteasen) und Isomerasen (PDIs) (Nagahara, 2011a).

Da die Aktivität von Proteinen in verschiedener Weise vom Redoxzustand des Proteins abhängig ist (beispielsweise durch Bildung von Disulfiden oder dem Lösen von komplexiertem Zink), kann das zelluläre Reduktionspotential als eine treibende Kraft angesehen werden, die ein *zelluläres Schaltbrett* betätigt (Schafer und Buettner, 2001). Eine im Nanobereich, durch Redoxmechanismen betriebene strukturelle Konformationsänderung (z.B. die Ausbildung einer Disulfidbrücke), die sich auf die Aktivität des Proteins auswirkt, wird *Nanoswitch* genannt (Paget und Buttner, 2003; Schafer und Buettner, 2001). Diese Änderung der Proteinfunktion durch redoxgetriebene Nanoswitches korreliert mit der Änderung des physiologischen Zustandes der Zelle, so dass mit Hilfe des Redoxpotentials der Zustand der Zellen abgeschätzt werden kann (Gruhlke et al., 2011; Schafer und Buettner, 2001) (siehe Abbildung 3); während im vollständig reduzierten Zustand die Zelle proliferiert, ändert sich der Zustand mit zunehmendem Oxidationsgrad über Differenzierung hin zu Apoptose und schließlich Nekrose als Form des Zelltods.

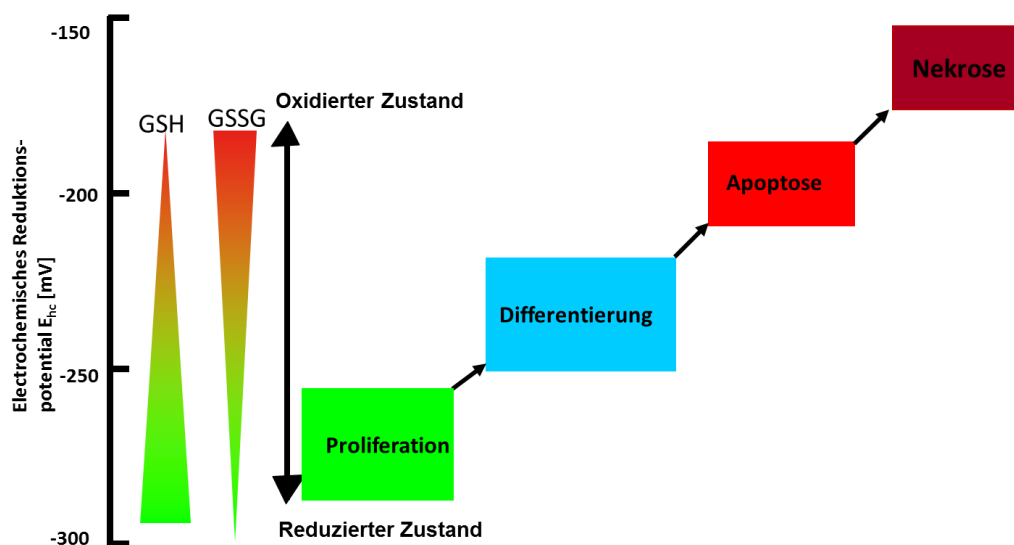


Abbildung 3: Der physiologische Status der Zelle ist abhängig vom Glutathion-definierten Redoxpotential der Zelle.

Der physiologische Zustand von Zellen ist in hohem Maße abhängig vom elektrochemischen Redoxpotential, das definiert wird über die absoluten Konzentrationen von reduziertem (GSH) und oxidiertem Glutathion (GSSG). Während im hochreduzierten Zustand sich die Zellen im Zustand der Proliferation befinden, gehen Zellen mit zunehmendem Grad an Oxidation über den Zustand der Differenzierung in den Zelltod mit Apoptose bzw. Nekrose über. Eine Vorhersage des physiologischen Zustandes ist über das jeweilige Redoxpotential möglich (verändert nach (Gruhlke et al., 2011).

In Abhängigkeit vom Glutathion-definierten Redoxpotential der Zelle ändert sich der physiologische Zustand der Zelle; während unter vollständig reduzierten Bedingungen die Zelle sich im Zustand der Proliferation (Zellteilung) befindet, geht die Zelle im mehr oxidierten Zustand in die Differenzierung über. Eine weitere Erhöhung des Oxidationsgrades führt zum Übergang in den Zelltod durch

Schädigung der Zellen, zunächst apoptotischer Natur, schließlich nekrotischen Zelltod (verändert nach (Gruhlke et al., 2011)).

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Reaktive Schwefelspezies (RSS) sind in der Lage, die Bildung von Mischdisulfiden (auch Adduktbildung) zu induzieren. Reaktive Stickstoffspezies führen im Gegensatz dazu zu einer Nitrosylierung des Thiols, deren komplexe Folgereaktionen ebenfalls zu höheren Oxidationsstufen des Thiols weiterreagieren können (Anand und Stamler, 2012). Ein Überblick über höhere Oxidationsstufen des Disulfids ist im Anhang gegeben unter Punkt 7.1.2.

Die Vielfältigkeit der Oxidationsprodukte, an deren Reduktion das Thioredoxin- bzw. Glutaredoxinsystem beteiligt ist, erklärt die Vielzahl von Vertretern dieser Enzymfamilien in unterschiedlichen Organismen. Die folgende Tabelle (Tabelle 1) gibt eine Übersicht über die verschiedenen redoxregulierenden Enzymsysteme:

Tabelle 1: Übersicht über bedeutende redoxregulierende Enzymsysteme

Die Komplexität der unterschiedlichen Enzymsysteme ist verschieden ausgeprägt. Während die Glutathionreduktasen bzw. Sulfiredoxine die geringste Anzahl Vertreter dieser Enzymfamilien aufweisen, ist die höchste Komplexität bei Thioredoxinen zu beobachten. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl von Proteinen an, deren Homologie eine Funktion innerhalb der jeweiligen Klasse nahelegt, deren enzymatische Aktivität aber nicht notwendigerweise gezeigt worden ist.

Dabei reduzieren die unterschiedlichen Enzymfamilien verschiedene Substrate, die entweder mit der Entgiftung von redoxaktiven Verbindungen (z.B. Peroxiredoxinen, die dem Namen entsprechend Peroxide reduzieren) oder oxidierte Biomoleküle reduzieren (z.B. Proteine durch Glutaredoxine, Thioredoxine, Sulfiredoxine bzw. Glutathion im Fall von Glutaredoxinen). Die Liste ist verändert nach Gruhlke und Slusarenko, (2012).

		Glutathion Reduktase	Glutaredo xine	Thioredoxin	Sulfiredoxin	Peroxiredoxin
Komple xität der Familie	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	8	3	1	7
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2	31	46	1	8

	<i>Homo sapiens</i>	1	13	16 (29)	1 (2)	6 (19)
Funktion		Reduktion von oxidiertem Glutathion (GSSG); Mutation beim Menschen führt zu hämolytischer Anämie	Reduktion von Disulfiden	Reduktion von Disulfiden	Reduktion von überoxidierten Sulfinsäuren (meist in Peroxiredoxinen)	Hauptsächlicher Detoxifizierungsmechanismus von Per-oxiden
Reduktant		NADPH	GSH	Thioredoxin-Reduktasen, die NADPH abhängig reduziert werden und Sulfensäuren	ATP	ATP
Substrat(e)		GSSG	R-S-S-R	R-S-S-R, RSOH	R-S(O) ₂ H	Peroxide
Mechanismus		FAD-haltiges Enzym, das als Dimer aktiv ist. FAD wird zum FADH-Anion reduziert, das wiederum das katalytische Disulfid der GR reduziert, das in einem Thiol-Disulfid-Austauschmechanismus GSSG zu GSH reduziert.	Reduktion eines katalytischen Disulfids im Glutaredoxin durch Glutathion in einem Thiol-Disulfid-Austausch, wobei die Reduktion des Substratdisulfids ebenfalls im ThiolDisulfid-Austauschmechanismus erfolgt.	Reduktion eines katalytischen Disulfids im Thioredoxin durch Thioredoxin-Reduktase, wobei diese wiederum durch NADPH reduziert wird.	Für Arabidopsis ist bekannt, dass SRX Cystein-Sulfinsäuren ATP-abhängig unter Zuhilfenahme eines noch nicht identifizierte n Thiol-Cosubstrates reduziert werden.	Das katalytische Cystein reagiert mit Peroxiden, wobei der Cysteinrest zu Sulfensäure umgesetzt wird, deren Regeneration durch Thioredoxine erfolgt. Eine weitere Reaktion mit Peroxiden führt zur Bildung von Sulfinsäuren als Überoxidaionsprodukt, die durch Sulfiredoxine zur Sulfensäure reduziert wird, so dass ein TRX-abhängiges Recycling möglich ist.

1.2.4 Zur Biochemie und Biologie des Glutathions als bedeutendstem Nicht-protein-Thiol.

Glutathion ist hinsichtlich seiner Konzentration die bedeutendste nicht-proteingebundene Thiolkomponente der Zelle. Die Biosynthese des Glutathions läuft unabhängig von den Ribosomen in zwei ATP-abhängigen Katalyseschritten (Meyer und Hell, 2005) ab. Das erste Enzym katalysiert ATP-abhängig die Bindung von Glutamat an Cystein. In Hefe trägt das Protein die Bezeichnung GSH1, in Arabidopsis ebenfalls GSH1 bzw. γ -ECS oder GCL; in Menschen wird das Enzym durch zwei Untereinheiten GCLC (für die katalytische Untereinheit) und GCLM (für die regulatorische Untereinheit) gebildet, wobei M hier für *modifier* steht (Lu, 2009). Es entsteht das Zwischenprodukt γ -Glutamylcystein (γ -GC). In manchen Prozessen kann γ -GC das Endprodukt Glutathion ersetzen, insbesondere in der Detoxifizierung von ROS (Quintana-Cabrera et al., 2012), wenngleich angenommen wird, dass die Reaktivität des Cysteins in γ -GC geringer ist als die des Glutathions.

In einem zweiten Schritt wird durch das Enzym Glutathion-Synthetase (in Hefe GSH2; bei Menschen auch GSS) ebenfalls ATP-abhängig Glycin an das γ -ECS gebunden (Meister, 1995b).

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Glutathionsynthese ist die durch das GSH1-Enzym regulierte Reaktion von Glutamat und Cystein (Hicks et al., 2007). Daher ist die Regulation insbesondere dieses Enzyms von großer Bedeutung; das GSH1 Enzym zeigt zwei unterschiedliche Mechanismen, über die es reguliert wird, nämlich auf der transkriptionellen Ebene und, zumindest bei Säugetieren und Pflanzen, auf dem posttranslationalen Weg.

Die Transkription von *GSH1* wird in *Saccharomyces cerevisiae* über den YAP1-Transkriptionsfaktor reguliert, der als der zentrale Regulator der oxidativen Stressantwort in Hefe gilt (vgl. Kapitel 1.2.3.). Dabei wird YAP1 unter oxidativen Bedingungen durch die Ausbildung von Disulfidbrücken aktiviert; das bedeutet, dass die Transkription von Glutathion unter oxidierenden Bedingungen stimuliert wird.

Ähnlich verhält es sich in menschlichen Zellkulturen, wo die Glutathionbiosynthese unter der Kontrolle des NRF2/KEAP Systems steht, das in Analogie zum YAP1-Transkriptionsfaktor durch oxidierende Bedingungen aktiviert wird und somit die Transkription von Redox-assoziierten Genen stimuliert durch Bindung an s.g. ARE (*Antioxidant Response Elements*), so auch die für γ -Glutamylcysteinligase kodierenden Gene.

In Arabidopsis scheinen TGA-Transkriptionsfaktoren für die Regulation des Glutathion-Metabolismus von Bedeutung zu sein.

Während eine Regulation auf transkriptioneller Ebene noch Transkription und Translation voraussetzt und somit erst zeitverzögert eine Antwort auf einen Stimulus ermöglicht, ist eine posttranslationale Regulation der Enzymaktivität deutlich schneller, weil dabei keine neue Proteinbiosynthese erforderlich ist, sondern die Aktivität vorhandener Proteine wird stimuliert. Für Arabidopsis ist gezeigt worden, dass die Enzymfunktion des GSH1 Proteins durch oxidative Bedingungen stimuliert wird, vermittelt durch die Bildung eines intramolekularen Disulfids (Hicks et al., 2007; Jez et al., 2004; May und Leaver, 1993). Auch in *Drosophila melanogaster* und menschlichen Zellen ist gezeigt worden, dass die Ausbildung eines Disulfids (hier allerdings ein intermolekulares Disulfid zwischen der katalytischen und der regulatorischen Untereinheit des GSH1-

Komplexes) die enzymatische Aktivität des Proteins posttranslational reguliert (Fraser et al., 2003; Fraser et al., 2002; Seelig et al., 1984; Tu und Anders, 1998). Dieser Mechanismus ist womöglich mit dafür verantwortlich, dass oxidativ wirksame Substanzen zu einer Erniedrigung des zellulären Redoxpotentials führen (obwohl sie prooxidativ wirken), indem die Glutathionbiosynthese durch Oxidation des GSH1 Enzyms stimuliert wird (Gruhlke und Slusarenko, im Druck).

Die molekularen Funktionen des Glutathions sind vielfältig und erklären extreme Phänotypen von Mutanten in Glutathionstoffwechsel bzw. von Zellen, die mit Inhibitoren des Glutathionstoffwechsels behandelt worden sind; so sind in Arabidopsis eine Reihe von Mutanten im *GSH1* Gen bekannt, die sich hinsichtlich des Ausmaßes des Phänotyps in Abhängigkeit von der Stärke der Mutation (und damit der Menge an Glutathion in der Zelle) unterscheiden. Die *cad2* Mutante wurde initial aufgrund einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber Cadmium identifiziert und weist im Vergleich zum Wildtyp etwa 60 % an Gesamtglutathion auf (Cobbett et al., 1998). In einem Screening, bei dem nach Mutanten gesucht wurde, die in ihrer Akkumulation von Phytoalexinen (Abwehrsubstanzen gegenüber Pathogenen, die unter Energieaufwand nach einem Pathogenbefall *de novo* gebildet werden (Mansfield, 2000)), beeinflusst sind, wurde die *pad2* (für *Phytoalexin deficient*) entdeckt (Glazebrook und Ausubel, 1994) und wurde als Mutante im *GSH1*-Gen identifiziert (Parisy et al., 2006). Diese Mutante zeigt ein verändertes Verhalten gegenüber Pathogenen (Parisy et al., 2006; Roetschi et al., 2001), gegen Herbivorangriffe (Schlaeppli et al., 2008) und eine geringere Resistenz gegenüber oxidativem Stress (Dubreuil-Maurizi et al., 2011). Ferner führt eine Behandlung von Arabidopsis mit BSO (Buthionin-sulfoximine), einem spezifischen Inhibitor des GSH1-Enzyms, zu einer verringerten Resistenz gegenüber Ozon (Yoshida et al., 2009). Die stärkste Mutante des *GSH1* Gens, *rml1* (für *root meristemless*) zeigt, wie der Name es bereits andeutet, einen starken Entwicklungsphänotyp, indem die postembryonale Wurzelentwicklung vollständig ausbleibt, dadurch bedingt, dass die Pflanze nicht in der Lage ist, das Wurzelapikalmeristem zu erhalten (Cheng et al., 1995; Vernoux et al., 2000).

In Hefe zeigen $\Delta gsh1$ -Mutanten ebenfalls extreme Phänotypen. In Glutathion-freiem Medium sind sie nicht lebensfähig, ein Umstand, der damit gedeutet wird, dass Glutathion notwendig ist für die Synthese von essentiellen Eisen-Schwefel Clustern (Kumar et al., 2011). Ferner zeigen $\Delta gsh1$ Zellen eine verringerte Resistenz gegen Metalle wie Cadmium oder Nickel (Bishop et al., 2007; Serero et al., 2008), sind in der respiratorischen Atmung betroffen (Dimmer et al., 2002) und weisen allgemein eine verringerte Resistenz gegenüber oxidativem Stress auf (Grant et al., 1996b; Izawa et al., 1995; Stephen und Jamieson, 1996).

Eine Behandlung von Säugetierzellen mit Buthionine-Sulfoximine (BSO) führt zu einer Verringerung des Glutathionpools (Griffith, 1982; Meister, 1995a); dadurch kommt es zu einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber ROS und der Induzierbarkeit von Apoptose (Armstrong et al., 2002).

Trotz der hohen Bedeutung für den Organismus werden in Hefe, Arabidopsis und Mensch sowohl GSH1 (im Falle des Menschen je ein Gen für die katalytische und eines für die regulatorische Untereinheit) als auch GSH2 nur von einem einzelnen Gen codiert.

Auch eine Mutation im *GSH2* Gen hat für Organismen gravierende Auswirkungen. Die meisten bislang isolierten *gsh2*-Mutanten in *Arabidopsis* waren embryolethal, vermutlich aufgrund einer Hyperakkumulation des Glutathionvorläufers γ -GC (Pasternak et al., 2008).

In Hefe sind ebenfalls deutliche Phänotypen zu beobachten, so eine verringerte Resistenz gegen Cadmium, verschiedene Antibiotika (Cycloheximide bzw. Streptomycin) und eine generell verringerte Resistenz gegenüber Toxinen (Alamgir et al., 2010a, b; Serero et al., 2008; Willingham et al., 2003).

Diese Befunde machen die außerordentliche Bedeutung des Glutathions als zentralem Redoxpuffer für den Organismus deutlich; die Umsetzung in eine physiologische Antwort ist korreliert mit dem Begriff des „Thiolstat“ (Jacob, 2011), der im Folgenden näher diskutiert werden soll.

1.2.5 Der Thiolstat als physiologische Größe und seine Regulation mittels des „Redox-Switch“ Konzeptes

Im vorangegangenen Kapitel ist erläutert worden, dass insbesondere Cysteinreste sensitiv gegenüber Änderungen der Redoxbedingungen sind. Der Oxidationszustand ist weitgehend vom Redoxpotential der umgebenden Bedingungen abhängig. Dabei wird die Redoxumgebung definiert als die Summe der Produkte des Reduktionspotentials der unterschiedlichen, miteinander in Verbindung stehenden Redoxpaare, die in einem biologischen System (Organell, Zelle, Gewebe) zu finden sind und erlauben eine Aussage über die reduzierende Kapazität der unterschiedlichen Redoxpaare (Schafer und Buettner, 2001). Mathematisch lässt sich dieser einfache Zusammenhang folgendermaßen ausdrücken:

$$\sum_{i=1}^{n(\text{Redoxpaare})} E_i \cdot [\text{reduzierte Spezies}]_i$$

Dabei ist E_i das Halbzellpotential eines bestimmten Redoxpaares und $[\text{reduzierte Spezies}]_i$ steht für die Konzentration von reduzierter Spezies im jeweiligen Redoxpaar.

Es wurde bereits erwähnt, dass Thiole, die insbesondere durch die Aminosäure Cystein bereitgestellt werden, von besonderer Bedeutung für die Redoxbiochemie der Zelle sind; das Redoxpaar weist ein Halbzellpotential Cystein/Cystin von -220 mV auf (Jocelyn, 1967). Bei höheren Reduktionspotentialen liegt das Gleichgewicht eher auf der Seite des Cystins (also im oxidierten Zustand), bei niedrigeren Redoxpotentialen eher auf Seite des Cysteins (also im reduzierten Zustand). Allerdings, insbesondere bei Proteinthiolen, ist das Halbzellpotential nicht nur vom Redoxpotential des umgebenden Systems abhängig, sondern auch vom pK_a der umgebenden funktionellen Gruppen, die ebenfalls Dissoziation und damit das Redoxverhalten von Thiolgruppen beeinflussen (Nagy, 2013). Dabei stehen die unterschiedlichen Redoxpaare in einem engen Verhältnis zueinander; Glutathion ist über die Glutathionreduktase an das $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ -Redoxpaar gekoppelt und Proteinthiole über das Glutaredoxin-System an das Glutathion-System und über Thioredoxine an das $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ System. Weil der Redoxhaushalt mit Glutathion verknüpft ist und weil Glutathion der hinsichtlich seiner

Konzentration bedeutendste Nicht-Protein-Thiol Redoxfaktor ist, kann über das GSH/GSSG Redoxpaar auf die Redoxumgebung der Zelle geschlossen werden:

$$E_{hc} = -240 \text{ mV} + \left[\left(\frac{59,1 \text{ mV}}{2} \right) \log \frac{[GSSG]}{[GSH]^2} \right]$$

Diese Formel ist eine Vereinfachung der allgemeinen Nernst'schen Gleichung und setzt einen pH=7 und 25°C voraus; dadurch vereinfacht sich der Term RT/nF auf den Ausdruck (59,1 mV/2), weil R als absolute Gaskonstante, T= 278,15 K, n=2 (für dieses Redoxpaar) und F als Faraday-Konstante konstant gehalten werden (Gruhlke und Slusarenko, im Druck; Schafer und Buettner, 2001).

Aufgrund des Umstandes, dass es im Zuge der Oxidation zu einer Dimerisierung durch Ausbildung eines Disulfids zwischen zwei Glutathionmonomeren kommt, geht in den auf dem Massenwirkungsgesetz basierenden logarithmischen Term die Konzentration des reduzierten Glutathions als Quadratausdruck in die Berechnung ein; das hat die Konsequenz, dass zur Bestimmung des Redoxpotentials nicht nur das Verhältnis zwischen GSH und GSSG eingeht, sondern die absoluten Konzentrationen von GSH und GSSG notwendig sind, um das Redoxpotential zu bestimmen; dass das Redoxpotential somit von der Gesamtkonzentration an Glutathion abhängig ist, zeigt Abbildung 4:

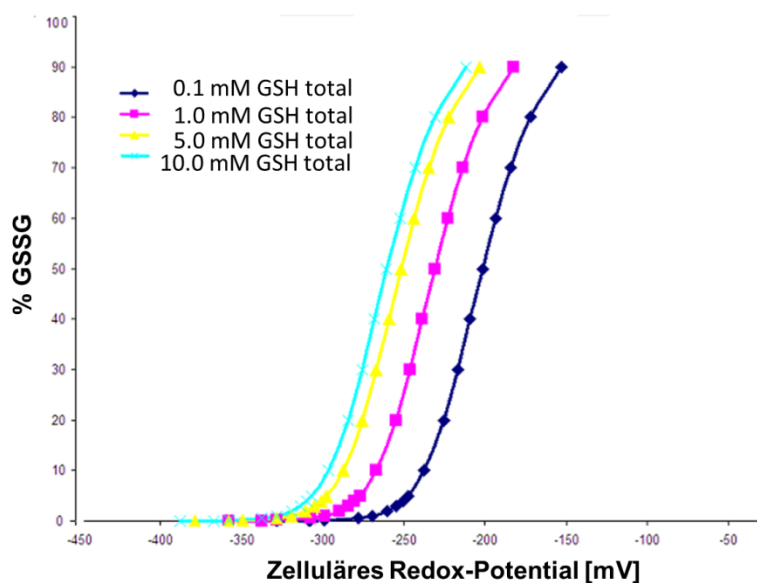


Abbildung 4: Abhängigkeit des zellulären Redoxpotentials von der Gesamtkonzentration an Glutathion

Reduziertes Glutathion (GSH) wird im Zuge der Oxidation dimerisiert zu GSSG. Deshalb geht das reduzierte Glutathion bei der Berechnung des Redoxpotentials als Quadratterm in die Nernst'sche Gleichung ein. Ursache dafür ist der Massenwirkungsgesetzesausdruck in der Nernst'schen Gleichung. (Verändert nach (Gruhlke und Slusarenko, im Druck))

Zentrales Stellglied der Zelle hinsichtlich der physiologischen Antwort auf Redoxänderungen sind Proteinthiole, deren Zustand aber, wie erwähnt, korreliert mit dem Redoxzustand der übrigen bedeutenden Redoxsysteme; diese stehen in besonderer Weise im Gleichgewicht zu Glutathion,

indem sie direkt über die TDER bzw. über GRX vermittelte Reaktionen den Oxidationszustand von Proteinthiolen beeinflussen (Gruhlke und Slusarenko, 2012; Gruhlke und Slusarenko, im Druck ; Paget und Buttner, 2003; Schafer und Buettner, 2001).

Daher kann eine Beeinflussung des Gleichgewichtes von GSH zu GSSG wie ein stufenloser Regulationsschalter angesehen werden; dabei wurde die Analogie zu einem Rheostat als einem stufenlos einstellbaren elektrischen Widerstand verwendet; so lässt sich der Begriff des Thiolstat verstehen (Jacob, 2011) (Siehe Abbildung 5).

Der „Thiolstat“ kann also definiert werden als Gesamtredoxzustand der Zelle, der im Gleichgewicht mit anderen Redoxpaaren steht, wobei das GSH/GSSG Redoxsystem aufgrund seiner hohen Abundanz als Indikator für alle zellulären Thiole und den Gesamtredoxzustand der Zelle dient (Gruhlke und Slusarenko, im Druck ; Jacob, 2011).

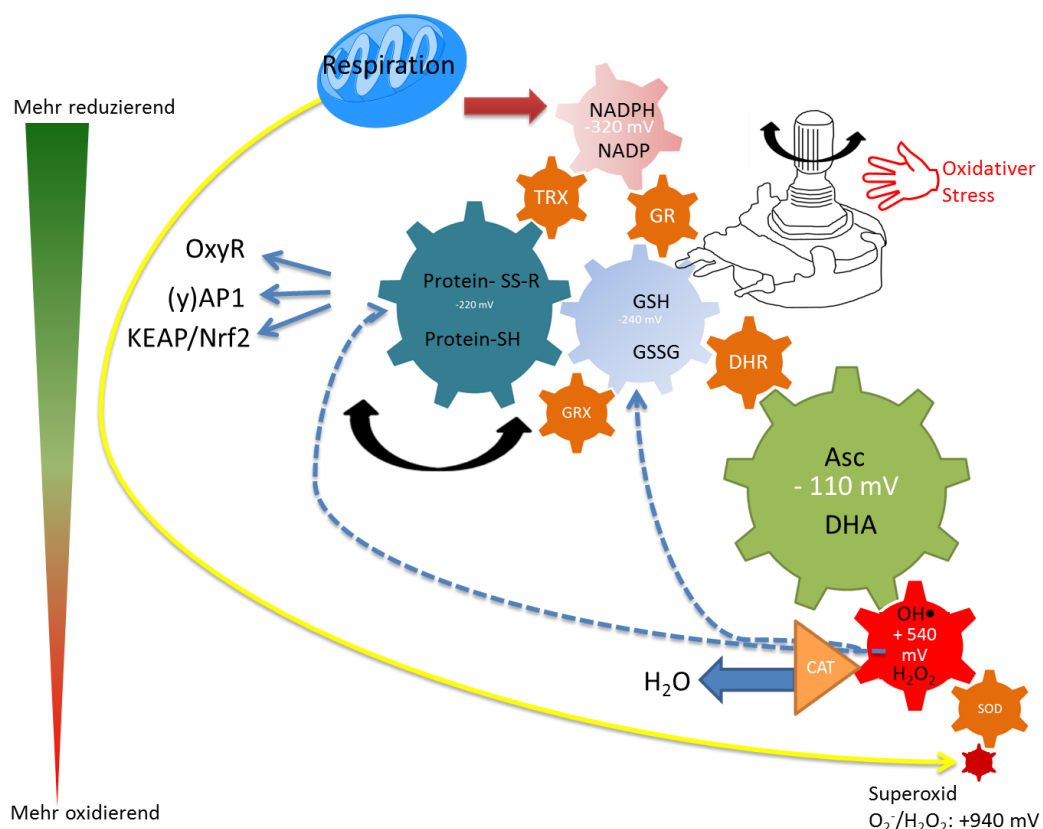


Abbildung 5: Illustration des Thiolstat als Regler am Glutathion

Die zellulären Redoxpaare stehen untereinander in Verbindung über enzymatische Systeme. Für die physiologische Antwort ist insbesondere der Redoxzustand von Proteinthiolen bedeutsam, weil über ihn Funktionen von Proteinen reguliert werden können. Glutathion steht in Beziehung zu den Proteinthiolen, entweder direkt über Thiol-Disulfid-Austauschreaktion oder enzymkatalysiert über Glutaredoxine (GRX). NADP⁺/NADPH als Redoxpaar mit einem niedrigeren Redoxpotential ist in der Lage, Glutathion durch Glutathion-Reduktase (GR) bzw. Cysteinreste von Proteinen durch Thioredoxine (TRX) direkt zu reduzieren. Dabei dient Glutathion als Elektronendonator für das Ascorbat/Dehydroascorbat-Redoxpaar ($E_{hc} = -110$ mV), katalysiert durch die Dehydroascorbatreduktase. Ascorbat ist insbesondere von Bedeutung bei der Detoxifizierung von H₂O₂, das wiederum das hauptsächliche Abbauprodukt von Superoxid beim Abbau durch die Superoxid-Dismutase darstellt; der hauptsächliche Entstehungsort für Superoxid ist der Primärmetabolismus, der auch das NADPH für den gesamten Redoxzyklus zur Verfügung stellt.

Eine wichtige Form der redoxvermittelten Aktivitätskontrolle von Proteinen, die bedeutsam ist für das Redox-Signalling, ist die Glutathiolierung als posttranslationale Modifikation, also das mittels einer Disulfidbrücke kovalente Anheften von Glutathion an Proteine (Dalle-Donne et al., 2009; Dalle-Donne et al., 2007). Die meisten Autoren verwenden für diesen Vorgang den Namen Protein-Glutathionylierung, was aber die Beteiligung eines Thiylradikals voraussetzen würde, die im Falle von Protein-Disulfid-Austauschreaktionen nicht gegeben ist (Gruhlke und Slusarenko, 2012).

Für die Glutathiolierung sind verschiedene Mechanismen denkbar: Neben der einfachen Thiol-Disulfid-Austauschreaktion, die entweder durch die Reaktion eines Proteinthiols mit GSSG bzw. eines Proteindisulfids mit GSH erfolgt, ist auch die Reaktion einer Sulfensäure mit einem Thiol als Entstehungsmechanismus denkbar. Ferner können auch nitrosylierte Thiolgruppen mit einem Thiol (wobei das Nitrosoglutathion insgesamt von großer physiologischer Bedeutung zu sein scheint (Singh et al., 1996)) zur Bildung eines derartigen Mischdisulfids führen (Feechan et al., 2005; Huang und Huang, 2002; Ji et al., 1999; Klatt et al., 1999; Li et al., 2001; Rustérucchi et al., 2007; Singh et al., 1996). Die Regeneration von glutathiolierten Proteinen erfolgt vornehmlich über Glutaredoxine (Dalle-Donne et al., 2009). Bedeutende Beispiele für die modulierende Wirkung von Protein-S-Glutathiolierung finden sich bei der Veränderung des humanen cJun, verbunden mit einer Inhibition der DNA-Bindeaktivität (Klatt et al., 1999). Auch die Glutathiolierung von Actin führt zu einer Beeinflussung der Polymerisierungstendenzen dieses Cytoskelettelements (Dalle-Donne et al., 2003; Eaton und Shattock, 2002; Fratelli et al., 2002; Fratelli et al., 2003; Fratelli et al., 2004). Eine Übersicht über eine Vielzahl weiterer durch Glutathiolierung modifizierter Proteine geben (Michelet et al., 2006). Aufgrund dieser Vielzahl von modifizierten Zielproteinen sowie des großen Einflusses, den diese Modifikation auf die Funktionsweise von Proteinen hat, wird die Bedeutung der Protein-S-Glutathiolierung mit der der Protein-Phosphorylierung verglichen (Ghezzi und Di Simplicio, 2009). Neben seiner regulatorischen Funktion dient die Protein-S-Glutathiolierung zugleich als Oxidationsschutz für Proteinthiole und hat somit auch eine protektive Funktion (Meyer und Hell, 2005).

Der Thiolstat ist also in zentraler Weise von Glutathion abhängig; in entsprechender Weise kann man drei Mechanismen postulieren, durch den der Thiolstat beeinflusst wird (nach (Gruhlke und Slusarenko, im Druck)):

a) Wirkungsweise durch einen direkten Redoxshift

Substanzen reagieren direkt mit Glutathion und führen so zur Oxidation von Glutathion.

b) Wirkweise durch Reduktion des Gesamtglutathionpools

Die auf die Zelle einwirkende Substanz geht entweder direkt oder durch die Katalyse von Glutathion-S-transferasen eine Reaktion ein, so dass entweder – weil die Cysteingruppe blockiert ist – das Glutathion nicht mehr als Redoxpuffer zur Verfügung steht oder aus der Zelle exportiert bzw. in die Vakuole verlagert wird, so dass das Glutathion der Zelle nicht zur Verfügung steht.

c) Wirkungsweise durch indirekten Redoxshift

Die auf die Zelle einwirkende Substanz führt entweder selbst aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften zur Akkumulation von Reaktiven Spezies, die den Redoxshift bewirken (z.B. Thiophene (Nwachukwu et al., 2012) oder Resveratrol (Escoté et al., 2012)). Die Wirkung der jeweiligen Substanzen ist somit indirekt.

Indem eine auf die Zelle wirkende Substanz in einer dieser Weise auf das Glutathiongleichgewicht bzw. den Glutathionpool (der bedeutsam ist für den Massenwirkungsgesetz-Ausdruck der Nernst'schen Gleichung) beeinflusst, sind Substanzen in der Lage, den Thiolstat zu modulieren und somit den physiologischen Zustand von Zellen zu beeinflussen.

1.2.6 Zelluläre Thiole und ihre Kinetik: Eine Ergänzung zum ausschließlich Redoxpotential-definierten „Thiolstat“

Im vorangegangenen Kapitel ist das Modell beschrieben worden, dass die Oxidation eines (Protein-)Thiols abhängig ist vom Redoxpotential der Umgebung. Dieser Umstand ist das Zentrum des Thiolstat-Konzepts. Nichtsdestotrotz beeinflussen weitere Faktoren die Oxidation von Thiolgruppen, so vornehmlich der pK_a -Wert des Thiols sowie der Grad an nukleophilen Eigenschaften. Indem der pK_a -Wert als Dissoziationskonstante des Thiols wichtig ist für die Oxidationsfähigkeit, besteht eine Abhängigkeit vom pH-Wert (Nagy und Ashby, 2005). Dabei kann der pK_a -Wert wiederum durch eine Vielzahl verschiedener Faktoren beeinflusst werden, so sterische Faktoren, die auf die Thiolgruppe einwirken (die vor allem bei Reaktion des S_N2 Typs von vorrangiger Bedeutung sind) (Bach et al., 2008) oder mechanische Kraft durch Aktivierung des Disulfids (Nagy, 2013).

Die Reaktionsgeschwindigkeit der Thiol-Disulfidaustauschreaktion



lässt sich als einseitige Reaktion somit wie folgt beschreiben:

$$\frac{d[RSSR']}{dt} = k[RSH][R'SSR''].$$

Unter physiologischen Bedingungen wird die Thiol-Disulfidaustauschreaktion als eine reversible Reaktion angesehen (Singh und Whitesides, 1993). Die obige Reaktionsgleichung lautet dann entsprechend:

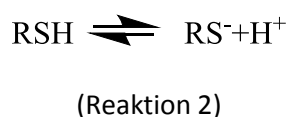


(Reaktion 1)

und für die Gesamtkinetik der Reaktion ist sowohl die Geschwindigkeit der Hin- als auch der Rückreaktion entscheidend

$$\frac{d[RSSR']}{dt} = k[RSH][R'SSR''] - k^{-1}[R''SH][RSSR'].$$

Da das Thiolat-Anion deutlich stärker nukleophil reagiert als das Thiol, ist für die Reaktivität und damit die Kinetik der TDER der pH-Wert entscheidend.



Die Reaktionskonstante K_a ist dabei gegeben durch:

$$K_a^{\text{RSH}} = \frac{[\text{RS}^-][\text{H}^+]}{[\text{RSH}]}$$

Daraus lässt sich ableiten, dass die Änderung der Konzentration des Disulfids in folgender Weise von pH-Wert abhängt (Nagy, 2013):

$$\frac{d[\text{RSSR}']}{dt} = k_2 \frac{K_a^{\text{RSH}}}{K_a^{\text{RSH}} + [\text{H}^+]} [\text{R}'\text{SSR}''] [\text{RSH}]_{\text{total}}$$

Daraus lässt sich ableiten, dass nicht nur das zelluläre Redoxpotential den Thiolstatus der Zelle bestimmt, sondern auch Faktoren, die in einem kompletten Kompartiment auftreten wie der pH Wert. Weiterhin sind auch zelluläre Faktoren wie funktionelle Gruppen daran beteiligt, in welcher Geschwindigkeit Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen stattfinden.

1.2.7 Allicin als Redox toxin und Vertreter Reaktiver Schwefelspezies – eine Übersicht

1.2.7.1 Biosynthese von Allicin und biologische Wirkungen

Seit frühesten Zeiten wird Knoblauch (*Allium sativum* L.) als Würz- und Heilpflanze genutzt und eingesetzt – so bereits in den frühen Hochkulturen des alten Ägyptens, Indiens und Chinas (Block, 2010). Auch in der Bibel findet Knoblauch bereits früh, in der Beschreibung der Ägyptischen Verbannung, im Buch Numeri (4. Buch Mose) Erwähnung (Num. 11,5). Nichtsdestotrotz waren die chemischen (und damit auch biologischen) Grundlagen der Allicinwirkung lange Zeit unbekannt. Erst im Jahr 1944 konnte die Substanz, die in frisch verletztem Knoblauchgewebe quantitativ (und auch biologisch) von vorrangiger Bedeutung ist, isoliert, die Struktur aufgeklärt und mit Allicin benannt werden (Cavallito und Bailey, 1944; Cavallito et al., 1944).

Allicin ist eine Organoschwefelverbindung, die zwei Schwefelatome enthält, die beide mit einer Allylgruppe verbunden sind. Eines der beiden Schwefelatome ist weiter oxidiert und mit Sauerstoff verbunden, so dass die Schwefelatome eine Thiosulfonatgruppe bilden – Allicin wird also in chemischer Nomenklatur als Diallylthiosulfonat bezeichnet. Dass es sich dabei formal nicht um ein „Disulfid-S-Monoxid“ handelt (siehe oben), wie es bei der Oxidation von Disulfiden z.B. durch ROS vorkommt, ist durch die Biosynthese des Allicins zu erklären:

Aufgrund dessen wird Allicin nicht in gesundem Gewebe gebildet, sondern nur in verletzten Zellen, bei denen Substrat und Enzym zusammenkommen können (vgl. Abbildung 6). Weil Allicin somit ohne zusätzlichen Energieaufwand aus der bereits vorhandenen, nicht antimikrobiell aktiven Vorstufe

Alliin gebildet wird, ist diese Substanz als Teil der präformierten Abwehr der Knoblauchpflanze gegen Pathogene und Herbivore anzusehen und somit Allicin als ein Phytoanticipin zu bezeichnen (Van Etten et al., 1994).

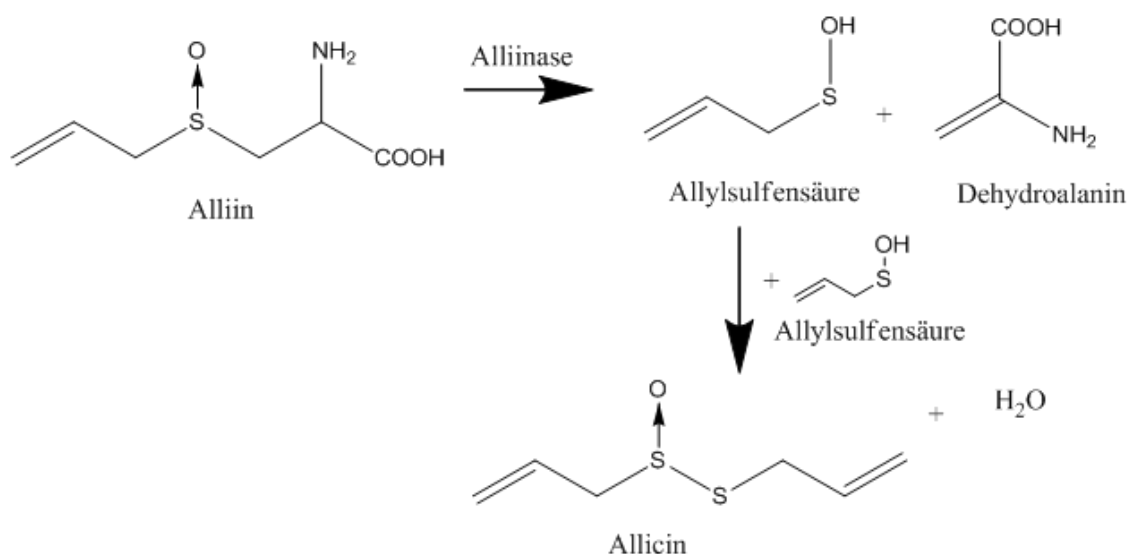


Abbildung 6: Biosynthese des Allicins, ausgehend von Alliin

Alliin wird durch die Katalyse der Alliinase in ein Molekül Allylsulfensäure und das instabile Intermediat Dehydroalanin gespalten, welches in Pyruvat und Ammoniak zerfällt. Zwei Moleküle Allylsulfensäure kondensieren in einem zweiten Schritt spontan zu Allicin.

Allicin weist eine große Bandbreite von biologischen Aktivitäten auf. Bereits in der Erstpublikation des Allicins 1944 wird seine starke antimikrobielle Potenz beschrieben (Cavallito und Bailey, 1944), mit einer Wirksamkeit gegen eine große Bandbreite von Mikroorganismen. So konnte gezeigt werden, dass Allicin gegen eine Vielzahl von human- wie pflanzenpathogenen Bakterien wirksam ist (Ankri und Mirelman, 1999; Curtis et al., 2004). In die Wirksamkeit eingeschlossen sind Bakterien mit mehrfacher Antibiotika-Resistenz (z.B. *Methicillin-resistente Staphylococcus aureus* (MRSA) (Wilson und Cutler, 2004) oder der an der Entstehung gastrointestinaler Ulci beteiligten *Helicobacter pylori* (Jonkers et al., 1999)).

Gegen phytopathogene Pilze und Oomyceten zeigt Allicin ebenfalls eine ausgeprägte Wirkung (Curtis et al., 2004; Perelló et al., 2013; Portz et al., 2008; Slusarenko et al., 2008), so dass ein Potential für die Anwendung von Allicin in der (ökologischen) Landwirtschaft gesehen werden kann. Insbesondere der Umstand, dass Allicin synergistisch mit Kupfer wirkt (Ogita et al., 2006; Ogita et al., 2005) und Kupfer für den Einsatz im ökologischen Landbau zugelassen ist, dort aber mitunter massive ökologische Nachteile mit sich bringt (Trewavas, 2004), bietet eine Option, den Kupfereinsatz in die Umwelt durch Mischeinsatz mit Knoblauchpräparaten zu reduzieren. Ferner wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass Allicin toxisch für den humanpathogenen Ascomyceten *Candida albicans* ist (Khodavandi et al., 2010; Khodavandi et al., 2011a; Khodavandi et al., 2011b; Kim et al., 2012).

Ferner zeigt Allicin auch viruzide Eigenschaften: So wurden u.a. *Herpes simplex* Virus Typ 1 und 2, Parainfluenza Virus Typ 3, das *Vaccinia Virus* und das menschliche Rhinovirus Typ 2 durch Allicin inhibiert (Weber et al., 1992).

Von besonderem medizinischem Interesse ist die Eigenschaft von Allicin, auch in Humanzellen (u.a. Krebszellen) Apoptose zu induzieren sowie verschiedene Signalwege in Humanzellen zu modulieren. Nähere Details zu dieser Eigenschaft des Allicins werden in Kapitel 1.4. gegeben. Neben Allicin sind auch seine Abbauprodukte physiologisch aktiv. Einige Anmerkungen dazu sind im Anhang unter Punkt 7.1.5 gegeben.

1.2.7.2 Für die biologische Wirkung des Allicins ist seine Thiolreaktivität von Bedeutung

Bereits Cavallito und Bailey beschreiben in ihrer ersten Publikation zum Allicin die Eigenschaft, mit Thiolen zu reagieren, wodurch diese oxidiert werden unter Bildung eines Mischdisulfids, und nahmen diese Eigenschaft als die Ursache für die antimikrobielle Wirkung an (Cavallito und Bailey, 1944, vgl. Abbildung 7). Allicin ist folglich ein Oxidationsmittel. *In vitro* Experimente zeigten später, dass Allicin in der Lage ist, Enzyme, die ein katalytisch bedeutendes Cystein in ihrem aktiven Zentrum tragen („Thiolenzyme“ – s.o.) zu inhibieren, worunter auch essentielle Proteine fallen (z.B. humane Succinatdehydrogenase), so dass angenommen wurde, dass die Wirkung von Allicin durch die Inaktivierung von Enzymen bedingt wird (Wills, 1956).

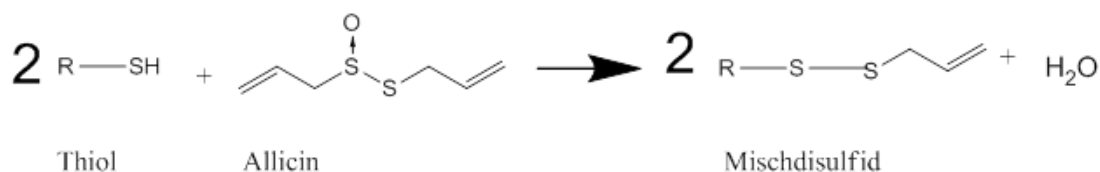


Abbildung 7: Allicin oxidiert Thiole unter Bildung von Mischdisulfiden

In diesem, einer Thiol-Disulfid-Austauschreaktion ähnlichen Mechanismus, oxidiert Allicin das Thiol (als reduzierte Spezies) zu einem Mischdisulfid; die Elektronen des Thiols werden auf den Sauerstoff der Thiosulfinat-Gruppe samt des Protons des Thiols unter Bildung von Wasser übertragen.

Erst deutlich später wurde die Frage aufgeworfen, ob die biologische Aktivität des Allicins auch durch Reaktion mit Nicht-Proteinthiolen wie Glutathion beeinflusst sein könnte; Miron *et al.* konnten *in vitro* zeigen, dass die Reaktion zwischen Glutathion und Allicin unter Bildung des oxidierten Mischdisulfids Allylmercaptoglutathion (GSSA) sehr schnell verläuft (Miron et al., 2000) und dass dieses Mischdisulfid durchaus ebenfalls selbst physiologische Funktionen (z.B. antioxidative Eigenschaften) zeigen kann (Miron et al., 2010; Rabinkov et al., 2000; siehe Abbildung 8).

Aufgrund der Geschwindigkeit der Reaktion ist davon auszugehen, dass GSSA ein bedeutendes Intermediat für die Reaktion von Allicin mit Nichtprotein-Thiolen darstellt, das selbst aber in der Lage ist weiterzureagieren (Rabinkov et al., 2000). Bei der Reaktion von einem Molekül Allicin mit einem Molekül Glutathion entsteht ein Molekül GSSA und ein Molekül Allylsulfensäure, die in einem zweiten Schritt mit einem weiteren Molekül GSH ein zweites Molekül GSSA unter Abspaltung von

Wasser reagiert. Um die Mischdisulfide GSSA vollständig zu Allylmercaptan zu reduzieren, bedarf es zwei weiterer Moleküle GSH, so dass ein Molekül Allicin in der Lage ist, vier Moleküle GSH zu oxidieren. Verglichen mit H_2O_2 , das nur 2 Moleküle GSH zu oxidieren in der Lage ist, ist Allicin ein - auf Thiole bezogen – stärkeres Oxidationsmittel.

Alternativ kann GSSA auch mit Proteinthiolen eine Thiol-Disulfid-Austauschreaktion eingehen, so dass entweder der Glutathionteil des GSSAs ein Disulfid mit dem Proteinthiol eingeht (Glutathiolierung) oder der Allylteil des GSSAs, so dass eine Protein-Thioallylierung erfolgt (Miron et al., 2010).

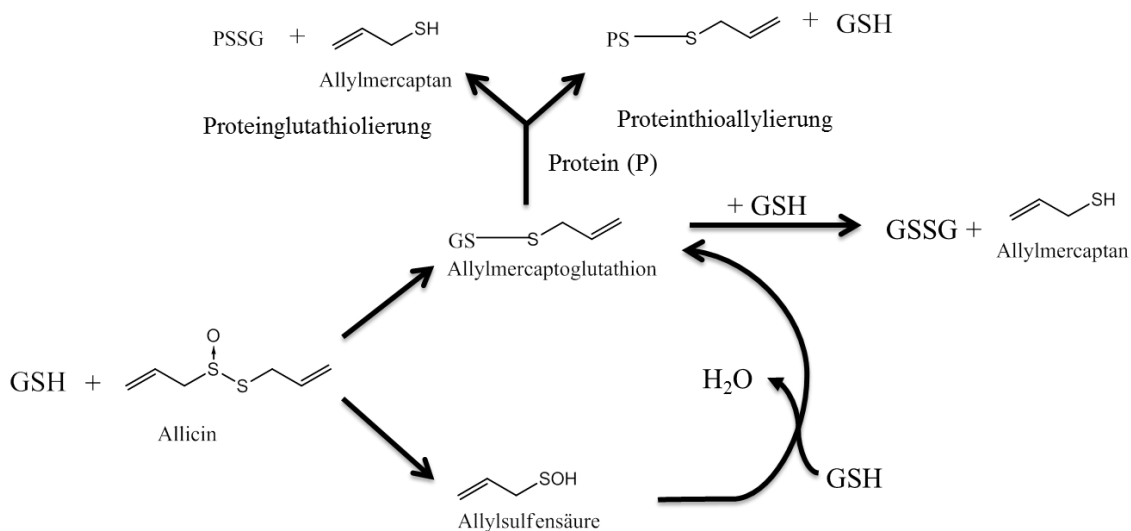


Abbildung 8: Reaktion von Allicin mit Glutathion zu GSSA und dessen Folgereaktionen

Ein Molekül Allicin oxidiert zwei Moleküle GSH zu Allylmercaptoglutathion (GSSA), die ihrerseits entweder wiederum mit Glutathion reagieren können unter Bildung von Glutathiondimer (GSSG) und Allylmercaptan oder GSSG kann mit Proteinthiolen reagieren, wobei entweder der Glutathionteil eine Thiol-Disulfid-Austauschreaktion mit dem Proteinthiol eingehen kann, was zu einer Protein-S-glutathiolierung führt bzw. der Allylteil geht die Reaktion ein, resultierend in einer Proteinthioallylierung (verändert und erweitert nach (Gruhlke et al., 2011)).

Der Umstand, dass Allicin also direkt zur Oxidation von Glutathion führen kann oder indirekt erfolgen. Eine indirekte Möglichkeit ist, dass oxidierte Cysteinreste in Proteinen Glutaredoxin-abhängig reduziert werden (was einen „Verbrauch“ von GSH und Umsatz zu GSSG bedeutet), dass der Anteil von reduziertem (GSH) zu oxidiertem (GSSA, GSSG) Glutathion in Richtung der oxidierten Verbindungen verschoben wird. Dabei können ferner verschiedene Kreuzreaktionen eintreten, beispielsweise die Reaktion von GSSG mit Thiolen oder die Reduktion von Disulfiden durch Allylmercaptan (Miron et al., 2010). Eine Reaktion von Allicin mit Proteinthiolen ist also durchaus bedeutsam, steht aber aufgrund der Pufferleistung der Redoxpuffersysteme, vor allem Glutathion, im Gleichgewicht mit der Lage des GSH/GSSG Gleichgewichtes, so dass eine bloße Proteininhibition nicht als hinreichende Erklärung für die Allicintoxizität herangezogen werden kann, sondern Allicin mehr generell als Redox toxin fungiert (Gruhlke et al., 2010b).

Gemäß dem Umstand, dass Glutathion als „Schalter“ des Thiolstat fungiert, bedeutet das, dass eine, mit zunehmender Allicinkonzentration aufsteigende Oxidation des Glutathions Auswirkungen hat auf den physiologischen Zustand von Zellen. Ein direkter Einfluss der Thioloxydation auf die Induktion von Apoptose, vermittelt durch eine Beeinflussung der Mitochondrienfunktion, konnte für humane Zellen gezeigt werden (Marchetti et al., 1997), so dass diese Funktionsweise als Arbeitshypothese für die Wirkung von Allicin angenommen wird.

1.2.7.3 Die Chemie des Allicins als Modellbeispiel für „Reaktive Schwefelspezies (RSS)“

Bereits mehrfach ist angesprochen worden, dass Reaktive Spezies des Sauerstoffs und des Stickstoffs bedeutende Faktoren für die Ausbildung von oxidativem Stress darstellen (Halliwell, 2001) und auch entscheidend sind für den Alterungsprozess von Zellen (Sohal und Orr, 2012). Um einen gesamten Überblick über die Redoxumgebung der Zelle zu bekommen, ist es notwendig, neben Sauerstoff und Stickstoff auch Reaktive Spezies des Schwefels zu postulieren (Yamasaki, 2005).

Eine Rolle von Reaktiven Schwefelspezies (RSS) wurde erstmals 2001 durch Giles und Mitautoren postuliert (Giles et al., 2001). Voraussetzung für diese Annahme war die Beobachtung, dass Schwefelverbindungen in einer Vielzahl unterschiedlicher Oxidationsstufen in biologischen Systemen zu finden sind (*ibid.*). Aufgrund des Thiol-Disulfidaustauschs bzw. verwandten Mechanismen sind derartige, oxidierte Verbindungen des Schwefels in der Lage, Thiolgruppen zu oxidieren (Giles et al., 2001; Gruhlke und Slusarenko, 2012). Folglich sind derartige Verbindungen redoxaktiv. Dabei ist es bedeutsam festzuhalten, dass eine Vielzahl von RSS durch die Einwirkung von ROS (oder anderen Oxidantien wie RNS oder Hypochlorit (Nagy und Ashby, 2005, 2006, 2007) auf Thiole entsteht (Giles und Jacob, 2002; Giles et al., 2001; Jacob et al., 2004); RSS können folglich als Reaktive Spezies der „zweiten Ordnung“ bezeichnet werden. Aufgrund dieser Beobachtung definiert Brannan RSS als **Redox-aktive Schwefelverbindungen, die unter Bedingungen oxidativen Stresses gebildet werden und selbst in der Lage sind, Oxidationsreaktionen zu initiieren** (Brannan, 2010). Entsprechende Verbindungen können aber auch unabhängig von oxidativem Stress gebildet werden (so zum Beispiel die Verbindungen des Knoblauchs). Diese Definition ist nicht hinreichend, um Reaktive Schwefelspezies zu charakterisieren, so dass ein Versuch einer umfassenden Definition der Reaktiven Schwefelspezies lauten kann: **RSS sind redox-aktive schwefelhaltige Moleküle, die unter physiologischen Bedingungen in der Lage sind, Biomoleküle zu reduzieren oder zu oxidieren** (Gruhlke und Slusarenko, 2012).

1.3 Das Modellsystem Hefe: Zelltodmechanismen und Prozesse der Oxidationsabwehr und Reparaturmechanismen durch oxidative Schäden

1.3.1 Apoptose in Hefe und Tieren – ein Vergleich unter besonderer Berücksichtigung des Redoxgleichgewichts

1.3.1.1 Kurze Übersicht über Apoptose in Säugetierzellen

Der Apoptose-Begriff wurde 1972 von Kerr in die wissenschaftliche Terminologie eingebracht (Kerr et al., 1972) und leitet sich vom griechischen *απο-πτωσις* ab (=herbstlicher Blattfall). Das Wort beschreibt morphologische Erscheinungen, die im Zusammenhang mit aktiv eingeleiteten Zelltodvorgängen stehen. Die ersten Beobachtungen, die auf das Apoptose-Phänomen hindeuten, wurden bereits 1842 durch Karl Vogt beschrieben (Vogt, 1842). Es wurde lange Zeit Apoptose mit „programmiertem Zelltod“ gleichgesetzt und scharf vom nekrotischen Zelltod abgegrenzt als einer Form von nicht aktiv von der Zelle eingeleitetem Zelltod (Saikumar et al., 1999).

Eine grobe Unterscheidung hinsichtlich der Apoptosewege kann in tierischen Systemen erfolgen zwischen der **intrinsischen** (also einer Apoptoseform, deren Induktion unabhängig ist von Rezeptoren, die eine Detektion der Umgebung außerhalb der Zelle bedingen) und dem **extrinsischen Weg**, bei dem die Induktion abhängig ist von Rezeptoren. Eine weitere Unterscheidung ist möglich hinsichtlich der Bedeutung von Caspasen (Cystein-Aspartat-Proteasen) für die Durchführung der Apoptose, so dass zwischen einem **Caspase-abhängigen** und **Caspase-unabhängigen** Apoptoseweg unterschieden wird (Abbildung 9).

Caspasen kommen in Säugetieren als aufeinander aufbauende Kaskade vor (Schwartz, 1998). In einem Rezeptor-vermittelten Apoptoseweg binden sog. „Todes-liganden“ („*death ligands*“) wie TNF, TRAIL, FASL an einen „Todes-Rezeptor“ („*death receptor*“), wobei es über das FADD als Adapterprotein zur Aktivierung der Caspase 8/10 kommt (Schmitz et al., 2000). Caspase 8/10 wiederum aktiviert die Procaspase 3 zur aktiven Caspase 3 (Stennicke et al., 1998), wobei Caspase eine große Bandbreite an zellulären Substraten zu schneiden in der Lage ist, so dass Caspase 3 (neben Caspase 6 und 7) als Effektorcaspase bezeichnet wird (Chang und Yang, 2000) mit dem Tetraamino-säure-Erkennungsmotiv Asp-x-x-Asp (Agniswamy et al., 2007). Dabei stellt Procaspase 7 ein bedeutendes Substrat für Caspase 3 dar, aktiviert diese, die – neben Caspase 3 selbst, diese aber nur mit geringerer Umsatzrate – entscheidend ist für die Proteolyse und somit Inaktivierung der Poly-(ADP ribose)polymerase 1 (PARP1) (Boucher et al., 2012). Das PARP Protein wiederum ist neben einer Vielzahl weiterer Funktionen in der Zelle entscheidend für die Reparatur von DNA-Strangbrüchen (Javle und Curtin, 2011).

Neben der Aktivierung der Procaspase 3 als bedeutender Effektorcaspase durch Caspase 8 ist auch eine Aktivierung durch Caspase 9 möglich (Yin et al., 2006). Dabei ist Caspase 9 Teil des Apoptosoms (*ibid.*), einem großen Proteinkomplex, dessen Formation durch die Bindung von Cytochrom C an das APAF-1 („*Apoptotic protease activating factor 1*“) Protein (Zou et al., 1999) bewerkstelligt wird.

Cytochrom C ist in nicht-apoptotischen Zellen über Cardiolipin in der inneren Mitochondrienmembran eingebettet; die Oxidation des Cardiolipins führt zur Freisetzung von Cytochrom C (Orrenius und Zhivotovsky, 2005). Zentrale Regulatoren der Freisetzung des Cytochroms aus den Mitochondrien sind dabei Vertreter der **Bcl-2-Familie**, die die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran überwachen (Chao und Korsmeyer, 1998a); dabei ist innerhalb der Bcl-2-Familie zwischen proapoptotischen Vertretern (z.B. BAX) und antiapoptotischen Vertretern (z.B. Bcl_xL und Bcl-2) zu unterscheiden (*ibid.*).

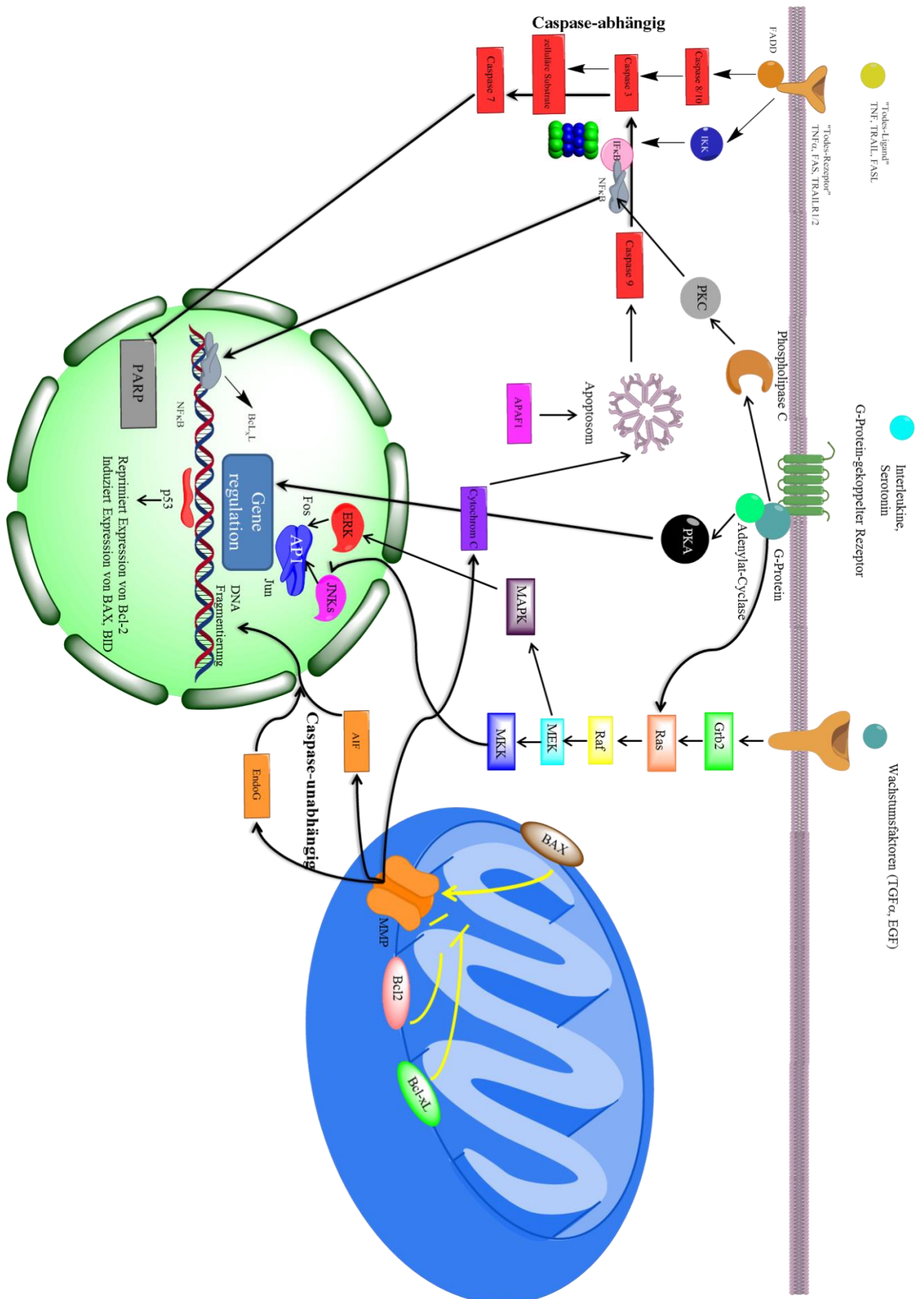


Abbildung 9: Zusammenfassende und vereinfachte Darstellung der Apoptose in Säugetieren

Zentrale Ereignisse der Apoptose-Induktion sind eine Veränderung der Genexpression sowie ein Abbau von Zielproteinen, u.a. durch die Aktivität von Effektor-Caspasen der Caspase-Kaskade. Die Genregulation wird vornehmlich durch den Ras/Raf Signalweg sowie über die Aktivität der PKA gesteuert bzw. abhängig von NFκB über PKC.

Für eine Vielzahl Caspase-unabhängiger Reaktionsschritte (wozu v.a. die Fragmentierung nukleärer DNA zählt) sind Vertreter der Bcl-2-Familie mit sowohl pro- wie antiapoptotischen Proteinen beteiligt und regulieren so die Freisetzung von AIF bzw. EndoG aus den Mitochondrien.

Somit inhibieren Bcl-2 und Bcl-xL die Freisetzung, während BAX die Freisetzung von Cytochrom C fördert. Ursprünglich wurden antiapoptotische Vertreter der Bcl-2 Familie aus B-Zell Lymphomen isoliert und festgestellt, dass Mutationen in diesen Genen typisch sind für diese Krebsart (Chao und Korsmeyer, 1998b). Die proapoptotischen Vertreter der Bcl-2-Familie teilen mit den antiapoptotischen ein für die Familie typisches Motiv, die sog. BH3-only Domäne, so dass auch proapoptotische Vertreter wie BAX zu der – ursprünglich als antiapoptotische Proteine enthaltende Gruppe identifizierten – Bcl-2 Familie zugezählt werden (Bouillet und Strasser, 2002).

Caspase-unabhängige Induktion von Zelltod erfolgt durch die Aktivität des Apoptose-Induzierenden Faktors (AIF), der ebenfalls im Zuge der Apoptose-Induktion aus den Mitochondrien freigesetzt wird und anschließend in den Zellkern migriert, wo er durch Degradation von DNA Zelltod induziert (Parrish und Xue, 2003; Susin et al., 1999; Ye et al., 2002). Neben dieser, mit Zelltod in Verbindung stehenden Funktion scheint AIF auch unabdingbar für die Funktion der Atmungskette zu sein, sowie verschiedene Redoxreaktionen zu betreiben, weil die enzymatische Funktion des Apoptose-Induzierenden Faktors als NADH-Oxidoreduktase angesehen wird (Klein et al., 2002; Vahsen et al., 2004). Neben AIF ist auch die Endonuklease G (EndoG) ein wichtiger Regulator der Caspase-unabhängigen Apoptose (Basnakian et al., 2006).

Zentral für die Regulation der Apoptose ist eine Anpassung der Genexpression (beispielsweise der Bcl-2-Familie) (Gross et al., 1999). Die Regulation der Bcl_xL Genexpression beispielsweise ist reguliert durch den Transkriptionsfaktor NFκB (Khoshnan et al., 2000). Die Aktivierung von NFκB erfolgt am N-Terminus des IκBα-Kinase-Komplexes (IKK) durch Phosphorylierung von IκBα-Proteinen und nachfolgender Ubiquitynylierung als Signal für den Abbau durch das Proteasom.

Eine alternative Regulation der Genexpression funktioniert über einen Protein-Kinase A regulierten Weg, wobei ein Stimulus (z.B. Interleukine, Serotonin) durch einen G-Protein gekoppelten Rezeptor perzipiert wird (Holmes et al., 1991; Millan et al., 2008). Das G-Protein aktiviert eine Adenylat-Cyclase, die Adenosin-Triphosphat in cyclisches Adenosin-Monophosphat (cAMP) umwandelt, das Voraussetzung für die Aktivierung der Protein-Kinase A ist (Hanoune und Defer, 2001).

Dieser Signalweg kann ebenfalls in die NFκB abhängige Genexpression eingreifen, indem das G-Protein auf die Aktivität einer Phospholipase C (PLC) einwirkt; das Reaktionsprodukt der PLC, Inositoltriphosphat (IP₃) wiederum ist notwendig zur Aktivierung der Proteinkinase C, die auf die Aktivierung von NFκB in der oben beschriebenen Weise Einfluss nimmt (La Porta und Comolli, 1998).

Neben NFκB ist für die Regulation der Genexpression der AP-1 (Activator-Protein1)-Transkriptionsfaktor-komplex bedeutsam, der aus den Komponenten Fos und Jun zusammengesetzt ist. Beide werden in Abhängigkeit von einer MAP-Kinase Kaskade aktiviert. Der Signalweg beginnt mit der Perzeption von Wachstumsfaktoren wie TGFα (*Transforming growth factor alpha*) oder EGF (*Epidermal growth factor*), das durch das Adapterprotein Grb2 vermittelt die Aktivierung von RAS bewerkstelligt (Lowenstein et al., 1992); auf die Funktion der Ras-Protein-Familie wird in Kapitel 1.3.2 näher eingegangen. Die Funktion von RAS wird ferner durch die bereits erwähnten Rezeptor-gekoppelten G-Proteine reguliert (Knall et al., 1996). In Abhängigkeit von Ras wird eine Phosphorylierungskaskade induziert, ausgehend von der Raf (*rapidly accelerated fibrosarcoma*) Kinase aktiviert (Avruch et al., 2001). Während nun die Komponente Fos des AP1-Transkriptionsfaktorenkomplexes in Abhängigkeit von MAPK von MAPK-Kinase ERK (*Extracellular signal-regulated kinases*) (Roskoski, 2012) phosphoryliert wird, erfolgt die Phosphorylierung der cJun-Komponente von AP-1 in Abhängigkeit von MKK und Jun-Kinase JNK (Wisdom et al., 1999).

1.3.1.2 Apoptose in *Saccharomyces cerevisiae*

Für lange Zeit ist angenommen worden, dass das Apoptose-Phänomen auf mehrzellige Organismen beschränkt sei (Fröhlich und Madeo, 2000). Die entscheidende Beobachtung, dass auch Einzeller wie Bäckerhefe (*S. cerevisiae*) in der Lage sind, programmierte Zelltodprogramme zu vollziehen, bestand darin, dass eine $\Delta cdc48$ Mutante diagnostische Marker früher und später Apoptose zeigt wie Chromatin-Fragmentierung, DNA-Strangbruch, nachgewiesen mittels TUNEL-Assay oder eine Externisierung von Phosphatidylserin in der Plasmamembran (Madeo et al., 1997). Das *CDC48* [YDL126C] Gen codiert für eine AAA-ATPase. Danach konnte gezeigt werden, dass die Expression von sowohl pro- wie antiapoptotischen Vertretern der humanen Bcl-2 Familie eine dem Säugetiersystem entsprechende pro- oder antiapoptotische Funktion in Hefe aufweisen (Longo et al., 1997; Tao et al., 1997).

Folglich begann die Suche nach Homologen oder analogen Faktoren, die den Zelltod in Hefe beeinflussen. Es wurde eine Protease identifiziert (YCA1 = YOR197), die in der Lage ist, die artifiziellen Caspase-Substrate VEID (ein Substrat für Caspase-6 in Säugetieren) und - in geringerem Umfang - IEID (ein Substrat für Caspase-8 in Säugetieren), nicht aber DEVD (ein Substrat für Caspase 3 in Säugetieren) umzusetzen (Madeo et al., 2002b). Es zeigte sich, dass eine Überexpression die Anfälligkeit von Hefezellen gegenüber H₂O₂ massiv erhöht und Charakteristika apoptotischen Zelltodes zeigt, während eine Mutation eine deutlich erhöhte Resistenz gegenüber H₂O₂ aufweist (*ibid.*). Ferner zeigt eine $\Delta yca1$ Mutante eine erhöhte Anzahl oxidierten Proteine, so dass dieses Protein neben seiner apoptotischen Funktion offenbar auch bedeutsam ist für die Qualitätskontrolle von Proteinen (Khan et al., 2005). Im Gegensatz zu Säugetieren zeigt Hefe also keine Caspase-Kaskade, sondern die Caspase-Aktivität beschränkt sich auf ein einzelnes Protein.

Für die Aktivierung der Caspase scheint auch in *S. cerevisiae* die Freisetzung von Cytochrom C bedeutsam, wenngleich aufgrund des Umstandes, dass bislang kein Apoptosom-Assoziierter Faktor

(APAF) identifiziert wurde, nicht klar ist, inwieweit mechanistisch Cytochrom C an der Caspase-Aktivierung beteiligt ist (Carmona-Gutierrez et al., 2010). Allerdings lässt die Vielzahl von Beobachtungen, bei denen Caspase-abhängige Apoptose unabhängig von der Cytochrom C-Freisetzung erfolgt, die Notwendigkeit der Cytochrom C-Freisetzung fraglich erscheinen (Guaragnella et al., 2010).

Nach der Beobachtung der Apoptose in $\Delta cdc48$ -Zellen wurde entdeckt, dass Hefe auch Caspase-unabhängigen Zelltod initiieren kann, wobei sowohl die Nuclease EndoG (=NUC1; YJL208) als auch ein Homolog zum Apoptose-induzierenden Faktor identifiziert wurde (Büttner et al., 2007; Vincent et al., 1988; Wissing et al., 2004). Wie bereits für die Hefe-Caspase beschrieben, führt auch eine Überexpression von AIF1 zu einer erhöhten Rate apoptotischer Zellen nach Behandlung mit H_2O_2 im Vergleich zum Wildtyp, wohingegen eine $\Delta aif1$ Mutante hochgradig resistent gegen H_2O_2 ist (Wissing et al., 2004). Dabei zeigt das aufgereinigte AIF-Protein DNA-abbauende Eigenschaften; wie auch im Säugetier-System wandert AIF von den Mitochondrien in den Nucleus (*ibid.*).

In ähnlicher Weise führt auch eine Mutation des Endo-G Sequenzhomologs NUC1 zu einer massiv erhöhten Resistenz gegen verschiedene Apoptose-induzierende Agenzien, so dass auch, wie weitere cytologische Tests zeigten, NUC1 ein bedeutender Effektor des Apoptose-Vollzugs ist (Büttner et al., 2007).

Problematisch für die Übertragbarkeit von Hefe-Resultaten auf Säugetiersysteme war, dass lange Zeit kein Hefehomolog der Bcl-2-Familie bekannt war. Zwar konnte, wie bereits erwähnt, mehrfach gezeigt werden, dass sowohl pro- wie antiapoptotische Vertreter der Bcl-2 Familie in Hefe funktional sind (Chen et al., 2003), intrinsische Vertreter der Bcl-2 Familie wurden aber für lange Zeit nicht gefunden. Mit der Entdeckung einer BH3-only Domäne, die typisch ist für Vertreter der Bcl-2 Familie, im Protein YNL305p (YBH3) und der Bestätigung, dass eine Überexpression die Resistenz gegen Apoptose-induzierende Stimuli erhöht, beim Fehlen der BH3-Domäne dieses Verhalten ausbleibt, ist *bona fide* ein Bcl-2 Vertreter in Hefe identifiziert, so dass die Ähnlichkeit zwischen dem Hefe- und dem Säugetiersystem hinsichtlich seiner Apoptoseprogramme um einen weiteren Faktor erweitert werden konnte (Büttner et al., 2011) (vgl. auch Tabelle 2, die unterschiedliche Faktoren der Apoptose und tierischen Systemen und Hefe vergleicht) .

Tabelle 2: Übersicht über identifizierte Hefehomologe von bedeutenden Apoptoseregulatoren (gemäß YEASTGENOME Datenbank)

Apoptose-regulierender Faktor in Säugetieren	Hefehomolog
TNF α	-
Caspase	YCA1 (YOR197w)
PARP	-
NF κ B	-
Phospholipase C	PLC1 (YPL268W)

PKC	PKC1 (YBL105C)
APAF1	-
RAS	RAS1 (YOR101W), RAS2 (YNL098C)
RAF	-
ERK	HOG1 (YLR113W), FUS3 (YBL016W)
JNK	
cJun	YAP1 (YML007W)
AP-1	YAP1 (YML007W), YAP2 (YDR423C)
AIF	AIF1 (YNR074C)
EndoG	NUC1 (YJL208C)
Bcl-2	BXI1 (YNL305C)
p53	-

Neben den direkten, an der Ausführung der Apoptose beteiligten Faktoren, spielt auch in Hefe die Veränderung der Genexpression eine bedeutende Rolle (Almeida et al., 2009; Magherini et al., 2007). Wenngleich Homologe bedeutender Faktoren der apoptotischen Genregulation wie p53 in Hefe bislang nicht nachgewiesen werden konnten, ist dennoch bedeutsam, dass ein Homolog des AP-1 Transkriptionsfaktors in Hefe gefunden wurde (Moye-Rowley et al., 1989; Toone und Jones, 1999). Zwar besteht dieser nicht, wie es bei Säugern der Fall ist, aus verschiedenen Untereinheiten (z.B. Fos und Jun), sondern wird durch ein einzelnes Protein repräsentiert (YAP1 = YML007W); nähere Erläuterungen zu YAP1 sind in Kapitel 1.3.3 gegeben.

Auch die zugehörigen Signalwege, insbesondere die der Kinase-Kaskaden, spielen in der Apoptose in Hefe eine Rolle, wenngleich die Zusammenhänge noch nicht in der Tiefe identifiziert sind, wie es für Säugetiersysteme der Fall ist. Der Protein-Kinase A Signalweg ist offenbar für die Apoptose von Bedeutung (Leadsham und Gourlay, 2010; Leadsham et al., 2009), wobei in Hefen (auch *Candida albicans*) das PKA-Signalling abhängig von RAS2 erfolgt (Phillips et al., 2006b; Toda et al., 1987c); aufgrund seiner Bedeutung soll im Folgenden dieser Signalweg eingehender erläutert werden.

1.3.2 RAS2/PKA Signalling in Hefe und seine Entsprechungen in anderen biologischen Systemen

RAS-Proteine (für engl. *Rat sarcoma*) sind kleine monomere G-Proteine, die im Jahr 1981 von der Arbeitsgruppe um Robert A. Weinberg in tierischen Zellen erstmalig beschrieben wurden (Murray et al., 1981; Parada et al., 1982). Durch Thioesterbindungen an Fettsäuren haben RAS-Proteine einen Membrananker, der dazu führt, dass die Proteine auf der Innenseite der Plasmamembran der Zelle zu finden sind (Wittinghofer und Waldmann, 2000). Rasch wurde erkannt, dass RAS für die

Krebsentstehung von großer Bedeutung ist, weil in einem hohen Prozentsatz menschlicher Tumoren Punktmutationen in der für das RAS Protein codierenden Gensequenz identifiziert wurden (eine Zusammenfassung gibt Bos, 1989).

Biochemisch handelt es sich bei Proteinen der RAS-Familie um eine kleine GTPase (also ein Enzym, das Guanosin-Triphosphat (GTP) in Guanosin-Diphosphat (GDP) spaltet), die in zwei Zuständen vorliegen kann, als GTP-bindendes RAS bzw. GDP-bindendes RAS. Diese zwei Zustände können gleichsam eine Schalterfunktion ausüben, in der Form, dass die „aktive“ Form des RAS-Proteins mit anderen Effektoren bindet (wie RAF-Kinasen *etc.*) und so die Signaltransduktion von verschiedenen Signalwegkaskaden beeinflusst (Wittinghofer und Waldmann, 2000). Durch den Austausch von GDP zu GTP, also eine Aktivierung, mittels GEF-Proteinen (siehe Abbildung 10) erfolgt die Regulation der RAS-Aktivität.

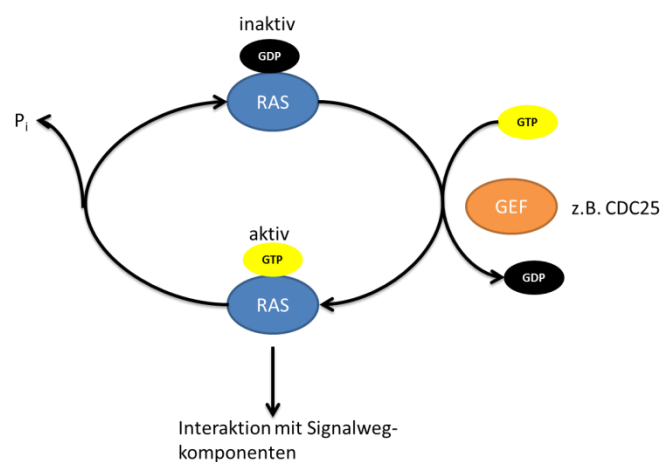


Abbildung 10: Vereinfachtes Schema der Biochemie des RAS-Proteins

Proteine der RAS-Familie spalten GTP zu GDP. Die GTP-bindende Form ist biologisch aktiv und kann mit anderen Proteinen interagieren und auf diese Weise deren Funktion regulieren. Nach Abspaltung eines Phosphatrestes von GTP geht RAS in die inaktive, GDP bindende Form über. Diese kann durch Austausch des GDPs durch GTP wieder in die aktive Form überführt werden; diese Reaktion wird durch sog. GEF- („Guanosin-exchange factor“) Proteine katalysiert, z.B. CDC25. Abbildung verändert nach (Wittinghofer und Waldmann, 2000).

Bereits früh wurde erkannt, dass der Zusammenhang zwischen Krebsentstehung und Mutationen in RAS-Genen auf Aminosäuresubstitutionen in den Positionen 12, 13 und 61 (für *N* bzw. *K*-RAS) zurückzuführen ist (Barbacid, 1987; Lowy und Willumsen, 1993). Diese Mutationen führen zu einer *gain-of-function* Situation des Proteins – RAS ist konstitutiv aktiv und bindet an andere Signalwegkomponenten, die beispielsweise die Zellproliferation regulieren, und ist somit unabhängig von der Kontrolle durch GEF-Proteine. Phänotypisch kann sich dies in unkontrollierter Zellproliferation äußern, wie es für Tumore typisch ist (Fernández-Medarde und Santos, 2011).

Um die molekulare Funktion von RAS besser zu verstehen, versuchte man, außerhalb von Säugetieren RAS-Proteine zu identifizieren und fand RAS2-Homologe in vielen Eukaryoten (Díez et al., 2011; Lowy und Willumsen, 1993) und auch in Prokaryoten (Dong et al., 2007).

Für das biochemische Verständnis von RAS-Proteinen war besonders entscheidend, dass auch in *Saccharomyces cerevisiae* als bedeutendem biochemisch-molekularbiologischen Modellorganismus RAS-Homologe entdeckt wurden und biochemisch als GTPasen charakterisiert wurden (DeFeo-Jones et al., 1983; Tamanoi et al., 1984). In Hefe wurden zwei RAS Homologe (RAS1 [YOR101w] und RAS2 [YNL098c]) mit – offenbar unterschiedlichen – physiologischen Funktionen identifiziert (*ibid.*). Eine entsprechende *gain-of-function* Mutation konnte auch in Hefe entdeckt werden, indem die Aminosäure Glycin an Position 19 des Proteins zu Valin ausgetauscht wird; dieses als RAS2^{val19} bekannte Allel zeigt einen ähnlichen Phänotyp wie tierische Krebszelllinien mit einer RAS-Mutation (Hlavatá et al., 2003).

Bereits kurz nach Identifizierung der RAS-Proteine wurde erkannt, dass die biochemisch bedeutendste Adenylat-Cyclase der Hefe, CYR1 (YJL005W), von der Funktion von RAS-Proteinen abhängig ist (Broek et al., 1985; Toda et al., 1985). Adenylat-Cyclasen katalysieren die Umsetzung von Adenosin-monophosphat (AMP) zu seiner cyclischen Form cAMP. Bedeutsam für die Etablierung einer Interaktion zwischen RAS2 und CYR1 ist das Protein CAP1 (=SRV2; YNL138w), das N-terminal an CYR1 gebunden ist und so eine Interaktion mit RAS2 ermöglicht (Fedor-Chaiken et al., 1990). C-terminal bindet CAP1 mit hoher Affinität ADP-G-Actin (Mattila et al., 2004). Die G-Actin-Bindung beeinflusst ihrerseits die RAS-Aktivität; so zeigten Gourlay und Mitarbeiter, dass in *end3*-Zellen, die eine verringerte Depolymerisierung von F-Actin aufweisen, das RAS2-Signalling hyperaktiv ist (Gourlay und Ayscough, 2006). In dieser Mutante führt eine Behandlung mit Lantrunculin A, einem Actin-depolymerisierenden Agens, zu einer Normalisierung der Aktivität des RAS2-Signalweges auf Wildtypniveau (*ibid.*).

Andererseits wurde eine Esterase (PDE2, YOR360W) identifiziert, die mit hoher Affinität cAMP in AMP umwandelt und somit dazu beiträgt, das zelluläre Level an cAMP zu reduzieren. Somit ist die cAMP-Konzentration ein Wechselspiel zwischen der Aktivität von CYR1 und PDE2.

Als sog. „second-messenger“ ist cAMP für Zellen von großer Bedeutung. Eine wichtige Funktion von cAMP in der Zelle besteht in der Aktivierung einer Klasse von Serin/Threonin Protein-Kinasen, die aufgrund dieses Aktivierungsmechanismus cAMP-abhängige Proteinkinasen bzw. Proteinkinase A genannt werden (Shemarova, 2009).

In Hefe besteht die Proteinkinase A aus drei katalytischen Untereinheiten (TPK1, TPK2, TPK3 für „Takahashi Protein Kinase“ (Matsumoto et al., 1982; Toda et al., 1987b). Alle drei werden reguliert von einer regulatorischen Untereinheit, BCY1 (YIL033c) (Toda et al., 1987a). Dabei bilden 2 BCY1-Monomere mit zwei TPK-Monomeren in der inaktiven Form ein Tetramer. Durch Bindung von cAMP an BCY1 werden die Untereinheiten monomerisiert und gehen somit in ihre aktive Form über (Vandamme et al., 2012).

Auf dieser Grundlage lässt sich das folgende zusammenhängende Modell erstellen, das alle bisher genannten Faktoren in sich integriert. Hinzu kommen Faktoren, die RAS2 in Hefe regulieren; analog zum Säugetiersystem fungiert auch in Hefe das entsprechende Homolog von CDC25 (YLR310w) als Guanosin-Austausch-Faktor, der zu einer Überführung von RAS2 in den aktiven Zustand führt. Somit ist CDC25 – wie auch in Säugetieren – ein positiver Regulator des RAS/cAMP-Signallings.

Andererseits führt die Stimulation der Enzymaktivität des RAS2 Enzyms, also die Umsetzung von GTP zu GDP, dazu, dass RAS2 in den inaktiven Zustand überführt wird. Eine solche Stimulation der RAS2-Enzymaktivität wird durch die Enzyme IRA1 bzw. IRA2 (IRA steht für „Inhibitory Regulator of the RAS-cAMP pathway“), einem Homolog des humanen Neurofibromin (das eine Rolle bei der Entwicklung der Neurofibromatose Typ I/ von Recklinghausensche Krankheit spielt) (Gil und Seeling, 1999; Tanaka et al., 1989). IRA1 und IRA2 sind also Inhibitoren des RAS/cAMP/PKA-Signalweges in Hefe, wie das entsprechende Säugetierhomolog Neurofibromin die RAS-Aktivität inhibiert. Einen Überblick über die gesamte Signalkaskade gibt Abbildung 11.

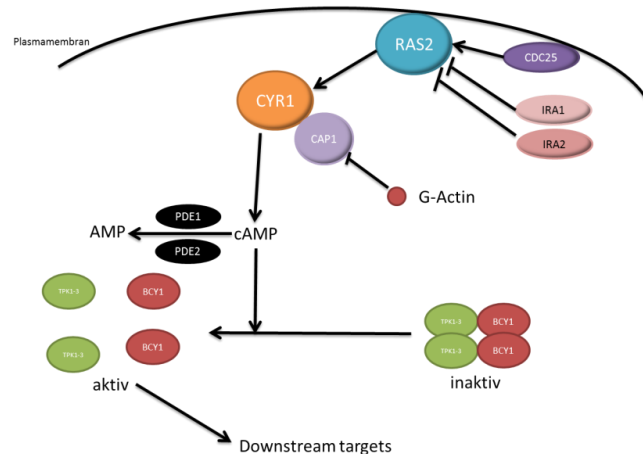


Abbildung 11: Übersicht über die cAMP/PKA Signalkaskade in Hefe

RAS2 wird reguliert durch zwei unterschiedliche Faktoren, entweder durch CDC25, das als GEF eine Aktivierung von RAS2 bewirkt, oder IRA1/IRA2, Homologe zum menschlichen Neurofibromin, das die Umwandlung von GTP in GDP durch RAS stimuliert, was RAS2 in einen inaktiven Zustand überführt. RAS2 ist ein positiver Regulator der Funktion der Adenylatcyclase CYR1, deren Interaktion mit RAS durch CAP1 (=SRV2) reguliert wird. Durch die Bindung von ADP-bindendem globulären Actin wird diese Interaktion offenbar verringert, so dass die Bindung von ADP-G-Actin das RAS2-Signalling inhibiert. CYR1 katalysiert die Umsetzung von AMP zu cAMP, dessen Level durch die Aktivität der Phosphodiesterasen PDE1 und PDE2, reduziert wird. Das cAMP-Level schließlich entscheidet über die Aktivität der Proteinkinase A. Die Proteinkinase A von *Saccharomyces cerevisiae* besteht aus drei katalytischen Untereinheiten (TPK1, TPK2 und TPK3) und einer regulatorischen Untereinheit (BCY1). Zwei Monomere BCY1 bilden mit zwei Monomeren katalytischer Untereinheiten (TPK1-3) ein Tetramer, das inaktiv ist. Durch Bindung von cAMP an die BCY1 Untereinheiten zerfällt der Komplex, was zu einer Aktivierung der katalytischen Untereinheiten führt. Die TPK Untereinheiten können nun Downstream-Targets phosphorylieren (Abbildung verändert und ergänzt nach (Vandamme et al., 2012)).

Die physiologischen Effekte, die durch die unterschiedlichen PKA-Untereinheiten reguliert werden, sind mannigfaltig. So scheint TPK1 vornehmlich bedeutsam zu sein für die Regulation des Zellzyklus, für die Biosynthese verzweigter Aminosäuren und die Stabilität der mitochondrialen DNA (Robertson et al., 2000), während die vornehmliche Aufgabe von TPK2 die Regulation der Eisenaufnahme darstellt (*ibid.*).

Eine Besonderheit bei TPK3 ist die Rolle in der Abwehr gegenüber verschiedenen Stressoren und im Glucose-Signalling (Gourlay und Ayscough, 2006; Leadsham und Gourlay, 2010; Livas et al., 2011;

Robertson und Fink, 1998). Darüberhinaus ist TPK3 entscheidend für Actin-abhängige Apoptose (Gourlay und Ayscough, 2006).

Es wurde gezeigt, dass die PKA sowohl Atmungsaktivität von Hefe reguliert als auch die Akkumulation von ROS beeinflusst (Leadsham und Gourlay, 2010). Die Akkumulation von ROS wird reguliert über die Beeinflussung Expression von ROS-detoxifizierenden Enzymen durch das MSN2/4 Transkriptionsfaktorensystem. Die Aktivität von MSN2/4 wiederum wird negativ durch TPK3 unterdrückt (Siehe Abbildung 12).

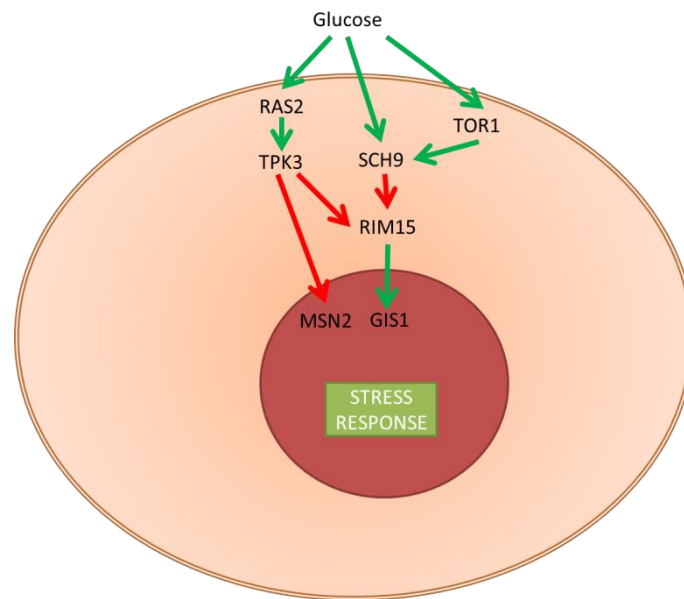


Abbildung 12: Hypothetischer Weg, wie Glucose-Signalling-Wege, den PKA-Weg eingeschlossen, die Stressantwort beeinflussen (verändert nach (Ruckenstuhl et al., 2010))

Glucose aktiviert RAS2, eine bereits genannte GTPase und ferner SCH9 (YHR205w), eine Kinase aus der AGC-Familie, die als Substrat von TOR1 dient; TOR1 (YJR066w; „Target of Rapamycin“) wird selbst ebenfalls durch die Anwesenheit von Glucose aktiviert. Sowohl SCH9 wie TPK3 unterdrücken die Funktion von RIM15, einer Proteinkinase, die wiederum den Transkriptionsfaktor mit Histondemethylaseaktivität GIS1 inaktiviert. Von besonderer Bedeutung ist jedoch die direkte Inhibition der Funktion von MSN2/4, einem stressresponsiblen Transkriptionsfaktor, der für die Aktivierung der vollen Stressantwort verantwortlich ist.

Biologisch hat der cAMP/PKA-Weg in Hefe (bzw. allgemein in Ascomyceten) vielfältige Bedeutungen, die auch für anwendungsorientierte Fragestellungen relevant sind. So wurde gezeigt, dass TPK3 wichtig ist für die Resistenz von Hefezellen gegenüber Toxinen wie Coffein, Cycloheximid, Camptothecin und Tunicamycin (Kapitzky et al., 2010). Der negative Regulator der TPK-Untereinheiten, das BCY1-Protein, zeigt im Gegensatz dazu eine verringerte Resistenz gegenüber oxidativem bzw. osmotischem Stress (Tabera et al., 2006).

In den meisten Studien wurde gezeigt, dass der RAS/cAMP/PKA-Signalweg zwar zu einer modulierten Resistenz gegenüber chemischen oder physikalischen Stressoren führt, inwieweit der Signalweg aber in der Induktion von Apoptose in Hefe involviert ist, wurde nur vereinzelt untersucht.

Eine frühe Beobachtung, dass dieser Signalweg bedeutsam ist für die Induktion von Apoptose, wurde bei der Behandlung von Hefezellen mit Osmotin erzeugt. Osmotin ist ein mit der pflanzlichen Abwehr assoziiertes, zur PR-5 Klasse (*Pathogenesis-related*) zählendes Protein aus Tabak, mit einem Molekulargewicht von 24 kDa und Homologie zu Thaumatin (Yun et al., 1997a). Nach Infektion von Tabakpflanzen mit einem Pathogen akkumulieren PR-Gene, darunter auch PR-5. Zwar war bekannt, dass Osmotin selbst antimikrobiell aktiv ist (Yun et al., 1997b), der Mechanismus jedoch, der hinter der antimikrobiellen Aktivität des Osmotins steht, war unverstanden.

Im Jahr 2001 wurde eine Arbeit veröffentlicht, die aufgrund morphologischer, cytologischer und molekularer Daten zeigen konnte, dass Osmotin in Hefezellen Apoptose induziert (Narasimhan et al., 2001). In dieser Studie wurde eine $\Delta bcy1$ Mutante hinsichtlich ihrer differentiellen Sensitivität gegenüber Osmotin untersucht und stellte sich als deutlich susceptibler im Vergleich zu Wildtyp-Zellen heraus (*ibid.*). Dies bedeutet, dass eine Hyperaktivierung des cAMP/PKA-Weges, wie es beim Fehlen der negativ regulatorischen Einheit der PKA der Fall ist, die Induktion der Apoptose fördert, die TPK-Einheiten also *bona fide* proapoptotische Faktoren sind. Die Beobachtung, dass der PKA-Signalweg bedeutsam ist für die Resistenz von Pilzen gegenüber Komponenten der pflanzlichen Abwehr, konnte bereits übertragen werden auf *Botrytis cinerea* (Schumacher et al., 2008).

Inwieweit der cAMP/PKA-Signalweg für die Resistenz gegenüber Allicin von Bedeutung ist, sollte in dieser Arbeit herausgefunden werden. Es war aus einem Versuch mit humanen Epithel-Karzinomzellkulturen bekannt, dass eine Behandlung mit Allicin auch in diesem Modellsystem Apoptose induzieren kann, die Rate apoptotischer Zellen aber durch Zugabe von H-89 (N-[2-(p-Bromocinnamylamino)ethyl]-5-isochinolinesulfonamid), einem spezifischen Inhibitor der PKA, reduziert wird (Park et al., 2005). Inwieweit die Proteinkinase A ebenfalls die Regulation von Resistenz bzw. die Induktion von Apoptose im Modellsystem *Saccharomyces cerevisiae* reguliert, sollte in dieser Arbeit bearbeitet werden.

1.3.3 Zur Bedeutung des YAP1- Transkriptionsfaktors für die Resistenz von *Saccharomyces cerevisiae* gegenüber Allicin

Die AP-1 Transkriptionsfaktorenfamilie in Säugetierkulturen ist bedeutsam für die Regulation der Apoptose (Ameyar et al., 2003). Dabei ist eine Aktivierung des AP-1 Transkriptionsfaktors durch oxidativen Stress beobachtet worden (Chiu et al., 2010; Karinand und Shaulia, 2001). Wenngleich AP-1 mit oxidativem Stress verknüpft ist, ist der zentrale Regulator der Stressantwort auf oxidativen Stress das NRF2/ARE-System (s.o.), wobei die Ausbildung einer Disulfidbrücke des redox-sensitiven Kelch-like ECH-associated protein-1 (KEAP), einem Adaptor Protein einer Ubiquitin-Ligase, die die Ubiquitylierung des NRF2 und nachfolgenden proteasomalen Abbau des Nrf2-Proteins vermittelt (Zhang et al., 2004).

Grundlegende Voraussetzung für eine effektive Stressabwehr ist die Detektion der stressenden Konditionen. Im Falle von Redox-Stress kann die Detektion über die Oxidation von Rezeptor-Molekülen erfolgen. Ein prominentes Beispiel dafür ist das NRF2/Keap -ARE System in tierischen

Systemen, das als primäres System zur Abwehr von Schäden durch oxidativen Stress dient (Gold et al., 2012).

Die Aufgabe des zentralen Regulators des Redoxstresses erfüllt in Hefe der Transkriptionsfaktor YAP1, der als basischer Zip-Transkriptionsfaktor mit Verwandtschaft zur Klasse der Jun-Transkriptionsfaktoren in Säugetieren (Moye-Rowley et al., 1989) Gene der Redoxregulation wie der Glutathion-Synthese oder Thioredoxin 2 (*TRX2*) oder an der Detoxifizierung beteiligte Gene (z.B. ABC-Transporter) reguliert (Toone und Jones, 1999). Die Aktivität von YAP1 ist reguliert durch seine Lokalisation (Gulshan et al., 2005; Kuge et al., 1997). YAP1 liegt im Zellkern vor, wird jedoch durch eine Nuclear Export Sequence (NES) für den Export aus dem Zellkern markiert (vermittelt durch das nukleäre Exportin CRM1 (YGR218W) (Kuge et al., 1998; Yan et al., 1998), so dass in nicht gestressten Zellen der hauptsächliche Anteil an YAP1 im Cytoplasma zu finden ist. Neben der bZip Domäne besitzt YAP1 zwei Cystein-reiche Domänen am C-Terminus des Proteins (c-CRD) mit den bedeutenden Cysteinresten (Delaunay et al., 2000) sowie eine N-terminale cysteinreiche Region (N-CRD) (Kuge et al., 2001) und eine Nuclear Export Sequence (NES), die in Folge von Oxidation in der c-CRD durch die Bildung einer Disulfidbrücke maskiert wird (Wood et al., 2004). In der Folge unterbleibt der Export aus dem Kern und YAP1 liegt kernlokalisiert vor. Dort kann das Protein als Transkriptionsfaktor wirken (*ibid.*). Die Wieder-Reduzierung des oxidierten YAP1, das wieder den Export aus dem Kern ermöglicht und somit ein Unterbinden der regulatorischen Funktion bedeutet, wird bewerkstelligt durch TRX2 (Okazaki et al., 2007) (Siehe Abbildung 13).

Die Aktivierung von YAP1 erfolgt durch Peroxide, thiol-modifizierende Substanzen oder Diamid (1,1'-Azobis(N,N-dimethylformamid)) (Delaunay et al., 2000; Kuge und Jones, 1994). Dabei unterscheidet sich die Art und Weise der Aktivierung von Thiolreagenzien und H₂O₂ erheblich hinsichtlich des Mechanismus (Paulsen und Carroll, 2009) als auch der Art und des Umfanges der YAP1-abhängig exprimierten Gene.

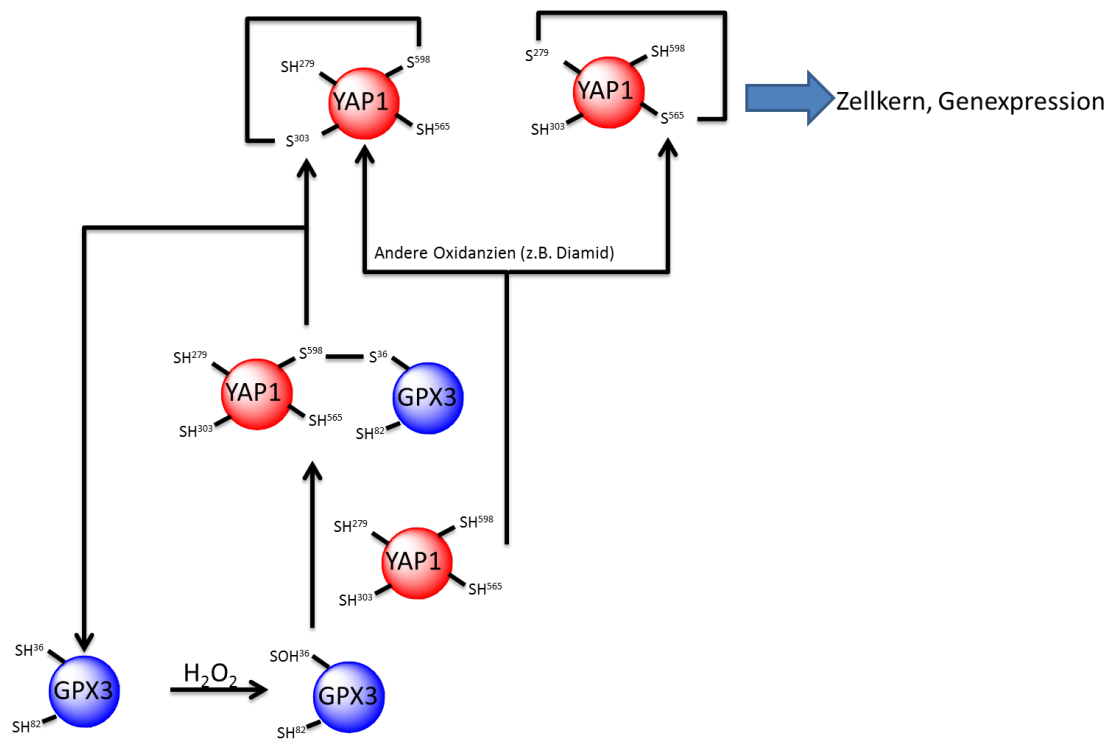


Abbildung 13: Vereinfachte Darstellung der YAP1-Aktivierung durch Oxidantien

Die Oxidationsvorgänge an den vier regulatorisch bedeutsamen Cysteinresten des YAP1 Proteins unterscheiden sich erheblich zwischen H₂O₂ und anderen Oxidantien, beispielsweise Diamid. Im Falle einer Oxidation durch Wasserstoffperoxid findet diese zunächst am Cys³⁶ der Glutathion-Peroxidase 3 (GPX3) statt, wobei das Thiol des Cysteins zu einer Sulfensäure umgewandelt wird. Diese Sulfensäure reagiert mit Cys⁵⁹⁸ des YAP1-Proteins unter Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen GPX3 und YAP1. In einem nachfolgenden Schritt erfolgt eine Umlagerung des Disulfids (mittels Thiol-Disulfid-Austauschreaktion) zu einem intramolekularen Disulfid zwischen Cys⁵⁹⁸ und Cys³⁰³. Im Zuge dessen kommt es zur Regeneration des GPX3, das wieder für die Reaktion mit H₂O₂ zur Verfügung steht.

Andere Oxidantien, beispielsweise Diamid, reagieren direkt mit den Cysteinresten des YAP1-Proteins und führen zur Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen Cys⁵⁹⁸ und Cys³⁰³ bzw. Cys²⁷⁹ und Cys⁵⁶⁵. Die Ausbildung der Disulfidbrücken verhindert einen Kernexport, so dass eine Regulation der Genexpression durch YAP1 erfolgen kann.

So wurde gezeigt, dass 145 Gene nach Exposition sowohl gegen H₂O₂, Acrolein und NEM (N-Ethylmaleimid) YAP1-abhängig verstärkt exprimiert werden (44 Gene werden reprimiert). Allerdings gibt es jeweils große Gruppen, die exklusiv bei der Behandlung mit einem oxidativen Stressor hinsichtlich ihrer Expression verändert werden. Bei der Behandlung mit NEM beispielsweise werden 108 Gene YAP1-abhängig verstärkt exprimiert und 109 Gene reprimiert, die durch keinen der anderen oxidativen Stressoren induziert werden. Darüber hinaus gibt es in allen Kombinationen Gene, die in zwei der drei getesteten oxidativen Stressoren verändert reguliert werden (Ouyang et al., 2011). Die YAP1-regulierte Genexpression ist also kein statischer Vorgang, sondern abhängig vom jeweiligen oxidativen Stressor; welche Mechanismen zu dieser Spezifität führen, ist gegenwärtig nicht bekannt.

1.4 Redox-Effekte in pflanzlichen Systemen am Beispiel von *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

Der Redoxmetabolismus ist insbesondere für Pflanzen ein bedeutender Faktor. Aufgrund des Umstandes, dass Pflanzen als photoautotrophe Organismen neben der Atmung als Quelle von ROS als Ursachen oxidativen Stresses noch die Photosynthese als bedeutende potentielle Ursache für die Bildung oxidativen Stresses haben, ist das pflanzliche Redox-Protektionssystem besonders ausgeprägt (Foyer und Shigeoka, 2011). Die Photosynthese stellt unter optimalen Bedingungen eine ausreichende Menge an Reduktionsäquivalenten bereit, die in Redoxkreisläufe wie den Foyer-Halliwell-Asada-Cyclus eingespeist werden und für reduzierende Bedingungen in photosynthetisch aktiven Organen der Pflanze sorgen (Noctor und Foyer, 1998). Die generellen Mechanismen der ROS-Protektion entsprechen hinsichtlich der enzymatischen- wie nichtenzymatischen Systeme den übrigen eukaryoten Systemen.

Bei Behandlung von *Arabidopsis* mit Ozon als oxidativem Stressor konnte gezeigt werden, dass die Biosynthese des Redoxpuffers Glutathion durch die beiden mit Stress in Verbindung stehenden Pflanzenhormone Salicylsäure und Ethylen reguliert wird (Yoshida et al., 2009). Deshalb ist ein geregelter Salicylsäurestatus für den Redoxhaushalt notwendig (Mateo et al., 2006). Salicylsäure reguliert ferner die Expression von redoxregulierenden Genen wie spezifischen Glutaredoxinen (Ndamukong et al., 2007). Darüber hinaus kann Glutathion durch eine oxidative posttranslationale Modifikation des GSH1-Proteins in Form der Ausbildung eines Disulfids in seiner enzymatischen Funktion aktiviert werden (Jez et al., 2004). Jasmonsäure ist ebenfalls ein wichtiger Resistenzfaktor gegenüber biotischem und abiotischem Stress (Creelman und Mullet, 1995).

Neben diesen Faktoren, die die Stressresistenz von *Arabidopsis* gegen oxidativen Stress beeinflussen, gibt es eine Vielzahl weiterer Systeme, die sowohl auf Ebene der Enzymkatalyse als auch der Signalweiterleitung auf die Stressbedingungen reagieren.

Um derartige Faktoren zu identifizieren, bieten sich Mutagenese-Ansätze als Verfahren der s.g. *forward genetics* an. Möglichkeiten, einen derartigen Mutagenese-ansatz durchzuführen, bestehen zum Beispiel in der Behandlung mit Ethylmethansulfonat (EMS), das Punktmutationen durch Alkylierung des Guanins bedingt (Maple und Moller, 2007). Ein in Pflanzen weiterhin gebräuchliches Verfahren ist die Insertion von s.g. T-DNA (Transfer-DNA) in das pflanzliche Genom (Krysan et al., 1999). Wie auch die EMS-Mutagenese führt dieses Verfahren zu einer Mutation, die zu einem Funktionsverlust (*knock-out*) bzw. einer Reduktion der Funktion im Falle einer Mutation im Promoterbereich des betreffenden Gens führt (*ibid.*). Eine Möglichkeit, sowohl eine Knock-out Mutation mit einer Überfunktion von Genprodukten durch erhöhte Expression zu erreichen, ist das s.g. Activation Tagging (Weigel et al., 2000). Das Verfahren basiert auf dem Prinzip, dass ein Vektor verwendet wird mit einer T-DNA Sequenz, die multimere „transcriptional enhancer sequence“ beinhalten aus dem Cauliflower Mosaic virus (CMV); diese Sequenzen bedingen eine erhöhte Transkription von Genen in der Umgebung über das durch den endogenen Promoter bedingte Transkriptionslevel hinaus. Auf diese Weise können Knockout Mutanten erzeugt werden, die für das Gen ausgeknockt sind, in das die T-DNA inseriert. Alternativ können sich *gain of function* Mutationen

hinsichtlich eines bestimmten Phänotyps ergeben, der dadurch bedingt ist, dass Gene in der Umgebung der T-DNA Insertion durch die Enhancer Sequenz in ihrer Expression verstärkt werden (van der Fits et al., 2001; Weigel et al., 2000).

Die Wurzel als nicht-photosynthetisch aktives Organ ist in hohem Maße in seiner Entwicklung abhängig von Änderungen des Redoxzustandes. So konnte eine Mutante entdeckt werden, die nicht in der Lage ist, ein Wurzelmeristem aufrecht zu erhalten (*rml1* für *root-meristem less*) (Vernoux, 2000). Eine pharmakologische Inhibierung der Glutathionbiosynthese durch den spezifischen Inhibitor Buthionin-Sulfoximine (BSO) kann den Phänotyp imitieren (*ibid.*). Das *RML1* Gen codiert für eine γ -Glutamylcysteinyligase, die den ersten Schritt der Biosynthese des Glutathions katalysiert. Dabei ist die Glutathionabhängigkeit der Wurzelentwicklung eng mit dem Pflanzenhormon Auxin verknüpft. Auxin reguliert konzentrationsabhängig das Wurzelwachstum; während niedrige Konzentrationen das Wurzelwachstum fördern, inhibieren es hohe Konzentrationen. Aus diesem Grunde ist die Regulation der Auxinkonzentration entscheidend für die Kontrolle des Wachstum (Overvoorde et al., 2010); neben der Synthese in Embryos, Blättern und Wurzeln spielt auch der Transport von Auxin eine nicht minder große Bedeutung, so dass in der Pflanze Auxingradienten zur Kontrolle pflanzlicher Entwicklung ausgebildet werden (Woodward und Bartel, 2005). Dabei wird Auxin in die Zellen durch das AUX1 Carrier Protein hineintransportiert, während der Export durch verschiedene Vertreter der PIN-Familie erfolgt. Welche PIN-Proteine den Export vermitteln, ist abhängig von Entwicklungszustand und Organ (Blilou et al., 2005). Für die Ausbildung des Auxin-Gradienten ist eine genaue Lokalisation der PIN-Proteine an der basipetalen bzw. apikalen Seite der Zellen notwendig, die durch das Actin-Cytoskelett vermittelt wird (Rahman et al., 2007). Auxin wird durch den TIR1 Rezeptor perzipiert, was den Proteinabbau des AUX/IAA Proteins induziert, verbunden mit einer Freisetzung des „Auxin Response Factors (ARF)“, der die auxinabhängige Genexpressionsänderung vermittelt (Lau et al., 2008).

Bedeutsam für die bereits erwähnte Abhängigkeit der Wurzelentwicklung von Glutathion ist die Interaktion mit Auxin. Eine Behandlung von Arabidopsis mit BSO führt konzentrationsabhängig zu einer Inhibierung des Wurzelwachstums, zugleich aber auch zu massiven Beeinflussungen des Auxingradienten (Koprivova et al., 2010). Darüber hinaus werden Mutanten der Auxin-Signalweiterleitung (*axr* für *Auxin-Response*) in ihrer Wurzelentwicklung nach BSO-Behandlung weniger inhibiert als der Wildtyp (*ibid.*).

Der Nachweis von Auxin *in vivo* erfolgt mit Hilfe verschiedener Methoden. So beruht das DR5::GFP Konstrukt auf dem Prinzip, dass ein Reportergen wie GFP unter die Kontrolle des auxinresponsiblen Promoters *DR5* gestellt wird. Somit erfolgt die Expression des Reportergens in Abhängigkeit von der Auxinkonzentration in der Zelle (Fuhrer, 1982). Dabei stellt DR5 ein künstliches Auxin-Reponse Element dar (ARE), das durch das Aux1/IAA System (s.o.) aktiviert wird (Guilfoyle et al., 1998; Ulmasov et al., 1997).

Ein alternatives Nachweisverfahren für Auxin ist das DII-VENUS System. Auch dieses System beruht auf einer Interaktion mit dem Aux1/IAA System. Hierbei wird VENUS, eine modifizierte Form des Gelb-fluoreszierenden Proteins (YFP) *in frame* mit der Aux1/IAA Auxin-Interaktionsdomäne (DII)

fusioniert. Dieses Konstrukt steht unter Kontrolle eines konstitutiven 35S-Promoters. In Anwesenheit von Auxin wird nach Perzeption durch den TIR1 die Auxin-Interaktionsdomäne von AUX1/IAA für den Abbau durch das Proteasom markiert. Für das DII-Venus Konstrukt bedeutet das, dass Auxin zu einer Ubiquitinylierung des YFP-AUX/IAA Interaktionsdomäne-Konstruktes führt. Folglich nimmt – im Gegensatz zum DR5-Konstrukt – die Fluoreszenz des DII-VENUS in Anwesenheit von Auxin ab (Brunoud et al., 2012).

Diese Methoden werden genutzt, um den Effekt von Allicin auf die Auxinverteilung in Wurzeln von Arabidopsis nachzuvollziehen.

1.5 Ein methodischer Aspekt – Überlegungen zur Physik und Biologie des Hemmhof-tests als Methode zur Feststellung antibiotischer Potenz

Eine bedeutende Methode innerhalb der vorliegenden Arbeit ist der sog. Hemmhof-test als Bioassay zur Feststellung unterschiedlicher Anfälligkeit von Mikroorganismen gegenüber antibiotisch aktiven Substanzen wie Allicin und H₂O₂. Einige physikalisch-chemische Überlegungen können sinnvoll sein, um die Aussagekraft dieses Assays bewerten zu können. Dabei lässt sich dieser Test eher als physikochemischer Assay denn als biologischer Test ansehen, wobei Mikroorganismen als Indikator dienen, wobei der größte Teil an Variationen physikalisch-chemische Faktoren und nicht biologische Größen beeinflusst (Kavanagh, 1972).

Grundlage dieser Methode ist, dass ausgehend von einer zentralen Stelle, an der ein Antibiotikum appliziert worden ist, sich ein Konzentrationsgradient ausbildet durch Diffusionsprozesse gemäß dem Fick'schen Gesetz (Drugeon et al., 1987). Dieser Konzentrationsgradient korreliert mit der Inhibition des mikrobiellen Wachstums (*ibid.*). Entsprechend ist um die Applikationsstelle des Antibiotikums eine Fläche, in der das mikrobielle Wachstum unterbleibt bzw. verlangsamt wird; diesen Bereich bezeichnet man als Hemmhof.

Erste Versuche, den mathematischen Zusammenhang zwischen der Wachstumsinhibition, der kritischen Konzentration (d.h. der Konzentration, bei der die Zellen absterben bzw. in ihrem Wachstum inhibiert werden) und Diffusion in einem linearen System (ein mit mit Mikroben inokuliertem Agar gefülltes Reagenzglas, durch das ein Antibiotikum diffundiert) machte Cooper (Cooper et al., 1958).

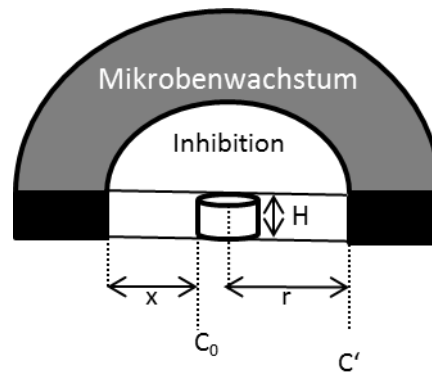


Abbildung 14: Schematische Darstellung des Agar-Diffusionstests (Cooper, 1958).

Das, beispielsweise mit einem Korkbohrer, ausgestanzte Reservoir im Agar wird befüllt mit Testlösung. Die Agarmenge definiert die Höhe (H) des Reservoirs. An dieser Stelle findet sich die initiale Konzentration (C₀), die an der Grenze des Hemmhofs mit C' bezeichnet wird. Der Hemmhof wird durch seinen Radius beschrieben, wobei die Größe x den Radius des Hemmhofs abzüglich des Radius des Reservoirs beschreibt.

Eine Übertragung auf radiale Diffusion für Hemmhöfe, bei der sich, ausgehend von einem im Agar befindlichen Reservoir, die antibiotische Substanz in mit Mikroorganismen inokuliertem Nähragar verteilt, wurde beschrieben unter der Annahme, dass Löcher in den Agar gestanzt werden. Davon ausgehend wurde von Vesterdal (1947) und Humphrey und Lightbown (1952) die folgende Gleichung aufgestellt,

$$r^2 = 2,203 \cdot 4Dt(\log c_0 - \log 4\pi HDtc')$$

wobei r der Radius des Hemmhofs ist, D der Diffusionskoeffizient, c₀ die Konzentration des Antibiotikums an der Applikationsstelle, h die Dicke der Agarschicht und t die Zeit der Agardiffusion (Hewitt, 2003). Daraus ergibt sich, dass der Radius des Hemmhofs abhängig ist von verschiedenen Faktoren: der Diffusionskoeffizient hängt ab von der Zusammensetzung des jeweiligen Mediums, insbesondere von der Konzentration des eingesetzten Agars. Die Schichtdicke (H) wird definiert über das Volumen zellinokulierten Nährmediums, das zum Erstarren in die Petrischale gegeben wird.

Bei der Durchführung des Tests wird eine definierte Menge Hefezellen in ein ebenfalls definiertes Volumen (10 mL) handwarmen Agars gegeben, durch Bewegen im flüssigen Agarmedium verteilt und in eine 9 cm Petrischale gegossen. Aufgrund des Umstandes, dass die Agarschicht flach ist im Vergleich zum Durchmesser des Hemmhofs, kann für ein beliebiges Antibiotikum die Diffusion als Konzentrationsänderung mit der Zeit wie folgt beschrieben werden:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 C}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial C}{\partial r} \right)$$

(Wu et al., 1990)

wobei C die Konzentration, t die Zeit, r der Radius und D der Diffusionskoeffizient ist. D ist dabei abhängig von der Zusammensetzung des Mediums und der eingesetzten Agarkonzentration (s.o.). Insbesondere die in dieser Arbeit eingesetzten Substanzen H₂O₂ und Allicin sind in der Lage, mit Bestandteilen des Nährmediums zu reagieren (z.B. Cystein) oder durch die eingebrachten Mikroorganismen schnell metabolisch umgesetzt zu werden (z.B. H₂O₂ durch Catalasen).

Die Konzentration des Antibiotikums wird beeinflusst durch Reaktion mit Substanzen des Mediums (im Falle von Allicin Cystein und Glutathion) sowie mit Thiolgruppen von Zellen. Die Methode wird ferner limitiert durch den Umstand, dass die Substanzen wasserlöslich sein müssen.

Zusammenfassend können nach (Hewitt und Vincent, 1989) Faktoren beschrieben werden, die die Größe des Hemmhofs beeinflussen:

(1) **Konzentration des Antibiotikums, das im Reservoir platziert wird**

(2) **Volumen der Testlösung**

Es ist wichtig, darauf zu achten, ausreichend große Volumina in das Reservoir zu platzieren, damit geringfügige Änderungen des Volumens (z.B. durch Verdunstung) nicht ins Gewicht zu fallen.

(3) **Dichte des mikrobiellen Inokulums**

Mikroben titrieren antimikrobielles Agens aus.

(4) **Dauer und Temperatur der Diffusion**

Diese Faktoren beeinflussen das mikrobielle Wachstum und die Diffusionsgeschwindigkeit.

(5) **Dicke des Agarmediums**

(6) **Zusammensetzung des Mediums**

Beeinflusst zum einen die Wachstumsgeschwindigkeit der Mikroben sowie die Reaktivität mit Testsubstanzen (z.B. cysteinreiches Medium titriert mehr Allicin aus).

(7) **Wachstumsgeschwindigkeit der Mikroorganismen**

1.6 Fragestellung

Voraussetzung für diese Arbeit war die Beobachtung, dass frischer Knoblauchsaff, dessen hauptsächliche aktive Substanz Allicin ist, sowohl auf Pilze wie auch Pflanzen eine toxische Wirkung zeigt. Deshalb sollte in dieser Arbeit die Frage geklärt werden, ob die Reinsubstanz Allicin für diese Aktivität des Knoblauchsaffs verantwortlich ist und welche Mechanismen der Toxizität zugrunde liegen. Aufgrund der chemischen Natur des Allicins als Thiosulfinat lag nahe, dass Allicin das Redoxgleichgewicht zwischen reduziertem und oxidiertem Glutathion verschiebt. Weil beschrieben worden ist, dass Redoxverschiebungen in Säugetierzellen mit der Verschiebung des zellulären Zustandes bis hin zu Apoptose und Nekrose korrelieren, sollte überprüft werden, ob dieses Modell auf Hefezellen übertragbar ist und folglich Allicin als Reinsubstanz – wie schon für Knoblauchsaff gezeigt – in der Lage ist, Apoptose in Hefe zu induzieren und welche Signalwege daran beteiligt sind.

Aufgrund von Erkenntnissen in menschlichen Systemen war der Protein-Kinase A Signalweg ein Kandidat für einen Signalweg, der an der Induktion der Apoptose beteiligt sein kann. Mit zellbiologischen und genetischen Verfahren sollte getestet werden, ob auch in Hefe der PKA Signalweg bedeutsam ist für die Antwort auf Allicinexposition. Daraus ergibt sich die Frage, welche Faktoren die Ausbildung von Zelltod in Hefe verhindern können. Ausgehend von Genen, die nach Allicinexposition verstärkt exprimiert werden, sollten Faktoren identifiziert werden, die zur Resistenz gegenüber Allicin beitragen. Das nach Allicin am stärksten differenziell regulierte Gen ist der uncharakterisierte Open Reading Frame YKL071w (*OSI1*). Es sollte die Bedeutung von OSI1 für die Resistenz gegenüber Allicin getestet werden und Faktoren identifiziert werden, die für die

allicinabhängige Expressionsänderung verantwortlich ist. Wenn Allicin über einen Redoxmechanismus wirkt, ist zu erwarten, dass der redoxregulierte Transkriptionsfaktor YAP1, dessen Aktivierung durch die Bildung eines intramolekularen Disulfids erfolgt und der die antioxidative Antwort auf Stress reguliert, an der Antwort auf Allicinexposition beteiligt ist. Diese Hypothese gilt es zu testen.

Diese Befunde haben Bezug zu medizinischen Anwendungen. Daher sollte ferner getestet werden, ob Allicin – in Form von Knoblauchsaff oder Allicin – ebenfalls eine Wirkung auf Säugetierzellen hat. Dazu soll die Beeinflussung des Redoxstatus, der Zellproliferation, der Cytotoxizität und Apoptoseinduktion untersucht werden.

Abschließend sollte die Frage bearbeitet werden, warum Allicin phytotoxisch wirkt und ob an diese Wirkung ebenfalls mit der Redoxwirkung des Glutathions korreliert. Dazu sollen ebenfalls genetische und zellbiologische Methoden angewendet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Eine detaillierte Liste von verwendeten Chemikalien, Enzymen, DNA-Größenmarkern, Kits, Verbrauchsmaterial sowie eine Liste von eingesetzten Geräten sind im Anhang der Arbeit beigefügt.

2.2 Biologisches Material

2.2.1 Plasmide und Vektoren

Folgende Plasmide und Vektoren wurden in der Arbeit verwendet.

Plasmid-Name	Selektion in <i>E. coli</i>	Selektion in <i>S. cerevisiae/Arabidopsis</i>	Herkunft
BclxL	Amp ^R	URA3	Dr. Stephen Manon, INRA Bordeaux (Arokium et al., 2004)
BclxLdeltaC	Amp ^R	URA3	Dr. Stephen Manon, INRA Bordeaux (Arokium et al., 2004)
pUG35-AIF-GFP	Amp ^R	URA3	Prof. Dr. Frank Madeo, Universität Graz (Wissing et al., 2004)
ABP140-GFP	Amp ^R	URA3	Diese Arbeit
pAFS91 (TUB1-GFP)	Amp ^R	URA3	Dr. Aaron Straight, Stanford University (Straight et al., 1997)
pDH20 (YKL071w-Überexpression)	Amp ^R	LEU2	Dr. Dominik Heer, ETH Zürich (Heer et al., 2009)
pGREG-OSIp-Luciferase	Amp ^R	URA3/KanMX4	Ivan Schlembach, RWTH Aachen

2.2.2 Oligonukleotide

Eine detaillierte Aufstellung über die verwendeten Oligonukleotide ist im Anhang zu finden unter Punkt 7.2.5.

2.2.3 Bakterien

Escherichia coli K12

K12 ist ein prototropher Wildtyp-Stamm von *Escherichia coli* und wird zur Bestimmung der Allicin-Konzentration mittels Hemmhoftest eingesetzt (wie beschrieben bei (Curtis et al., 2004).

Für molekularbiologische Arbeiten wurde der *E. coli* Stamm DH5 α verwendet, der folgendermaßen spezifiziert ist:

fhuA2 Δ (argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ 80 Δ (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi1 hsdR17

2.2.4 Hefestämme

RS453

MAT α ade2 Δ 1 his3 Δ 11,15 ura3 Δ 52 leu2 Δ 3,112 trp1 Δ 1 (Wimmer et al., 1992)

Die in dieser Arbeit verwendeten Hefemutanten leiten sich ab von den Referenzstämmen BY4742 (Mat α ; haploid) und BY4743 (diploid):

BY4742

MAT α ; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; lys2 Δ 0; ura3 Δ 0 (Brachmann et al., 1998)

BY4743

MATa/ α his3 Δ 1/his3 Δ 1 leu2 Δ 0/leu2 Δ 0 LYS2/lys2 Δ 0 met15 Δ 0/MET15 ura3 Δ 0/ura3 Δ (Brachmann et al., 1998)

Von diesen beiden Wildtyp-Hefestämmen leiten sich die folgenden getesteten Mutanten ab:

Hintergrund BY4742 (1n)				
Δ trx3	YCR083W	Mitochondriales Thioredoxin	Deletion	EUROSCARF
Δ pho8	YDR481C	Regulierbare vakuoläre alkalische Phosphatase	Deletion	EUROSCARF
Δ ctt1	YGR088W	Cytosolische Catalase T	Deletion	EUROSCARF
Δ trx2	YGR209C	Cytoplasmatisches	Deletion	EUROSCARF

		Thioredoxin Isoenzym.		
$\Delta gsh1$	YJL101c	γ -Glutamylcystein-Synthetase, der erste Schritt der Glutathionbiosynthese	Deletion	EUROSCARF
$\Delta ykl071w (=osi1)$	YKL071w	Putative Oxidoreduktase mit unbekannter biochemischer Funktion	Deletion	EUROSCARF
$\Delta trx1$	YLR043C	Cytoplasmatisches Thioredoxin Isoenzym.	Deletion	EUROSCARF
$\Delta trx2$	YGR209C	Cytoplasmatisches Thioredoxin Isoenzym.	Deletion	EUROSCARF
$\Delta trx3$	YCR083W	Mitochondriales Thioredoxin	Deletion	EUROSCARF
$\Delta yap1$	YML007w	Redox-sensitiver basischer Leucin-Zipper Transkriptionsfaktor	Deletion	EUROSCARF
$\Delta ras2$	YNL098C	GTP-Bindeprotein	Deletion	EUROSCARF
$\Delta aif1$	YNR074C	Apoptose-induzierender Faktor	Deletion	EUROSCARF
$\Delta gsh2$	YOL049w	Glutathion-Synthetase, der zweite Schritt der Glutathionbiosynthese	Deletion	EUROSCARF
$\Delta pde2$	YOR360C	cAMP Phosphodiesterase mit hoher Substrataffinität	Deletion	EUROSCARF
$\Delta glr1$	YPL091w	Glutathion-Reduktase (cytosolisch/mitochondrial)	Deletion	EUROSCARF
Hintergrund BY4743 (2n)				
$\Delta bcy1(BCY1:bcy1)$	YIL033c	Regulatorische Unter-einheit der Proteinkinase A	Deletion	EUROSCARF
LT21 ($BCY1:bcy1$)	YIL033c	Heterozygote, von Euroscarf unabhängige Mutante im Locus YIL033 c (Tabera et al., 2006)	Deletion	Dr. R. Gonzalez, Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC), Madrid, Spanien
LT22 ($bcy1:bcy1$)	YIL033c	Homozygote Mutante im Locus YIL033 c (Tabera et	Deletion	Dr. R. Gonzalez, Instituto de

		al., 2006)		Fermentaciones Industriales (CSIC), Madrid, Spanien
$\Delta tpk1$	YJL164c	Katalytische Untereinheit der Proteinkinase A	Deletion	EUROSCARF
$\Delta tpk3$	YKL166c	Katalytische Untereinheit der Proteinkinase A	Deletion	EUROSCARF
$\Delta tpk2$	YPL203	Katalytische Untereinheit der Proteinkinase A	Deletion	EUROSCARF

2.2.5 Zelllinien

Name	Organismus	Zelltyp	Referenz
A549	<i>Homo sapiens</i>	Alveolare basale Epithelzellen des humanen Adenocarcinoms	(Giard et al., 1973)
3T3	<i>Mus musculus</i>	Fibroblasten	(Todaro und Green, 1963)
HUVEC	<i>Homo sapiens</i>	Primäre Nabelvenen-Epithelzellen	(Park et al., 2006)
HT29	<i>Homo sapiens</i>	Kolorektales Carcinomepithel (Fogh et al., 1977)	(Fogh et al., 1977)
MCF7	<i>Homo sapiens</i>	Humanes Mammakarzinom	(Soule et al., 1973)
Raw 264.7	<i>Mus musculus</i>	Murine Macrophagen, etabliert von einem mittels Abelson Murin-Leukämie Virus induzierten Tumor	(Raschke et al., 1978)

2.2.6 Pflanzenmaterial

<i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0	Wildtypakzession Columbia		
<i>Arabidopsis thaliana</i> Ws-0	Wildtypakzession Wassilewskija		
<i>Arabidopsis thaliana</i> Cvi	Wildtypakzession Capverdische Inseln		
<i>Arabidopsis thaliana pad2</i> , Hintergrund Col-0	Glutathionbiosynthese-mutante	(Glazebrook und Ausubel, 1994)	Labor Dr. Nikolaus Schlaich
<i>Arabidopsis thaliana vtc1</i> , Hintergrund Col-0	Ascorbatbiosynthese-mutante	(Conklin et al., 2000)	Nottingham Arabidopsis Stock Centre
<i>Arabidopsis thaliana vtc2</i> , Hintergrund Col-0	Ascorbatbiosynthesemutante	(Conklin et al., 2000)	Nottingham Arabidopsis Stock Centre
<i>Arabidopsis thaliana sid2</i> , Hintergrund Col-0	Salicylsäurebiosynthese-mutante	(Nawrath und Métraux, 1999)	Labor Dr. Nikolaus Schlaich
<i>Arabidopsis thaliana coi1</i> , Hintergrund Col-0	Coronatin-insensitive Mutante	(Xie et al., 1998)	Labor Dr. Nikolaus Schlaich
<i>Arabidopsis thaliana</i> transformiert mit DII-Venus Konstrukt	Auxin-Sensorsystem	(Brunoud et al., 2012b)	Labor Dr. Nikolaus Schlaich
<i>Arabidopsis thaliana</i> transformiert mit <i>DR5::GFP</i> Promoterfusionskonstrukt	Auxin-Sensorsystem	(Ulmasov et al., 1997)	Labor Dr. Nikolaus Schlaich
<i>Arabidopsis thaliana</i> transformiert mit konstitutivem <i>35S::GFP</i> Promoterfusionskonstrukt	Fluoreszenzkontrolle		Dr. Thomas Keller, Inst. Für Biologie III (Pflanzenphysiologie), RWTH Aachen.

2.3 Methoden

2.3.1 Pufferlösungen

2.3.1.1 Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Zur Herstellung von 100 mL Puffer werden jeweils benötigt:

TFB I:

0,15 g	10 mM	Calciumchlorid ($\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)
15 mL	205 mM	Glycerin (wasserfrei)
1 mL	Ad 3 mM	3 M Kaliumacetat-Lösung
1,21 g	100 mM	Rubidiumchlorid (RbCl)
0,99 g	50 mM	Mangan(II)chlorid ($\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$)

TFB II:

15 ml	205 mM	Glycerin (wasserfrei)
0,21 g	10 mM	MOPS
1,1 g	73 mM	Calciumchlorid ($\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)

Für die Agarose-Gelelektrophorese

a) Ladepuffer

0,5 % (w/v)	Bromphenolblau
50 % (v/v)	Glycerin
0,1 M	EDTA

In 1x TAE lösen

b) RNA-Probenpuffer

Der Probenpuffer besteht aus einer Mischung von 65 % Formamid (v/v), 22 % Formalin und 13 % 10x MOPS

c) TAE-Elektrophoresepuffer (50x)

Die Angaben beziehen sich auf die Herstellung von 1 L Puffer

242 g	2 M	TRIS
57,1 mL	1 M	Essigsäure
100 mL	Ad 50 mM	0,5 M EDTA-Lösung, pH=8

d) MOPS-Elektrophoresepuffer für denaturierende RNA-Gele (10x)

Die Angaben beziehen sich auf die Herstellung von 1 L 10-fach konzentriertem Puffer

41,85 g	3-(N-morpholino)propanesulfonsäure (MOPS)
4,10 g	Natriumacetat
0,292g	EDTA

Der pH-Wert wird mit NaOH auf 7 eingestellt.

2.3.1.2 Natriumphosphatpuffer für die Glutathion-Messung

Es werden jeweils Natrium-Dihydrogenphosphat-Lösung (Lösung 1) und Di-Natriumhydrogenphosphatlösung (Lösung 2) in einer Molarität von 143 mM hergestellt. Das bedeutet für Lösung 1 19,73 g L⁻¹ NaH₂PO₄·xH₂O und für Lösung 2 20,3 Na₂HPO₄. Lösung 1 und Lösung 2 werden in einem Verhältnis von 1:5,25 gemischt und der Mischung EDTA zu einer finalen Konzentration von 6,3 mM (2,35 g) zugegeben. Der pH wird mit H₃PO₄ bzw. NaOH auf pH 7,5 eingestellt.

2.3.1.3 Lösungen für die Minipräparation von DNA aus *E. coli***a) Lösung I**

0,9 g	50 mM	Glucose
0,3 g	25 mM	TRIS
0,29 g	10 mM	EDTA

Mit VE-Wasser auf 100 mL auffüllen.

b) Lösung II

0,9 g	2 N	Natriumhydroxid
1 g	34 mM	SDS

Mit VE-Wasser auf 100 mL auffüllen.

c) Lösung III

29,4 g	4,3 M	Kaliumacetat
11,5 mL	2,9 M	Eisessig
28,5 mL		H ₂ O

2.3.1.4 Hefe-Lysispuffer für DNA-Extraktion und Plasmid-Rescue

Die Angaben beziehen sich auf die Herstellung von 100 mL Puffer.

2 mL	3,3 mM	Triton X-100
10 mL	Ad 3 M	10 % (w/v) SDS-Lösung
0,58 g	100 mM	Natriumchlorid
0,2 mL	1 mM	0,5 M EDTA-Lösung
1 mL	Ad 10 mM	1 M TRIS, pH 8

2.3.1.5 TES-Puffer zur RNA-Extraktion aus Hefe

Die Angaben beziehen sich auf die Herstellung von 100 mL Puffer.

1 mL	Ad 1 mM	1 M TRIS-Lösung, pH=7
10 mL	Ad 1 mM	100 mM EDTA-Lösung
0,5 g	17 mM	SDS

2.3.1.6 Weitere gebräuchliche Puffer**TE-Puffer**

Die Angaben beziehen sich auf die Herstellung von 1 L Puffer.

10 mL	Ad 10 mM	1 M TRIS-Lösung, pH=7,4
10 mL	Ad 1 mM	100 mM EDTA-Lösung

PBS-Puffer

Die Angaben beziehen sich auf die Herstellung von 1 L Puffer

0,2 g	2,7 mM	Kaliumchlorid
0,2 g	1,5 mM	Kalium-Dihydrogenphosphat
1,5 g	10 mM	Dinatrium-Hydrogenphosphat (Wasserfrei)
8 g	136 mM	Natriumchlorid

pH auf 7,4 einstellen.

2.3.2 Antibiotika-Stammlösungen

a) Ampicillin

Ampicillin (100 mg mL^{-1}) wird in bidestilliertem H_2O gelöst. Arbeitskonzentration ist $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ (1:1000 verdünnt).

b) G-418 (Geneticin)

G-418 wird verwendet, um eine Selektion auf das Vorhandensein der KanMX4-Kassette in Hefe durchzuführen. Diese Kassette wird bei Deletionsmutanten an die Stelle des zu deletierenden Gens durch Rekombination eingeführt. Ein 1000x Stock wird als 200 mg mL^{-1} Lösung hergestellt und sterilfiltriert.

2.3.3 Nährmedien

2.3.3.1 Nährmedium für *Escherichia coli*

LB-Medium (=lysogeny broth)

5 g/L	Hefeextrakt
10 g/L	Trypton
5 g/L	NaCl
(20 g/L	Agar)

Der pH-Wert wird vor dem Autoklavieren pH=7 eingestellt. Es wurde für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert. Zur Selektion von transformierten *E. coli* Zellen wurden Antibiotika zugegeben. Alle, in dieser Arbeit verwendeten Plasmide trugen ein Resistenzgen gegen Ampicillin.

2.3.3.2 Nährmedien für Hefe

a) YPD Medium (= Yeast Peptone Dextrose)

YPD ist ein komplexes Vollmedium, das geeignet ist, Hefezellen bis zu einer hohen Dichte zu kultivieren. Aufgrund seiner Bestandteile Hefeextrakt und Pepton enthält es Glutathion und ist folglich nicht für Anwendungen geeignet, bei denen eine Aufnahme von z.B. Glutathion das Ergebnis beeinflussen könnte.

10 g/L	Hefeextrakt
20 g/L	Pepton
20 g/L	Glucose
(20 g/L	Agar bei Festmedien)

b) YPGal-Medium (= Yeast Peptone Galactose)

YPGal ist ein dem YPD analoges Komplexmedium, das verwendet wird für die Induktion von Galactose-Promotern. Anstelle der Glucose wird Galactose verwendet.

c) SD-(Selektions-)medien (zur Selektion von Transformanten oder Promoterinduktionen oder zur Anzucht von Hefe mit definierter Nährstoffkomposition)

7 g/L	Yeast Nitrogen Base (YNB) mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
0,8 g/L	CSM dropout
40 g/L	Glucose
15 g/L	Agar

YNB, Glucose und Agar werden in Wasser gegeben und für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert; CSM wird ebenfalls in Wasser gelöst und sterilfiltriert. Unter sterilen Bedingungen werden beide Komponenten zusammengegeben.

d) SD-Medium zur Kultivierung von frisch transformierten Hefen

Für frisch transformierte Hefezellen wurde SD-Medium verwendet, dem 1 M Sorbitol (182,2 g/L) zugesetzt wurde.

2.3.3.3 Nährmedien für Zellkulturen aus Maus oder Mensch

RPMI 1640 (Gibco-BRL, Cergy-Pontoise, Frankreich) wurde 10 % Fetalem Kalbsserum (FCS), 2 mM L-Glutamin (finale Konzentration), 100 U mL⁻¹ Penicillin und 100 µg mL⁻¹ Streptomycin versetzt.

2.3.3.4 Nährmedien für die Kultivierung von Arabidopsis auf Platten

Zur Kultivierung von Arabidopsis auf Agar-Platten wurde Hoagland-Medium verwendet (Hoagland und Arnon., 1950):

Calciumnitrat [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$]	1,0 mM
Kaliumnitrat [KNO_3]	5,1 mM
Magnesiumsulfat [$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$]	0,5 mM
Magnesiumchlorid [MgCl_2]	0,5 mM
Ammonium-dihydrogenphosphat [$(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$]	0,13 mM
Ammoniumnitrat [NH_4NO_3]	30 µM
Natriumhydroxid [NaOH]	31 µM
Eisen-EDTA	22 µM
Borsäure [H_3BO_3]	9,7 µM
Mangansulfat [MnSO_4]	2 µM

Zinkchlorid [ZnCl ₂]	0,31 µM
Kupfersulfat [CuSO ₄]	0,21 µM
Natriummolybdat [Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O]	0,14 µM
Kobaltnitrat [Co(NO ₃) ₂ ·6 H ₂ O]	0,086 µM

Zur Herstellung von festem Hoagland-Medium wurde der Mischung 15 g/L Plant-Agar zugesetzt. Das Medium wird für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert.

2.4 Herstellung und Analyse von Knoblauchsaff

2.4.1 Herstellung von Knoblauchsaff

Zur Herstellung von Knoblauchsaff, der in Versuchen zum Einsatz kommt, wird handelsüblicher Knoblauch aus dem lokalen Handel bezogen, die Zehen werden geschält und in einem Entsafter zerkleinert. Der erhaltene Saft wird in einem 50 ml Falcon gesammelt und anschließend für 10 Minuten bei 2800xg zur Abtrennung fester Bestandteile zentrifugiert (Megafuge 1 OR), bevor der Überstand mit Hilfe eines Büchnertrichters und einer Saugflasche filtriert wird. Anschließend wird der Allicin Gehalt mittels HPLC bestimmt.

2.4.2 HPLC Analyse von Knoblauchsaff

Zur Analyse des Knoblauchsaffes sowie des chemisch synthetisierten Allicins wurde eine im Labor etablierte und beschriebene Methode verwendet (Gruhlke et al., 2010b; Portz, 2008), die in Anlehnung an die von Keusgen und Mitarbeitern beschriebene Methode modifiziert wurde (Keusgen et al., 2003). Eine wichtige Änderung besteht darin, dass das wässrige Lösungsmittel im Gegensatz zu der von Keusgen beschriebenen Methode nicht mit Phosphorsäure, sondern mit Ameisensäure angesäuert wurde.

a) Vorbereitung der Proben

Knoblauchsaff, dessen Gewinnung in 2.4.1 beschrieben wurde, wurde mit bidestilliertem Wasser 1:10 verdünnt. Zur Vermeidung des Eintrags von feinen Partikeln in das HPLC-System wurde das Gemisch sterilfiltriert. 100 µL wurden in ein Glasvial gegeben und bis zur Injektion in die HPLC zur Vermeidung von Zersetzungsreaktionen des Allicins kalt gelagert.

b) Durchführung der HPLC-Messung

Zum Prinzip

Allicin enthält aufgrund seiner Allylgruppen zwei ungesättigte Kohlenwasserstoffe, die Licht im kurzen UV-Bereich absorbieren mit einem Absorptionsmaximum von 254 nm. Ein

Absorptionsspektrum von chemisch synthetisiertem Allicin ist in Abbildung 15 zu sehen. Aufgrund dessen wird UV-Absorption als Detektionsverfahren für die Chromatographie verwendet.

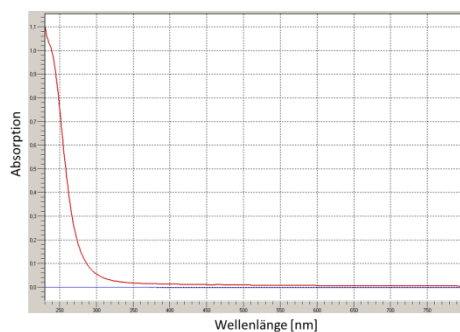


Abbildung 15: Absorptionsspektrum von Allicin im Wellenlängenbereich von 230 – 800 nm

Allicin wurde zu einer Konzentration von $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($\approx 3,1 \mu\text{M}$) in bidestilliertem Wasser gelöst und im Photometer ein Wellenlängenscan in Quarzküvetten durchgeführt. Die blaue Linie repräsentiert die Wasserkontrolle, die im getesteten Bereich keine Absorption zeigt, während die Allicinprobe einen deutlichen Anstieg der Absorption ab ca. 300 nm zeigt. Die erhöhte Absorption ist auf die Allylgruppen des Allicins zurückzuführen.

Durchführung

Für die Messung von Allicin wurden standardmäßig 20 μL Probe in das System injiziert. Zur Detektion wurde ein UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 254 nm verwendet. Es kam eine Reverse-Phase Säule zum Einsatz. Die bei der HPLC genutzten Gerätschaften sind unter Punkt 8.2.4. aufgeführt.

Folgende Laufmittel wurden verwendet:

Laufmittel A

30 Vol.-% Methanol (HPLC-Grad)

69,9 Vol.-% Bidest. Wasser

0,1 Vol.-% konz. Ameisensäure

Laufmittel B

100 Vol.-% Methanol (HPLC-Grad)

Mit einer Flussrate von 1 mL min^{-1} wurde die Chromatographie mit folgendem Gradient durchgeführt:

Tabelle 3: Lösungsmittelgradienten-programm bei der HPLC-Analyse von Allicin und Knoblauchsaff

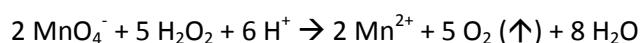
Zeit [min]	% Laufmittel A	% Laufmittel B
0	80	20
25	70	30
45	20	80
65	80	20
70	Ende	

2.5 Chemische Methoden

2.5.1 Permanganometrische Titration zur Bestimmung der Wasserstoffperoxid-konzentration

Die permanganometrische Bestimmung von Wasserstoffperoxid war eine notwendige Vorprobe zur Überprüfung der Konzentration des Wasserstoffperoxid-Vorrates für Synthesen und biologische Tests, weil Wasserstoffperoxid instabil ist.

Die Umsetzung von H_2O_2 in schwefelsaurer Lösung erfolgt nach der Formel (Jander et al., 1995):



Zur Bestimmung wurden 20 mL einer 1 mM H_2O_2 -Lösung hergestellt, mit 60 ml 1 M H_2SO_4 versetzt und mit VE-Wasser auf 200 ml aufgeegossen. Als Maßlösung diente eine 0,02 M KMnO_4 Lösung. Die Lösung wird im Eisbad titriert; bei jeder neuen Zugabe von Maßlösung ist darauf zu achten, dass die Analyselösung vollständig entfärbt ist.

Es entspricht zur Berechnung 1 mL 0,02 M KMnO_4 -Lösung 0,05 mmol H_2O_2 bzw. 1,7007 mg H_2O_2 .

2.5.2 Destillation und Analytik von Diallyldisulfid

Diallyldisulfid wurde im Vakuum (1mbar) destilliert im Institut für Makromolekulare Chemie der RWTH Aachen.

Die Reinheit der Substanz wurde mittels HPLC mit einem von Lawson beschriebenen isokratischen HPLC-Programm (80% Methanol, 20% Wasser) in einer C_{18} -RP Säule bei 254 nm überprüft (Anwar, 2009). Ein beispielhaftes Chromatogramm ist dem Anhang unter Punkt 7.4 zu entnehmen.

2.5.3 Synthese von Allicin ausgehend von Diallyldisulfid (DADS)

Prinzip

Die Synthese von Allicin nach dem folgenden Protokoll beruht auf dem Prinzip der Oxidation von Schwefel in saurem Milieu unter Verwendung von Wasserstoffperoxid, entsprechend der folgenden Reaktionsgleichung, die in Abbildung 16 dargestellt ist:

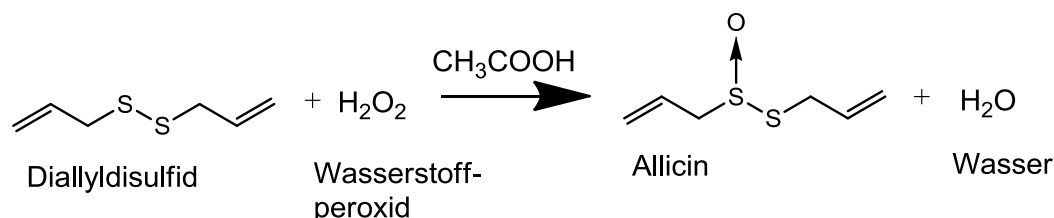


Abbildung 16: Prinzip der Allicinsynthese durch Oxidation des Diallyldisulfids durch H₂O₂.

Allicin wird gewonnen durch Oxidation von Diallyldisulfid mittels Wasserstoffperoxid unter sauren Bedingungen, wie sie durch die Zugabe von Essigsäure erreicht werden.

Durchführung

Die Allicinsynthese wurde in Anlehnung an die von Lawson & Wang dargestellte Synthesevorschrift durchgeführt (Lawson und Wang, 2001), aber hinsichtlich Ausbeute und Reinheit verbessert (in Zusammenarbeit mit Dr. Awais Anwar, Norwich) (Gruhlke et al., 2010b).

2 g (=13 mmol) des destillierten DADS (99 % Reinheit) wurden in 5 ml kaltem (4°C) Eisessig gelöst und tropfenweise unter Rühren im Eisbad 3 ml vorgekühltes H₂O₂ (30%) zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 30 Minuten rührend im Eisbad belassen. Anschließend wurde die Reaktion unter Rühren bei Raumtemperatur für zwei Stunden fortgesetzt und durch die Zugabe von 25 ml bidest. Wasser wurde die Reaktion gestoppt.

Die organischen Bestandteile, die das Reaktionsprodukt – wie auch das Edukt DADS – enthalten, wurden im Scheidetrichter mittels Zweiphasenextraktion mit Dichlormethan (DCM) abgetrennt. Um die Essigsäure aus dem Reaktionsansatz zu entfernen, wurde die organische Phase mehrfach mit einer 5% NaHCO₃-Lösung im Scheidetrichter gewaschen, bis keine Gasentwicklung mehr zu beobachten war und der pH-Wert 6-7 beträgt. Das organische Lösungsmittel DCM wurde im Rotationsverdampfer entfernt und das erhaltene Produkt, das in Form eines gelblichen Öls vorliegt, in 200 ml Wasser (18,2 MΩ) aufgenommen. An dieser Stelle erfolgte eine HPLC Analyse des Ansatzes, um zu überprüfen, ob nicht umgesetztes DADS nachweisbar ist. Konnten Reste dieses Eduktes nachgewiesen werden, wurde der Reaktionsansatz zum Entfernen des DADS mit 0,1 Volumenanteilen Hexan versetzt und ausgeschüttelt.

Die wässrige Phase wurde mit DCM extrahiert, mit MgSO₄ getrocknet und *in vacuo* das DCM entfernt.

Die Reinheit des erhaltenen Produktes wurde mittels HPLC bestimmt (siehe 2.4.2) und die Identität des erhaltenen Produktes mittels ¹H NMR bestimmt (500 MHz CDCl₃ δ34,80; 56,30; 116,65; 122,65;

124,87; 129,50). Die NMR-Analysen wurden dankenswerterweise vom Institut für Makromolekulare Chemie, RWTH Aachen, durchgeführt. Ausbeuten wurden gravimetrisch bestimmt.

2.6 Proteinchemische Methoden

2.6.1 Proteinmengenbestimmung mittels Bradford-Assay

a) Herstellung des Testreagenz

Das Nachweis-Reagenz wird hergestellt, indem 10 mg Coomassie Brilliant Blue in 5 mL 95 % Ethanol gelöst werden, 10 mL Phosphorsäure (100 %) hinzugegeben und die Lösung schließlich mit bidestilliertem Wasser auf 100 mL aufgefüllt wird.

b) Kalibration des Assays

Vor der Durchführung des Assays wird der Assay mit bekannten Proteinmengen kalibriert. Dazu wird BSA verwendet. BSA wird im jeweiligen Puffer (weil verschiedene Substanzen, so z.B. Triton X-100, die Bradford-Reaktion beeinflussen, in dem auch die zu quantifizierenden Proteine vorliegen), gelöst und in verschiedenen Konzentrationen (entsprechend der zu erwartenden Proteinkonzentrationen) kalibriert. Eine typische Tabelle, die eine Bradford-Kalibration darstellt, ist in Tabelle 4 gezeigt, ausgehend von einer Stocklösung mit einer Konzentration von 1 mg mL^{-1} .

Tabelle 4: Typische Verdünnungen zur Kalibration des Bradford-Assay im Bereich von 0 bis 1 mg mL^{-1} BSA.

Konzentration	Menge Stocklösung	BSA-	Menge Puffer	Menge Bradford- Reagenz
$0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$	0 μL		800 μL	200 μL
$125 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$	100 μL		700 μL	200 μL
$250 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$	200 μL		600 μL	200 μL
$375 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$	300 μL		500 μL	200 μL
$500 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$	400 μL		400 μL	200 μL
$625 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$	500 μL		300 μL	200 μL
$750 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$	600 μL		200 μL	200 μL
$875 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$	700 μL		100 μL	200 μL
$1000 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$	800 μL		0 μL	200 μL

Die Messung erfolgt photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm. Alle Werte zur Kalibration werden in drei parallelen Ansätzen vorbereitet und gemessen; für eine Kalibrationsgerade werden die Mittelwerte aus den drei parallelen Ansätzen verwendet. Als Blank dienen 800 µL Puffer, die mit 200 µL Bradford-Reagenz versetzt worden sind.

c) Durchführung des Assays

Entsprechend der Kalibration werden 200 µL Proteinlösung (im entsprechenden Extraktionspuffer) mit 600 µL Puffer vermischt und anschließend mit 200 µL Bradford-Reagenz versetzt. Auch hier werden 800 µL Puffer mit 200 µL Bradford-Reagenz als Blank verwendet; die Proben werden bei 595 nm im Photometer gemessen.

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 Präparation von Nukleinsäuren

2.7.1.1 Minipräparation aus *E. coli*-Zellen mittels alkalischer Lyse

1,5 bis 2 mL einer Übernachtskultur werden durch Zentrifugation (1 Minute bei 14000 rpm; Eppendorf 1 OR) pelletiert; anschließend wird das Pellet in 150 µL Lösung I resuspendiert. Nach Zugabe von 150 µL Lösung II (Lyseschritt) wird das Gemisch durch Invertieren für 30 Sekunden bei Raumtemperatur inkubiert; die Lösung muss schleimig werden. Anschließend werden 150 µL Lösung III zugegeben und durch Invertieren kräftig gemischt (nicht vortexen, damit DNA nicht durch Scherkräfte beschädigt wird). Anschließend werden 2 Tropfen Chloroform zugegeben, um die Abscheidung der Proteinphase zu erleichtern. Die Mischung wird für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert; der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt, 1 mL eiskalter Ethanol zugegeben und 15 Minuten bei 4°C und 20800xg (14000 rpm) zentrifugiert. Der Überstand dieses Zentrifugationsschrittes wird verworfen und das Pellet an der Luft getrocknet, um Ethanolreste zu entfernen. Anschließend wird das Pellet in 50 µL TE-Puffer resuspendiert und 2 µL RNase A (10 mg mL⁻¹) zugegeben; zum Abbau von RNA Kontaminationen wird der Ansatz nun für 1 h bei 37°C inkubiert. Die RNase wird durch 10 minütige Inkubation bei 72°C hitzeinaktiviert. Ab dieser Stelle ist die erhaltene DNA beispielsweise für Restriktionsverdaus verwendbar.

2.7.1.2 Minipräparation aus *E. coli*-Zellen unter Zuhilfenahme eines Präparationskits

Um hochreine DNA aus *E. coli*-Zellen zu erhalten, die z.B. für Sequenzierungsreaktionen verwendet werden konnte, wurde das Miniprep-Kit "Pure Link Quick Plasmid Miniprep" Kit von Invitrogen, Karlsruhe entsprechend den Vorgaben des Herstellers verwendet.

2.7.1.3 DNA-Präparation aus Hefezellen

Die Methode ist abgewandelt von (Hoffman und Winston, 1987).

10 mL einer Übernachtskultur (in YPD) werden durch 10-minütige Zentrifugation (150 x g, Megafuge 1OR) pelletiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 500 µL bidestilliertem Wasser aufgenommen und in ein 2 mL Eppendorf-Gefäß überführt. Die Zellen werden erneut durch einminütige Zentrifugation (15800 x g, Tischzentrifuge Eppendorf 5415) pelletiert. Der Überstand wird abdekantiert und die Zellen im verbleibenden Wasser gevortext. Es werden 200 µL Hefe Lysis-Puffer, 100 µL Phenol, 100 µL Chloroform, 10 µL Isoamylalkohol und 200 µL Glasperlen zugegeben und die Zellen durch kräftiges Vortexen aufgeschlossen. Anschließend werden 200 µL TE-Puffer zugegeben. Dann wird für 5 Minuten zentrifugiert (s.o.) und die obere, wässrige Phase abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Es werden 500 µL Chloroform hinzugefügt, durch Schwenken gemischt und die wässrige Phase erneut in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, wo 1 mL eiskalter Ethanol zugegeben wird. Das Gemisch wird für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert und das entstandene Pellet in 400 µL TE-Puffer gelöst (ggf. bei Wärme inkubieren), zu dem 10 µL 4 M Ammoniumacetat und 1 mL eiskalter Ethanol hinzugefügt werden. Für 1 Minute wird zentrifugiert (15.800 x g) und der Überstand verworfen, das Pellet wird in 1 mL 70 % Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 50 µL 0,1 M TRIS-Puffer resuspendiert.

2.7.1.4 Plasmid-Isolation aus Hefe (*Plasmid-Rescue*)

Zur Überprüfung der Identität von Plasmiden aus Transformanten wurde das *Plasmid-Rescue*-Verfahren angewendet.

5 mL (bei schwach wachsenden Kulturen bis zu 10 mL) Hefekultur wurden für 24 Stunden inkubiert und die Zellen durch Zentrifugation geerntet, gewaschen und in ein 2 mL Eppendorf-Gefäß überführt. Das Pellet wurde in 200 µL Hefe-Lysis-Puffer resuspendiert, anschließend 200 µL Phenol:Chloroform (1:1) hinzugegeben sowie Glasperlen, deren Menge einem Volumen von etwa 200 µL entspricht. Ferner werden 200 µL TE-Puffer zugesetzt. Der Ansatz wird für 5 Minuten kräftig gevortext, die Lagerung der Proben erfolgte anschließend auf Eis. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 15800 x g wurde die obere, wässrige Phase in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt.

Zu dieser Lösung wurde 1 mL eiskalter Ethanol (abs.) zugegeben und der Ansatz für 2 Stunden bei -20°C gelagert, um Nukleinsäuren auszufällen. Eine anschließende 10-minütige Zentrifugation dient dem Pelletieren der Nukleinsäuren; nach dem Zentrifugieren wird der Überstand verworfen und das Pellet an der Luft oder alternativ in der Speed-Vac getrocknet. Das Pellet wurde in 20 µL 0,1 M TRIS resuspendiert. Diese Lösung enthält neben genomischer Hefe-DNA auch Plasmid-DNA, mit der (aufgrund des Umstandes, dass *E. coli*/Hefe-Shuttle-Vektoren verwendet werden) *E. coli* Zellen transformiert werden können. In *E. coli* werden die Plasmide amplifiziert, so dass durch anschließende Minipräp und einen analytischen Restriktionsverdau (bzw. Ansequenzierung) die Identität des Plasmids, das aus der Transformante isoliert worden ist, geschlossen wird.

2.7.1.5 RNA-Präparation aus Hefezellen

Eine Übernachtskultur wird verdünnt und zur Behandlung erneut bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-1 angezogen, wo eine Behandlung erfolgt. Von einer Kultur dieser Dichte werden 10-20 mL benötigt. Die Zellen werden durch Zentrifugation (3 Minuten, 800xg) pelletiert und 2mal mit RNase-freiem

Wasser gewaschen (entweder bidestilliertes Wasser aus Sartorius-Anlage bzw. mit DEPC über Nacht rührend inkubiert und anschließend autoklaviert). Das Pellet wird in ein 1,5 mL Eppendorf-Gefäß überführt. Der Überstand wird entfernt. An dieser Stelle können die Zellen bei -80°C gelagert werden. Das Pellet wird in 400 µL TES-Puffer (2.3.1.5) resuspendiert und anschließend 400 µL Phenol-Chloroform (1:1) zugegeben. Der Ansatz wird für 1 Minute im Abzug gevortext und anschließend für 60 Minuten bei 65°C schüttelnd im Thermomixer inkubiert. Mit diesem Schritt werden die Zellen aufgeschlossen, ohne dass Scherkräfte, wie beim Aufschließen durch Vortexen, die Nukleinsäuren angreifen. Der Ansatz wird für 10 Minuten bei 15.800 x g bei 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, wo erneut mit Phenol-Chloroform (1:1) extrahiert wird. Nach erneuter Zentrifugation wird die obere, wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, wo 200 µL TE-Puffer und 200 µL Chloroform (ohne Phenol!) zugegeben werden. Es wird kurz geschüttelt und zentrifugiert; mit diesem Schritt werden verbliebene Proteine aus der Präparation entfernt. Die RNA wird präzipitiert durch Zugabe von 10 Volumen % (~150 µL) 3 M Natriumacetat und 2,5 Volumen % (~1,5 mL) eiskaltem Ethanol (p.a.). Die Präzipitation erfolgt durch Inkubation für 1 Stunde, besser über Nacht, bei -80°C.

Nach Zentrifugation für 15 Minuten bei 4°C und 15800 x g wird der Überstand abdekantiert, das Pellet mit 80% Ethanol gewaschen und der verbliebene Alkohol durch Trocknung in der SpeedVac entfernt. Das Pellet wird in 50-100 µL TE resuspendiert und die Konzentration und Reinheit entsprechend der Vorschrift von 2.7.1.6 bestimmt.

2.7.1.6 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration- und Reinheit von Nukleinsäuren wurde photometrisch durchgeführt. Dazu wird die optische Dichte bei den Wellenlängen von 260 nm (für DNA/RNA) und 280 nm (für Proteine) bestimmt. Das Verhältnis von OD_{260}/OD_{280} stellt ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäurelösung dar. Dabei ist zu bedenken, dass die Absorption bei 280 nm sowohl vom Salzgehalt als auch vom pH-Wert der Lösung beeinflusst wird (Wilfinger et al., 1997). Eine proteinfreie Lösung zeigt optimalerweise einen OD_{260}/OD_{280} Koeffizienten von 1,8 bis 2.

Zur Konzentrationsbestimmung wird die folgende Formel verwendet:

$$c \left(\frac{\mu g}{ml} \right) = OD_{260} \cdot V \cdot F$$

wobei V als Verdünnungsfaktor der gemessenen Lösung und F als spezifischer Multiplikationsfaktor (50 für dsDNA, 40 für RNA und 30 für einzelsträngige DNA) verwendet wird.

2.7.1.7 DNase Verdau

Für die Synthese von cDNA ist eine Beseitigung von gDNA-Resten erforderlich. Dazu wurden 15 µg der gewonnenen RNA nach folgendem Schema behandelt:

x µL	15 µg RNA
5 µL	DNase Puffer (Fermentas)

1 μL	DNase (Fermentas)
Ad 50 μL	Bidest. H_2O

Der Ansatz wird für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die DNase durch 15-minütige Inkubation bei 72°C inaktiviert.

2.7.1.8 Gel-Elution

Gelstücke wurden im UV-Licht so sparsam als möglich ausgeschnitten und in 1,5 mL Reaktionsgefäße gegeben. Die Elution der DNA erfolgte mit dem OmniPure Kit (s. Materialien).

2.7.2 Reverse Transkription

Für die Synthese der cDNA aus RNA wurde 1 μg RNA eingesetzt und der folgende Ansatz in ein 200 μL PCR-Gefäß pipettiert:

x μL	1 μg RNA
1 μL	Oligo-dT (0,5 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$)
1 μL	10 mM dNTP-Mischung
Ad 14,5 μL	Bidest. H_2O (RNase-frei)

Dieser Ansatz wird für 5 Minuten zur Denaturierung von RNA-Sekundärstrukturen in einem Thermocycler bei 65°C inkubiert und anschließend bei 4°C gelagert.

Zu jedem Ansatz werden 6 μL des folgenden Mastermixes zugegeben, so dass das endgültige Reaktionsvolumen 20 μL beträgt. Die Komponenten stammen aus dem RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit von Fermentas.

4 μL	RT-Puffer (Fermentas)
1 μL	RNase Inhibitor
0,5 μL	RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase

Die Ansätze werden für eine Stunde bei 50°C in einem Thermocycler inkubiert, anschließend wird die Reaktion durch Inkubation bei 70°C beendet. Die Lagerung der erhaltenen cDNA erfolgt bei -20°C.

2.7.3 Modifikation und Amplifikation von DNA

2.7.3.1 Restriktion

Typischerweise werden Restriktionsverdau in dieser Arbeit im Maßstab von 20 μL durchgeführt, wobei der Restriktionsansatz wie folgt zusammengesetzt war:

3 µL	Plasmid DNA (Volumen kann bei sehr niedrig konzentrierten Lösungen erhöht werden)
2 µL	10-fach Restriktionspuffer
0,5 µL	Enzym I
0,5 µL	Enzym II (wird nur mit einem Enzym verdaut, werden diese 0,5 µL durch Wasser ersetzt.)
14 µL	H ₂ O (bidest)

In dieser Arbeit wurden hauptsächlich Fast-Digest Restriktionsenzyme der Firma Thermo Scientific (vormals Fermentas) verwendet. Eine Inkubation des Restriktionsansatzes erfolgte in diesem Fall für 20-30 Minuten bei 37°C. Wurden andere Restriktionsenzyme verwendet (z.B. nicht Fast-Digest Enzyme von Thermo Scientific oder New-England Biolabs), verlängerte sich die Inkubationsdauer auf 60 Minuten bei 37°C. Entsprechende Puffer werden gemäß den Angaben des jeweiligen Herstellers verwendet.

2.7.3.2 Ligation

Um zwei DNA-Fragmente miteinander zu verbinden (ligieren), wurde die T4-Ligase der Firma Fermentas verwendet. Folgender Ansatz wurde zusammenpipettiert und entweder für eine Stunde bei Raumtemperatur, bevorzugt aber über Nacht bei 4°C inkubiert. Es wurden Vektor und Insert im Verhältnis 3:1 eingesetzt.

2 µL	10x T4 Ligase-Puffer.
0,5 µL	T4-DNA Ligase
1 µL	Vektor
X µL	Insert (Volumen ist so zu wählen, dass die Konzentration des Inserts die des Vektors 3x überragt)
Ad 20 µL	Bidest. Wasser

Um zu überprüfen, wie groß die Rate an Selbstligation ist, wurde ein entsprechender Kontrollansatz ohne Zugabe des Inserts ligiert (Kontroll-Ligation). Anstelle des Volumens des Inserts wird Wasser eingesetzt.

Nach Abschluss der Ligation wurden Produkte in *E. coli* transformiert (vgl. 2.8.3.1).

2.7.4 Amplifikation von DNA-Fragmenten

2.7.4.1 PCR zur Amplifikation von Klonierungsfragmenten

a) Polymerase-Kettenreaktion mit genomischer DNA als Template

Um DNA-Fragmente zu amplifizieren, deren Template genomische DNA darstellt, wurden Ansätze in folgender Weise zusammenpipettiert:

10 µL	Dream-Taq Mastermix (2x) (Fermentas)
1 µL	Oligo I
1 µL	Oligo II
1 µL	Genomische DNA
7 µL	Bidest. Wasser

Es wurde stets eine Kontrollreaktion durchgeführt, bei der die genomische DNA durch Wasser ersetzt wurde und somit kein Template aufweist („*non-template control*“, NTC).

Das PCR-Programm, das mit diesem Ansatz durchgeführt wurde, stellt sich wie folgt dar:

Schritt 1	5 Minuten	94°C	„Initiales Schmelzen“
Schritt 2	1 Minute	94°C	Schmelzschrift
Schritt 3	30 Sekunden	52°C (oder entsprechend der Annealingtemperatur der Oligonukleotide)	Anlagerungs- = Annealingschritt
Schritt 4	1 Minute pro kb	72°C	Polymerisationsschritt
Schritt 5		⇒ Zurück zu Schritt 2, für 30-35 Zyklen	
Schritt 6	10 Minuten	72°C	
Schritt 7	∞	10°C	

b) Kolonie-PCR von *E. coli* bzw. Hefe

Anstelle genomischer, aufgereinigter DNA wurde für Überprüfungen (beispielsweise auf erfolgreiche Transformation oder das Vorhandensein einer KanMX4-Kassette in Hefe die Methode der Kolonie-PCR angewendet. Dazu wurde mit einer Pipettenspitze eine einzelne Kolonie von einer Agar-Platte abgenommen und in 100 µL 0,1 N NaOH resuspendiert. Durch Erhitzen für 5 Minuten auf 95°C werden die Zellen aufgeschlossen und die freigesetzte DNA (sowohl Plasmid- wie genomische DNA) kann als Template in eine PCR-Reaktion eingesetzt werden.

Pipettierschema und Abfolge des PCR-Programms entsprechen den Angaben unter a).

c) Hot-Start PCR

Für PCR-Reaktionen, deren Produkte anschließend für eine Klonierung eingesetzt werden sollten, wurde eine Polymerase mit Proof-Reading Funktion (3'-5' Exonuklease-Aktivität) verwendet (KOD-Hotstart DNA Polymerase-Kit, Novagen).

Folgender Ansatz wurde in der angegebenen Reihenfolge entsprechend der Vorgabe des Herstellers zusammenpipettiert:

10 µL	13 µL Bidest. Wasser
1,2 µL	MgSO ₄ (25 mM)
2 µL	Puffer
2 µL	dTNP-Mix (jeweils 0,2 mM)
0,6 µL	Oligo I
0,6 µL	Oligo II
0,5 µL	Template DNA
0,3 µL	KOD Hotstart DNA-Polymerase

Das PCR-Programm wurde entsprechend den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

Schritt 1	5 Minuten	94°C	„Initiales Schmelzen“
Schritt 2	1 Minute	94°C	Schmelzschrift
Schritt 3	30 Sekunden	52°C (oder entsprechend der Annealingtemperatur der Oligonukleotide)	Anlagerungs- = Annealingschritt
Schritt 4	1 Minute pro kb	72°C	Polymerisationsschritt
Schritt 5		⇒ Zurück zu Schritt 2, für 30-35 Zyklen	
Schritt 6	10 Minuten	72°C	
Schritt 7	∞	10°C	

2.7.4.2 Quantitative PCR

Zur Feststellung von Gentranskriptionslevels von Genen wurde die Methode der quantitativen PCR angewandt und hinsichtlich der Bindungsspezifität durch eine Primer-Blast Suche überprüft (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Oligonukleotide wurden unter Verwendung des Computerprogramms Primer3 entworfen. Quantitative PCR wurde im Maßstab von 10 µL durchgeführt. Es wurde ein PCR-Primer Mix angesetzt, indem je 10 µL vom 100 µM des forward- und reverse Primers mit 80 µL bidestilliertem Wasser versetzt werden.

In einer 96-well Platte wurde folgender Mix zusammenpipettiert:

5 µL	SybrGreen Mix
0,3 µL	Primer-Mix
2,7 µL	Bidest. H ₂ O
2 µL	cDNA (1:5 verdünnt)

Das PCR Programm sah wie folgt aus:

Schritt 1	2 Minuten	50 °C	
Schritt 2	10 Minuten	95°C	„Initiales Schmelzen“
Schritt 3	15 Sekunden	95°C	Schmelzschrift
Schritt 4	1 Minute	60°C	Kombinierter Annealing- und Synthese Schritt
Schritt 5			40 x zurück zu Schritt 3
Schritt 6	15 Sekunden	95°C	Schmelzschrift
Schritt 7	1 Minute	60°C	Kombinierter Annealing- und Synthese Schritt

Eine Normalisierung erfolgte bei Hefe gegen die Gene YBR044c (*TCM62*) und YDR291W (*HRQ1*).

Die Umrechnung auf eine vom Referenzgen abhängige Expression erfolgte unter Verwendung des *ct*-Wertes (der den Anfang der exponentiellen Amplifikation beschreibt), wobei die Formel

$$Rel. Expression = 2^{-\Delta ct}$$

Wobei

$$\Delta ct = ct_{\text{untersuchtes Gen}} - ct_{\text{Referenzgen}}$$

2.7.5 Auftrennung von Nukleinsäuren

2.7.5.1 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte mittels Agarose-Gelen. Dazu wurden 1,5 % (w/v) Agarose in 1xTAE Puffer in einem Erlenmeyerkolben in der Mikrowelle geschmolzen. Das Gewicht des Kolbens wurde vor und nach dem Schmelzen auf der Waage ermittelt und die durch Verdunstung bedingte Differenz mit destilliertem Wasser ausgeglichen.

Anschließend wurden nach Abkühlen pro 100 mL Gel 8 µL Ethidiumbromidlösung (1% (w/v)) zugegeben, das Gel in den Träger gegossen und nach dem Erstarren in 1xTAE Puffer laufen gelassen.

2.7.5.2 Denaturierende gelelektrophoretische Auftrennung von RNA

Agarose (0,75 g) wird in 42 mL RNase-freiem Wasser in der Mikrowelle geschmolzen und bis auf ca. 60°C abgekühlt. Anschließend werden 5 mL 10x MOPS-Puffer und im Abzug 3 mL 37%ige Formaldehydlösung sowie 5 µL Ethidiumbromid zugegeben.

10 µL der Proben werden mit 40 µL RNA-Probenpuffer versetzt und für 10 Minuten bei 65°C inkubiert und danach unmittelbar auf Eis abgekühlt. Anschließend werden 10 µL Ladepuffer zugegeben. Die Proben werden in das Gel geladen und die Elektrophorese des Gels in 1x MOPS Puffer durchgeführt.

2.7.5.3 Sequenzierung

Sequenzierungsreaktionen wurden durch das Fraunhofer Institut IME in Aachen durchgeführt.

2.8 Mikrobiologische Methoden

2.8.1 Kultivierung

2.8.1.1 *Escherichia coli*

a) Plattenkultur

E. coli wird auf LB-Medium-Agarplatten (siehe 2.3.3.1) bei 37°C kultiviert. Im Falle, dass Transformanten kultiviert werden, werden Antibiotika in der entsprechenden Konzentration zugegeben.

b) Flüssigkultur

Flüssigkulturen werden in sterilen Erlenmeyerkolben angesetzt. Um eine optimale Belüftung zu gewährleisten, wird maximal 1/5 des Kolbenvolumens mit Medium gefüllt (Beispiel: In einen 250 mL Erlenmeyerkolben werden maximal 50 mL Medium gegeben). Als Kulturmedium wird auch hier LB-Medium verwendet; die Inkubation erfolgt bei 37°C und 210 rpm.

Für die Minipräparation werden 2 mL LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum in ein Kulturröhrchen gegeben, mit einem sterilen Zahnstocher oder einer Pipettenspitze eine Kolonie von der Platte abgenommen und unter den oben angegebenen Bedingungen über Nacht kultiviert.

2.8.1.2 *Saccharomyces cerevisiae*

- a) *S. cerevisiae* wird entweder auf SD- bzw. YPD Platten bei 28°C kultiviert. SD-Medium wird verwendet, wenn es sich um Transformanten handelt, die ein Plasmid tragen, das einen Auxotrophiemarker (z. B. *URA3*) aufweist.

Zur Selektion von Deletionsmutanten, die durch homologe Rekombination eine KanMX4 Kasette in ihrem Genom tragen, kann dem Medium G-418 (siehe b) zugegeben werden.

- b) Auch die Kultivierung von Hefe erfolgt in Erlenmeyerkolben, deren Volumen maximal zu 1/5 mit Medium ausgefüllt wird. Es wird entweder flüssiges YPD- oder SD Medium verwendet. Die Kultivierung erfolgt bei 28°C und 210 rpm.

Für kleinere benötigte Kulturvolumina wird Hefe in 2 mL Medium in Kulturröhrchen gegeben und entsprechend den oben angegebenen Bedingungen kultiviert.

2.8.2 Dauerkulturen und Glycerolstocks

- a) Schrägagar

In Reaktionsgefäße mit Schraubdeckel wird 1 mL heißes Kultivierungsmedium gegeben und die Reaktionsgefäße so platziert, dass der Agar schräg erstarrt, um eine möglichst große Oberfläche zu gewährleisten. Darauf werden die Mikroorganismen ausgestrichen und über Nacht bei der dem Organismus entsprechenden Temperatur kultiviert. Die Lagerung von Schrägagarkulturen erfolgt im Kühlschrank bei 4°C.

- b) Glycerolstocks

Eine Übernachtskultur von Hefe oder *E. coli* wird 1:1 mit sterilem 80%igem Glycerol durch Vortexen in einem Schraubdeckel-Reaktionsgefäß (1,5 mL) gemischt. Die Kultur wird in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

2.8.3 Transformationsmethoden

2.8.3.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen (DH5α) mittels Rubidiumchlorid

Eine Übernachtskultur von *E. coli* DH5α wird auf eine optische Dichte von 0,1 mit temperiertem LB-Medium verdünnt und bis zu einer $OD_{600} \sim 0,5$ kultiviert. Anschließend wird die Kultur auf vorgekühlte 50 mL Falcons verteilt und durch Inkubation auf Eis abgekühlt. Anschließend erfolgt eine 10-minütige Zentrifugation bei 4°C und 1559xg (Megafuge 1 OR). Der Überstand wird verworfen und jedes Pellet pro 50 mL Kultur in eiskalten 7,5 mL TFBII resuspendiert. Nach weiterer 10-minütiger Inkubation auf Eis und Zentrifugation (s.o.) wird der Überstand verworfen und das Pellet in 1 mL TFBII-Lösung resuspendiert. Die Kultur wird zu je 100 µL aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

2.8.3.2 Transformation von *E. coli* mittels Hitzeschock

Die bei -80°C gelagerten chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen werden auf Eis aufgetaut, anschließend werden 2 µL Plasmid-DNA zugegeben und durch Invertieren vermischt. Der Ansatz wird 30 Minuten auf Eis inkubiert, bevor der Hitzeschock für 90 Sekunden bei 42°C erfolgt (im Wasserbad oder Heizrührer). Die Zellen werden sofort auf Eis abgekühlt und mit 1 mL LB-Medium versetzt; bei Raumtemperatur erfolgt auf einem drehenden Rad die Regeneration der Zellen. Anschließend werden je 10 bzw. 100 µL auf LB-Agarplatten, die das entsprechende Antibiotikum enthielten, ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert.

2.8.3.3 Transformation von *S. cerevisiae* mittels Elektroporation

Hefezellen wurden in 50 ml flüssigem YPD-Medium über Nacht schüttelnd kultiviert. Die Kultur wurde am nächsten Morgen bei 4°C 5 Minuten bei 800x g (Megafuge 10R) und zweimal mit sterilem Bidest-Wasser zum Waschen resuspendiert und erneut pelletiert. Die Hefezellen wurden anschließend in 500 µL einer 1 M Sorbitol-Lösung resuspendiert und in ein 2 mL-Eppendorfgefäß überführt.

Pro Ansatz wurden 50 µL der in Sorbitol aufgenommenen Kultur in Elektroporationsküvetten (0,2 cm Durchmesser) mit <5µL Plasmid-DNA gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte bei 1,5 kV für 5 ms mit vier Elektroporationsstößen. Anschließend wurde sofort 500 µL eiskalte Sorbitollösung (1 M) zugegeben, die Küvetten für ca. 10 Minuten auf Eis inkubiert (die Kälte verlangsamt das Schließen der durch die Elektroporation entstandenen Poren, so dass durch diesen Schritt die Wahrscheinlichkeit steigt, dass Plasmid-DNA in die Zelle aufgenommen wird). Anschließend wurden die Ansätze auf entsprechende Selektionsplatten (je ca. 100 µL des Ansatzes) ausgestrichen und in feuchter Umgebung bei 28°C für ca. 3-5 Tage bis zum Auftreten von Kolonien inkubiert.

2.8.4 Bestimmung von Suszeptibilität gegenüber Substanzen im Hemmhoftest

2.8.4.1 *E. coli*

Zur zusätzlichen Überprüfung der Allicinkonzentration in Knoblauchsaff (neben der Bestimmung mittels HPLC) wurde ein Bioassay verwendet, dessen Prinzip darauf beruht, dass der Durchmesser eines Hemmhofes proportional zur Allicinkonzentration in Knoblauchsaff ist.

Eine Übernacktkultur des K12 Stammes von *E. coli* (in LB-Medium) wird mit temperiertem LB-Medium auf eine OD₆₀₀=0,05 verdünnt und bei 37°C und 220 rpm bis zu einer OD₆₀₀=0,2 weiter inkubiert. LB-Agar wird in der Mikrowelle geschmolzen und abgekühlt, bis er etwa handwarm ist. 10 mL LB-Agar werden mit einem sterilen Falcon abgemessen und 50 µL der *E. coli* Kultur zugegeben und der Agar in eine Petrischale (Ø 9 cm) gegossen. Nach dem Erstarren wurden mit einem hitzesterilisierten Korkbohrer (Innendurchmesser 7 mm) pro Platte 3 Löcher gestanzt, nach der Entfernung der innenliegenden Agarstücke mit einer sterilen Impföse wurden in die Löcher je 25 µL Knoblauchsaff gegeben. Die Platten wurden über Nacht (16 Stunden) bei 37°C inkubiert und am

nächsten Tag der Durchmesser der Hemmhöfe bestimmt. Anhand einer Geradengleichung, die den Zusammenhang von Allicinkonzentration und Hemmhofdurchmesser beschreibt (entsprechend (Portz, 2008)), wurde auf die Allicinkonzentration im Knoblauchsft geschlossen und die Resultate mit den Quantifizierungsergebnissen der HPLC verglichen.

2.8.4.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Aufgrund des Befundes, dass Glutathion für die Resistenz von Hefezellen gegenüber Allicin bedeutsam ist und Hefezellen Glutathion aus dem Medium aufnehmen können, so dass bei glutathionhaltigen Kulturmedien eine erhöhte intrazelluläre Glutathionkonzentration zu erwarten ist im Vergleich zu glutathionfreien Medien, wurde für den Hemmhofstest CSM-Medium bevorzugt.

Eine Übernachtskultur von Hefezellen (in CSM-Medium) wurde auf eine OD=1 verdünnt. CSM Agar wurde in der Mikrowelle geschmolzen und abgekühlt, bis das Medium handwarm war, aber noch nicht zu erstarren begann. Je 10 mL wurden in einem sterilen Falcon abgemessen, 75 µL der Hefekultur zugegeben, etwas durchmischt und die Mischung in eine Petrischale (Ø 9 cm) eingefüllt. Nach dem Erstarren des Agars wurden mit einem Korkbohrer (Innendurchmesser 7 mm) vier Löcher ausgestanzt, in die 20 µL Testsubstanz gegeben wurden. Die Platten wurden anschließend bei 28°C kultiviert. Die in dieser Arbeit gezeigten Hemmhofstests wurden, wenn nicht anders vermerkt, nach 16 h ausgewertet, indem der Durchmesser des Hemmhofes gemessen wurde und davon ausgehend wurde die Fläche des Hemmhofes berechnet und anschließend die Fläche des Loches abgezogen, in das die Testlösung gegeben wurde.

2.8.5 Bestimmung von Überlebensraten im „Droptest“

Eine Übernachtskultur von Hefezellen in CSM-Medium wurde mit temperiertem Medium auf eine OD₆₀₀=1 verdünnt. Je 2 mL wurden in ein steriles Kulturröhrchen gefüllt, mit Allicin oder H₂O₂ in verschiedenen Konzentrationen behandelt und für 16 Stunden bei 28°C und 210 rpm weiter kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in Schritten von 1:10² verdünnt (1:100, 1:10.000; 1:1.000.000) und jeweils 10 µL auf YPD Platten ausplattiert. Nach 24-48 Stunden (abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit des jeweiligen Stammes) wurde die Anzahl Kolonie formender Einheiten (cfu = colony forming units) der jeweiligen Behandlung (zumeist anhand der 1:1.000.000-Verdünnung) bestimmt und das Resultat fotografisch dokumentiert.

Der prozentuale Anteil der überlebenden Zellen wurde bestimmt, indem die cfu Zahl der jeweiligen Behandlungen durch die cfu Zahl der unbehandelten Kontrolle (die gleich 100 % gesetzt wurde) geteilt wurde, entsprechend der folgenden Formel:

$$\% \text{ überlebende Zellen} = \frac{cfu \text{ (Behandlung)}}{cfu \text{ (unbehandelte Kontrolle)}} \cdot 100$$

2.8.6 Kinetik der Proliferation von Hefe

Übernachtskulturen von Hefe wurden mit temperiertem Medium auf eine $OD_{600} = 0,1$ verdünnt. Die Verdünnungen der Testsubstanzen erfolgten in Kulturmedium. Je 50 μL Testsubstanz wurden mit 50 μL Hefekultur in einer 96-well Platte versetzt. Als Blank-wert für die Messung dienen 100 μL Kultur. Pro Behandlung erfolgt die Messung im Triplikat. Die 96-well Platte wird unter Schütteln kultiviert (210 rpm bei 28°C) und in Abständen von 30 Minuten wird im Plate-reader bei 630 nm die optische Dichte der jeweiligen Kulturen ermittelt. Die Messung erfolgt über 12 Stunden. Anschließend wird die Zunahme der optischen Dichte gegen die Zeit grafisch aufgetragen.

2.9 Methoden an Säugetierzellkulturen

2.9.1 Kultivierung

Die verschiedenen Zell-Linien wurden bei 37°C und 5 % CO_2 in Kulturflaschen kultiviert. Die Zellen wurden in einem 3-4 tägigen Rhythmus gesplittet und im Verhältnis 1:10 übertragen.

2.9.2 Zellzahlbestimmung und Vitalitätstest

Zur Überprüfung der Zellzahl und zugleich Bestimmung der Anzahl lebender Zellen wurde 1 mL mit 0,4 % wässriger Trypan-Blau Lösung gemischt und 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 10 μL in eine Neubauer-Kammer gegeben und die Zellzahl bestimmt sowie der Anteil toter Zellen, der sich durch Blaufärbung der Zellen ergibt. Die Durchführung der Versuche erfolgte am Institute Immunologie, Hôpital Cochin, Université Rene Descartes (Paris V).

2.9.3 Messung des Glutathionstatus mittels Monobromobiman

Zellen entsprechender Zellzahl (siehe 2.9.1) wurden mit Allicin für 24 h koinkubiert und anschließend abzentrifugiert (300 x g) und mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 15 Minuten bei 37°C in 50 mM Monobromobimanlösung (in PBS, siehe 2.3.1.6.) inkubiert, zentrifugiert (300xg) und in PBS gewaschen. Die Fluoreszenz wurde quantifiziert bei einer Excitationswellenlänge von 380 nm und Emissionswellenlänge von 485 nm. Die Durchführung der Versuche erfolgte am Institute Immunologie, Hôpital Cochin, Université Rene Descartes (Paris V).

2.9.4 Testung auf Akkumulation Reaktiver Spezies mittels DCFDA

Zellen entsprechender Zellzahl (siehe 2.9.1) wurden mit Allicin für 24 h koinkubiert und anschließend abzentrifugiert (300 x g) und einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden für 1 Stunde in DCFDA-Lösung (200 μM in DMSO; Molecular Probes, Leiden, Niederlande) inkubiert. Fluoreszenz wurde quantifiziert bei einer Excitationswellenlänge von 490 und 535 nm Emission im Fluoreszenz-Platereader (VICTOR 2; PerkinElmer, Paris, Frankreich).

2.9.5 MTT-Assay

Der MTT Assay wurde durchgeführt im Institut für Immunologie, Université Paris V, entsprechend der publizierten Vorschrift (Alexandre et al., 2006b). Dazu wurden 100 μL Zellen (Bei den Zell-Linien 3T3 und HUVEC wurden pro well 1×10^4 Zellen, bei den übrigen Zelllinien [A549, MCF7, HT29] 2×10^4 Zellen) RPMI-Medium in 96-well Platten pipettiert und mit 100 μL Knoblauchsaff bzw. synthetischem Allicin für 24 h weiter inkubiert. Anschließend wurde in jedes well 50 μL MTT-Lösung (Methylthiazoltetrazolium; 2 mg mL^{-1} in PBS) gegeben und für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 100 μL DMSO wurde das durch Reduktion entstandene Formazan in Lösung gebracht und bei einer Absorption von 550 nm im Mikro-Platereader gemessen (VICTOR 2; PerkinElmer, Paris, Frankreich).

2.9.6 Quantifizierung der Zellproliferation mittels ^3H -Thymidin

Zellen wurden für 24 Stunden mit Allicin behandelt und anschließend mit ^3H Thymidin ($1 \mu\text{Ci/ml}$) für 24 Stunden versetzt, bevor die Zellen geerntet, 2-mal gewaschen (in $1 \times \text{PBS}$) und die Inkorporation mit Scintillation quantifiziert wurde. Die Durchführung der Versuche erfolgte am Institute Immunologie, Hôpital Cochin, Université Rene Descartes (Paris V).

2.9.7 YO-PRO1 zur Quantifizierung apoptotischer Zellen

Zellen wurden in 96-well Platten verteilt (Zellzahl siehe MTT-Assay), mit Allicin behandelt und für 30 bzw. 60 Minuten inkubiert und anschließend mit $1 \mu\text{M}$ YOPRO-1 (Molecular Probes) Reagenz (in $1 \times \text{PBS}$) versetzt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Fluoreszenz des YOPRO-1 Farbstoffes als Maß für die Anzahl apoptotischer Zellen wurde ermittelt bei einer Excitationswellenlänge von 490 nm und einer Emissionswellenlänge von 510 nm (Alexandre et al., 2006a): Die Durchführung der Versuche erfolgte am Institute Immunologie, Hôpital Cochin, Université Rene Descartes (Paris V).

2.10 Pflanzenmethoden

2.10.1 Kultivierung und Propagierung auf Erde

Zur Kultivierung auf *Arabidopsis thaliana* auf Erde (VM; Stender AG; Schermbeck) wurden Samen auf feuchte Erde ausgebracht und für 3 Tage bei 10°C stratifiziert. Anschließend wurden die Pflanzen unter Kurztagbedingungen in einer Klimakammer unter definierten Bedingungen kultiviert (22°C , 8,5 h hell, 15,5 h dunkel, $105 \mu\text{mol s}^{-1} \text{ m}^{-2}$). Zur Nachzucht wurden Pflanzen, die Rosetten ausgebildet hatten, in Langtagbedingungen überführt (22°C , 16 h hell, 8 h dunkel). Ab dem Zeitpunkt der Samenausbreitung werden die Pflanzen nicht mehr gegossen. Sobald die Pflanzen trocken sind, werden die Samen geerntet.

2.10.2 Kultivierung auf Petrischalen

Arabidopsis Samen wurden oberflächensterilisiert durch Inkubation für 10 Minuten in 70% Ethanol. Anschließend wurde der Ethanol abgenommen und durch 100 % Ethanol substituiert und unter sterilen Bedingungen auf ein Filterpapier zur Trocknung ausgebracht.

Die Samen wurde auf Petrischalen ausgestreut, die 25 mL Hoagland-Medium (mit 1,5 % Plant-Agar) enthielten. Anschließend wurden die Platten mit Textilband verschlossen und für zwei Tage zum Stratifizieren im Kühlraum gelagert. Anschließend wurden die Platten stehend in einem Lichtschrank bei Kurztagbedingungen (s.o.) kultiviert.

2.10.3 Kultivierung auf Filterpapier

Zum Screening wurden Arabidopsis-Samen mit Ethanol oberflächensterilisiert (s.o.) und auf ein Filterpapier ($\varnothing$ 7 cm) ausgebracht, das auf 25 mL Hoaglandagar in eine Petrischale gelegt wurde. Das Filterpapier nimmt Medium bis zur Feuchte auf. Die Schalen werden mit Gewebekband verschlossen und für 2 Tage stratifiziert.

Weil in Floating-Leaf Assay Experimenten (siehe 2.6.8) gezeigt wurde, dass das Ausbleichen als Toxizitätssymptom des Allicins abhängig ist von der Lichtperiode – in Dauerlicht war das Ausbleichen stärker als im Dunkel- war ein genaues Konstanthalten der Lichtperiode nötig. Aus diesem Grunde wurden die Pflanzen unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkelheit, 22°C) für das Screening kultiviert. Nach der Stratifikation erfolgte eine Kultivierung für 2 Tage unter o.g. Bedingungen.

2.10.4 Bestimmung der Wurzellängen

Zur Bestimmung von Wurzellängen nach Allicinbehandlung wurden oberflächensterilisierte Samen auf Filterpapier kultiviert entsprechend Kap. 2.10.3. Nach 48 Stunden unter Langtagbedingungen wurde unter das Filterpapier, auf dem die Samen liegen, ein Filterpapier, das mit 700 μ L Knoblauchsafte bzw. chemisch synthetisiertem Allicin (12,4 mM) getränkt ist, gelegt. Die Platten werden wieder mit Gewebekband verschlossen. Nach 0, 24, 48 und 72 Stunden werden die Platten fotografisch dokumentiert, wobei in jeder Fotografie eine Größenskala (ein Stück Millimeterpapier) enthalten ist.

Die Auswertung der Wurzellängen erfolgte unter Zuhilfenahme des Computerprogramms ImageJ, wobei die Wurzel nachgezeichnet wurde und die in Pixel angegebenen Längen mittels der in der Fotografie mitefassen Größenskala in mm umgerechnet wurden.

Es wurden Wurzellängen von je mindestens 10 Keimlingen pro Genotyp und Behandlung gemessen.

2.10.5 Floating-Leaf Assay

Der Floating-Leaf Assay wurde durchgeführt in Abwandlung von (Fuhrer, 1982). Ausgewachsene Blätter (d.h. von ca. 5 Wochen alten Pflanzen) aus der Blattrosette von Arabidopsis-Pflanzen, die unter Kurztagbedingungen auf Erde angezogen worden sind (siehe 2.10.1), werden abgetrennt und mit einem Korkbohrer (Innendurchmesser 7 mm) Blattstücke ausgestochen. In Petrischalen ($\varnothing$ 6 cm)

wurde Allicin-lösung in unterschiedlichen Konzentrationen (0,25 mM; 0,5 mM; 2,5 mM; 5 mM, verdünnt mit flüssigem Hoaglandmedium) gegeben. Je 10 Blattscheiben wurden mit der adaxialen Seite nach oben auf die Flüssigkeit gegeben, so dass sie auf der Allicin-lösung schwimmen. Die Petrischalen wurden mit Gewebeband verschlossen und in kontinuierlichem Licht bei 22°C (bzw. im Dunkeln) inkubiert.

2.10.6 Chlorophyll-Messung

Das Ausbleichen der Blattscheiben im Floating-Leaf Assay ist auf die Abnahme von Chlorophyll im Blattgewebe zurückzuführen. Um daher ein quantitatives Maß für das Ausbleichen zu haben, wurde der Gehalt an Chlorophyll A in den Blattscheiben bestimmt. Dazu werden die Blattscheiben, die im Floating-Leaf Assay eingesetzt wurden, mit PBS gewaschen, in ein Eppendorfgefäß überführt und 1 mL 96 % Ethanol zugegeben. Mit einem Mikropistill wurde das Blattmaterial zerkleinert. Sobald das gesamte Chlorophyll in Lösung war, wurden die Ansätze für 5 Minuten bei 13800x g zentrifugiert, um feste Bestandteile abzuscheiden. Die Absorption des Überstands wurde in einem Photometer bei 645 und 663 nm gemessen.

Die Absorptionswerte wurden genutzt, um die Menge an Chlorophyll A unter Zuhilfenahme der folgenden Formel zu berechnen:

$$c(\text{Chlorophyll A}) \frac{\text{mg}}{\text{mL}} = 12,7 \cdot A_{663} - 2,69 \cdot A_{645}$$

2.11 Physiologische und biochemische Methoden

2.11.1 Quantifizierung von Glutathion mittels Glutathion-Reductase-Bioassay

Zum Prinzip

Die Messung von reduziertem und oxidiertem Glutathion erfolgte in Anlehnung an die von Griffith beschriebene Methode (Griffith, 1980). Die Methode basiert auf dem Umstand, dass das weitgehend farblose 5,5-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB, Ellman's Reagenz) durch Reaktion mit Thiolen in einer Thiol-Disulfid-Austauschreaktion reduziert wird und dabei in das gelb-gefärbte Monomer TNB (2-Thio-5-nitrobenzoat) überführt wird. Diese Substanz weist ein Absorptionsmaximum bei 412 nm auf. Reduziertes Glutathion führt so zu einer Farbzunahme, die photometrisch gemessen werden kann; die Reaktion führt zugleich zu einer Oxidation des GSH zu GSSG.

Durch die NADPH-abhängige Aktivität der Glutathionreduktase (GR) wird das GSSG wieder in GSH reduziert; weil die Kinetik dieser enzymabhängigen Reaktion substratabhängig ist, d.h. die Reaktionsgeschwindigkeit direkt proportional zur Substratkonzentration ist, kann über die Zunahme der Absorption mit der Zeit ein Rückschluss auf die Substratkonzentration des Enzyms (= GSSG) gezogen werden. Wird dieser Assay mit bekannten Konzentrationen an reinem GSH kalibriert, kann

mit diesem Assay eine Quantifizierung des Glutathions erfolgen. Im ersten Schritt wird Gesamt-Zell-Lysat eingesetzt, das eine Mischung aus GSH und GSSG enthält. In diesem Schritt wird die Gesamtmenge an Glutathion bestimmt, also die Summe von GSH+GSSG (*cave*: 1 Mol GSSG ergibt durch die Reduktion des Dimers zu zwei Monomeren 2 Mol GSH). Indem das reduzierte Glutathion durch Reaktion mit 2-Vinylpyridin quantitativ entfernt wird, wird die Reaktion erneut in analoger Weise durchgeführt, wobei nur selektiv GSSG gemessen wird. Durch Subtraktion der GSSG Menge vom Gesamtglutathion wird die Konzentration an GSH ermittelt.

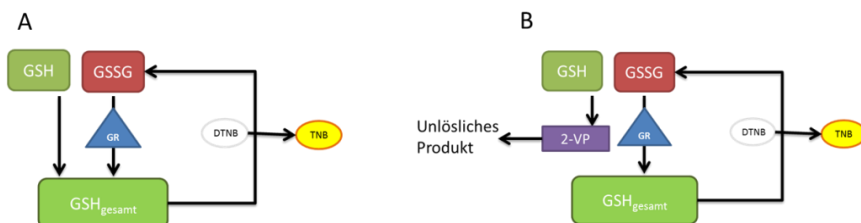


Abbildung 17: Prinzip der Glutathionquantifizierung mit Hilfe des GR-Assays

In einem ersten Schritt (A) wird die Gesamtmenge an Glutathion bestimmt, indem das Zell-Lysat in den Test eingesetzt wird. Dabei wird sowohl das in der Zelle vorhandene GSH wie auch GSSG gemessen. In einem zweiten Ansatz (B) erfolgt vor der Durchführung des Assays die Behandlung mit 2-VP, die dazu führt, dass reduziertes Glutathion abreagiert und für den nachfolgenden GR-Assay nicht mehr zur Verfügung steht. Das bedeutet, dass in diesem Versuchsdurchlauf ausschließlich GSSG gemessen wird. Durch Subtraktion der GSSG Konzentration (in seinen monomeren Äquivalenten) von der Gesamt-Glutathion Konzentration ergibt die Konzentration an GSH.

Versuchsdurchführung

Die Durchführung der Versuche erfolgte in Anlehnung an (Portz, 2008).

a. Kultur der Zellen und Behandlung

Hefezellen des Stammes RS453 wurden in YPD über Nacht angezogen und morgens auf $OD_{600} = 0,1$ mit Medium verdünnt und erneut bis zu einer $OD_{600} = 0,4$ kultiviert. Es erfolgte eine Behandlung mit synthetischem Allicin zu einer finalen Allicin-Konzentration von $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ bzw. $200 \mu\text{g mL}^{-1}$. Sofort nach einem groben Mischen wurden je 50 mL-Aliquots geerntet. Es erfolgte jeweils eine Behandlung parallel zu einer unbehandelten Kontrolle.

b. Zellernte und –Aufschluss

Die Zellernte von 50 mL-Aliquots erfolgte durch Zentrifugation bei $4332 \times g$ (Megafuge 1 OR). Die Pellets wurden 2 x mit Natriumphosphat-Puffer, pH=7,5, gewaschen und zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in 1 mL des Natriumphosphatpuffers aufgenommen und in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt, erneut zentrifugiert und das Volumen, das das Zellpellet einnimmt, markiert. Das Pellet wurde erneut in Phosphatpuffer resuspendiert, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und Glaskügelchen zugegeben und durch 3x1 Minute vortexen aufgeschlossen; zwischen den Vortexschritten wurden die Proben für je 2 Minuten auf Eis gekühlt. Währenddessen wird durch Zugabe von Wasser in das vormals genutzte Eppendorf-Gefäß das Volumen des Zellpellet bestimmt („Packed-Cell-volume“), das für die Berechnung der Glutathionkonzentration notwendig ist. Nach Zentrifugation für 1 Minute bei 14.000 rpm (Eppendorf Zentrifuge 5415C) und Raumtemperatur

wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Bearbeitung auf Eis gehalten.

c. Derivatisierung mit 2-Vinylpyridin zur Entfernung von reduziertem Glutathion

Von dem unter b) gewonnenen Überstand wurden 100 µL abgenommen, in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 2 µL 2-Vinylpyridin derivatisiert unter Schütteln bei 1500 rpm bei 22°C in einem Heizblock für 1 Stunde. Es ist darauf zu achten, dass der pH-Wert des Überstandes nicht kleiner als 5,5 ist, weil unter sauren Bedingungen die Derivatisierung des GSH mit 2-Vinylpyridin nicht zuverlässig abläuft. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird die Probe für 2 Minuten bei 15800xg (Eppendorf Centrifuge 5415) für 2 Minuten zentrifugiert. Der Überstand kann nun in Messungen eingesetzt werden.

d. Messung des Glutathion-Gehalts

Für die Messung des Glutathiongehaltes wurden folgende Mischungen in einer Küvette zusammenpipettiert und durch Invertieren gemischt.

12,5 µL Zellaufschluss

5 µL Glutathion-Reduktase (20 U mL^{-1} , in Natriumphosphatpuffer, pH=7,5)

50 µL 6 mM DTNB-Lösung (in Natriumphosphatpuffer, pH=7,5)

350 µL 0,3 mM NADPH-Lösung (in Natriumphosphatpuffer, pH=7,5)

332,5 µL bidest. H_2O

Die Absorption des Reaktionsgemischs wurde in einer kinetischen Messung für 10 Minuten im Photometer mit einem Messintervall von 30 Sekunden bei 412 nm beobachtet. Es wurden nur die Messungen verwendet, deren Absorptionzunahme über die gesamte Messzeit linear verlief.

e. Kalibrierung des Assays

Um von den gewonnenen Daten eine quantitative Aussage machen zu können, wurde der Assay mit verschiedenen Konzentration Glutathion (in Natriumphosphat-Puffer, pH =7,5 gelöst) durchgeführt. Dazu wurden die verschiedenen Glutathionkonzentrationen an Reinsubstanz (1,25; 2,5; 3,75; 5; 6,25 µg mL⁻¹) eingesetzt, dreimal über 10 Minuten gemessen und als eine Konzentration als Funktion der Umsatzrate dargestellt. Die Steigung der jeweiligen erhaltenen Geraden wird als Funktion der eingesetzten Konzentration dargestellt; die daraus resultierende Gerade wird als Kalibrationsgerade eingesetzt.

f. Auswertung des Assays

Zur Auswertung der Resultate wurde zunächst der Gehalt an Gesamtglutathion und GSSG für die einzelnen Proben in der oben dargestellten Weise bestimmt. Anschließend erfolgte die Berechnung in der folgenden Weise.

Aus den biologischen Proben werden Geraden erhalten, die die Zunahme der Absorption des TNBs mit der Zeit beschreiben. Die Steigung dieser Geraden wird für jede einzelne Probe ermittelt. Diese Steigung wird in die Geradengleichung der Kalibrationsgeraden eingesetzt und somit eine Glutathion-Konzentration ermittelt. Diese Berechnung wird sowohl für die nicht-VP derivatisierte Probe (Gesamt-Glutathion) und die VP-derivatisierte Probe (GSSG) durchgeführt. Zur Berechnung der GSH Konzentration wird die Konzentration von GSSG mit zwei multipliziert (um so auf die Menge an GSH-Äquivalenten in GSSG zu kommen) und dieser Wert vom Gesamt-GSH abgezogen. Diese absoluten Konzentrationen werden nun verwendet, um das elektrochemische Potential der Zelle zu berechnen unter Verwendung der Nernst'schen Gleichung.

$$E_{hc} = -240 \text{ mV} + \left[\left(\frac{59,1 \text{ mV}}{2} \right) \log \frac{[GSSG]}{[GSH]^2} \right]$$

Als Standard-Reduktionspotential für Glutathion wird ein Wert von -240 mV verwendet. Unter Zuhilfenahme der absoluten Glutathionkonzentrationen (ein bloßes Verhältnis GSH:GSSG ist nicht ausreichend aufgrund des Umstandes, dass GSH als Quadratterm in die Berechnung eingeht) wird das zelluläre Redoxpotential berechnet.

2.11.2 Quantifizierung von ROS-Akkumulation in Hefe

2.11.2.1 Quantifizierung von ROS-Akkumulation mittels Dichlorofluorescein-Diacetat (DCFDA)

Die DCFDA Färbung wurde durchgeführt in Anlehnung an eine publizierte Vorschrift (Brennan und Schiestl, 1997) mit geringfügigen Abweichungen.

Die Hefezellen wurden über Nacht in YPD kultiviert, mit Allicin in entsprechender Konzentration (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ = 0,31 mM; 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ = 0,62 mM) behandelt und für 16 Stunden weiter inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und in 1xPBS (pH=7) gewaschen, bevor DCFDA (2,7 Dichlorofluorescein-diacetat) von einem 5 mM Stock (in DMSO) bis zu einer finalen Konzentration von 50 μM Farbstoff zugegeben wurde; die Ansätze wurden für 20 Minuten bei 28°C inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen in 0,5 % Agarose eingebettet und im Fluoreszenzmikroskop beobachtet (DM RBE; Leica GmbH, Wetzlar), unter Verwendung einer Excitationswellenlänge von 480 nm und einer Emissionswellenlänge von 505 nm. Die Resultate wurden dokumentiert unter Zuhilfenahme einer Digitalkamera (KY-F75U; JVC Germany GmbH, Friedberg).

Zur quantitativen Auswertung wurden jeweils drei unabhängige Sichtfelder mit jeweils mindestens 100 Zellen ausgezählt und die Rate der fluoreszierenden Zellen an der Gesamtzahl der im Sichtfeld vorhandenen Zellen bestimmt.

2.11.2.2 Quantifizierung von ROS-Akkumulation mittels Lucigenin

Lucigenin ist dafür bekannt, dass es nach Reduktion durch starke Reduktionsmittel (beispielsweise Superoxid) Licht emittiert (Myhre et al., 2003, vgl. Abbildung 18). Lucigenin wurde in DMSO bis zu einer finalen Konzentration von 50 mM gelöst.

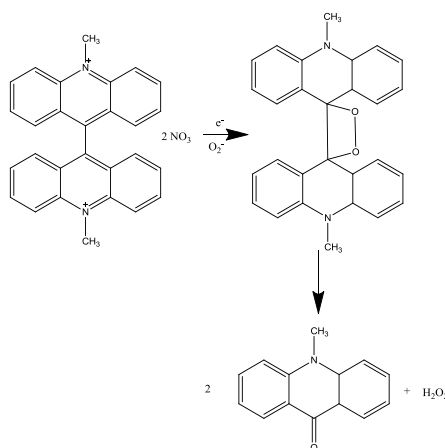


Abbildung 18: Reaktionsmechanismus von Lucigenin nach Reduktion durch Superoxid

Superoxid reagiert mit Lucigenin zu Lucigenin-Dioxetan, das in einem zweiten Schritt spontan unter Lichtemission zu N-Methylacridinium und Wasserstoffperoxid zerfällt.

Die Hefe, die in diesem Assay zum Einsatz kommt, wird in CSM über Nacht kultiviert, mit Allicin behandelt und weiter inkubiert für 16 Stunden. Anschließend werden die Kulturen auf eine gleiche OD_{600} angepasst ($OD_{600} = \sim 0,8$) und 100 μL Kultur mit 100 μL Lucigenin-Lösung versetzt und gemischt. Nach 10 Sekunden wird die Lichtemission über ein Zeitintervall von 5 Sekunden in einem Luminometer gemessen. Die dargestellten Daten sind stets der Mittelwert aus fünf unabhängigen biologischen Replikaten.

2.11.3 Mikroskopische Verlagerung des AIF Proteins in den Zellkern

Um die Expression von AIF-GFP zu induzieren, wurden die Zellen über Nacht in methioninfreiem Medium (SD-Met) über Nacht kultiviert, bis zu einer $OD_{600} = 0,5$ verdünnt und mit Allicin bzw. H_2O_2 behandelt und für weitere 16 Stunden bei 28°C und 210 rpm kultiviert. Als Kontrolle wurden Zellen mit SD-Medium kultiviert, das Methionin enthielt. Diese Behandlung unterdrückt die Expression des AIF-GFP Konstruktes. Zellen wurden auf einen Objektträger gegeben und im Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Messung von Lichtemission eines Luciferase-Konstruktes

Luciferin wird gelöst in leicht saurer 0,1 M Natriumcitratlösung (pH =5) zu einer finalen Konzentration von 1 mM. Eine Übernachtskultur (in CSM-Medium) eines *OS/p*-Luciferase exprimierenden Konstruktes (in YPD) wurde auf eine optische Dichte von $OD_{600}=1$ verdünnt und 100 μ L der verdünnten Kultur werden mit 100 μ L der in wässriger Lösung befindlichen Testsubstanz und 100 μ L Luciferinlösung gemischt.

Die Lichtemission wird über ein Zeitintervall von 2 Stunden im Abstand von 15 Minuten über eine Dauer von 30 Sekunden gemessen.

2.12 Mikroskopische Methoden

2.12.1 Durchlichtmikroskopie von Hefezellen

Lichtmikroskopische Untersuchungen von Hefezellen wurden durchgeführt mittels Einbettung in 0,5 % Agarose. Die Hefezellen wurden üblicherweise bei 400x facher Vergrößerung, ausnahmsweise auch unter Verwendung eines Ölimmersionsobjektivs bei 1000x facher Vergrößerung betrachtet.

2.12.2 Fluoreszenzmikroskopie von GFP bzw. RFP exprimierenden Hefezellen

Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht durch Anregung mit Licht, Fluorophore sichtbar zu machen. Das können entweder Farbstoffe sein oder auch Proteine, wie Grün-fluoreszierende Proteine (GFP). Zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse von Zellen wurden Zellen in Flüssigkultur herangezogen und 10 μ L auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckglas bedeckt. Eine Fixierung der Zellen erfolgte i.d.R. nicht; in Ausnahmefällen erfolgte eine Einbettung in 0,1 % Agarose. Die Präparate wurden im Fluoreszenzmikroskop zunächst bei kleiner Vergrößerung im Durchlicht, später bei 1000-facher Vergrößerung (mit Ölimmersion) im Fluoreszenzlicht betrachtet. Dabei kamen unterschiedliche Filter zur Verwendung; die Zellen wurden im Durchlicht und im Fluoreszenzlicht fotografiert.

2.12.3 Färbemethoden

2.12.3.1 Dichlorofluorescein-Diacetat

Die Färbung zur Quantifizierung der Akkumulation Reaktiver Spezies mittels Dichlorofluorescein-Diacetat erfolgte in Anlehnung an ein publiziertes Protokoll (R.J.Brennan und R.H.Schiestl, 1997) mit geringen Abweichungen. Eine Übernachtskultur von Hefezellen (in YPD) wurde mit Allicin in unterschiedlichen Konzentrationen ($50 \mu\text{g mL}^{-1} = 0,31 \text{ mM}$ bzw. $100 \mu\text{g mL}^{-1} = 0,62 \text{ mM}$) und für 3 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1xPBS Puffer gewaschen. Die Zugabe von 2,7-Dichlorofluorescein-Diacetat (Molecular Probes) erfolgte ausgehend von einer 5 mM Stocklösung (in DMSO) bis zu einer finalen Konzentration von 50 μM . Anschließend wurde für 20 Minuten bei 28°C inkubiert. Nach Waschen mit PBS-Puffer wurden die Zellen auf einen Objektträger gegeben und mit 0,5 % Agarose eingeschlossen und sofort unter dem Fluoreszenzmikroskop (DM RBE; Leica GmbH,

Wetzlar, Germany) betrachtet bei einer Anregungswellenlänge von 480 nm und einer Emissionswellenlänge von 505 nm und fotografisch dokumentiert (KY-F75U; JVC Germany GmbH, Friedberg, Germany). Zur Quantifizierung wurde die Anzahl deutlich fluoreszierender Zellen in je drei Sichtfeldern mit mindestens 100 Zellen ausgewertet.

2.12.3.2 DAPI

Eine Übernachtskultur von Hefezellen wurde auf eine $OD_{600}=1$ verdünnt und anschließend mit den Testsubstanzen in den jeweils angegebenen Konzentrationen behandelt und für weitere 16 Stunden weiter inkubiert. Die Zellen wurden anschließend zentrifugiert, 2mal mit PBS gewaschen, bevor sie durch 10-minütige Inkubation in 70% Ethanol permeabilisiert und fixiert wurden. Anschließend erfolgte ein erneuter Waschschrift mit PBS. Die Färbung erfolgte durch eine Zugabe von DAPI-Lösung (in Methanol; $10 \mu\text{g mL}^{-1}$), bevor die Zellen auf einen Objektträger gegeben und mittels Fluoreszenzmikroskopie betrachtet wurden (405 nm Excitation, 490 nm Emission) (Wu et al., 2010) und fotografiert.

Für die quantitative Auswertung wurden pro Behandlung drei Sichtfelder mit je mindestens 100 Zellen ausgezählt bezüglich der Faktoren

2.12.4 Phalloidin-Alexa- Färbung zur Visualisierung des Actin-Cytoskeletts

Hefezellen werden in CSM-Medium kultiviert und mit Allicin bzw. H_2O_2 behandelt; eine weitere Inkubation erfolgt für 3 Stunden bei 28°C und 210 rpm. Anschließend werden die Zellen abzentrifugiert und in 1 mL 4% Formaldehyd-Lösung resuspendiert und für ca. 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließendes zweimaliges Waschen erfolgt durch Zentrifugation ($8000 \times g$) und resuspendieren in PBS. Phalloidin-iFluor™ 488 Conjugate (Biomol, Hamburg) wird in 30 μL DMSO gelöst. Die Hefezellen in 100 μL PBS + 0,1 % TritonX-100 + 1 μL Phalloidin Stock aufgenommen und für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend können die Zellen im Fluoreszenzmikroskop bei einer Excitationswellenlänge von 480 nm und einer Emissionswellenlänge von 505 nm betrachtet und fotografisch dokumentiert (KY-F75U; JVC Germany GmbH, Friedberg, Germany).

2.13 Statistik

Die statistische Auswertung quantitativer Versuchsergebnisse erfolgte unter Zuhilfenahme des Computerprogramms SigmaStat, Version 3.1. Wurde auf Signifikanz zwischen zwei Stichproben getestet, erfolgte ein t-Test nach Student ($p < 0,05$). Multivariate Vergleichsanalysen zwischen mehreren Datensätzen wurden mittels ANOVA unter Verwendung der Rohdaten durchgeführt, wobei der jeweils durchgeführte statistische Test vom jeweiligen Datensatz abhängig war.

3 Resultate

3.1 Etablierung einer Syntheseprozedur von Allicin

Die Etablierung einer verlässlichen Syntheseprozedur, die Allicin in hoher Reinheit mit ausreichender Ausbeute liefert, war notwendig, um die physiologische Wirkung von Allicin auf Zellen eingehend untersuchen zu können.

In Zusammenarbeit mit Dr. Awais Anwar (EcoSpray Ltd., Norwich) wurde in unserem Labor eine Synthese- und Analysestrategie etabliert, die in einem biologischen Labor mit der vorhandenen apparativen Ausstattung durchführbar ist. Weil Wasserstoffperoxid relativ instabil ist, obwohl es in den kommerziell erhältlichen 30%igen Lösungen mit Phosphorsäure stabilisiert wird, wurde vor Beginn der Synthese überprüft, ob die tatsächliche Konzentration H_2O_2 mit der erwarteten übereinstimmt. Vor Verwendung wurde die Reinheit des Diallyldisulfids mittels HPLC überprüft.

Die Synthese wurde nach dem in 2.5.1 beschriebenen Protokoll durchgeführt. Die Reinheit wurde mittels HPLC bestimmt und lag in den unterschiedlichen Präparationen zwischen 93 und 98 %. Die Ausbeuten an Produkt lagen zwischen 50 und 85 %, je nach Ansatz. Ein exemplarisches Chromatogramm, das das Produkt einer solchen Synthese repräsentiert, ist in Abbildung 19 gezeigt.

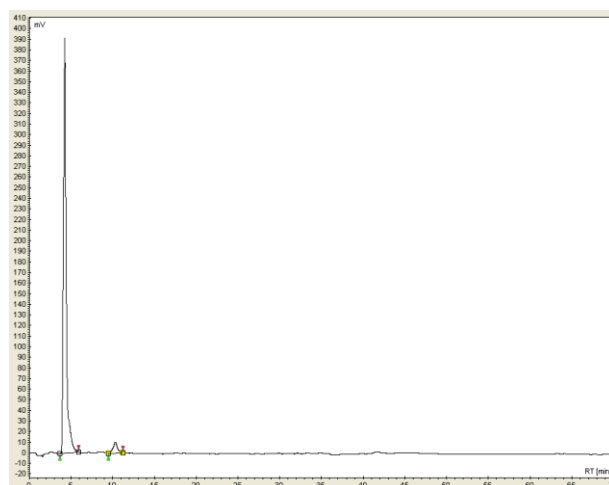


Abbildung 19: Exemplarisches Chromatogramm einer Allicinsynthese nach Aufreinigung

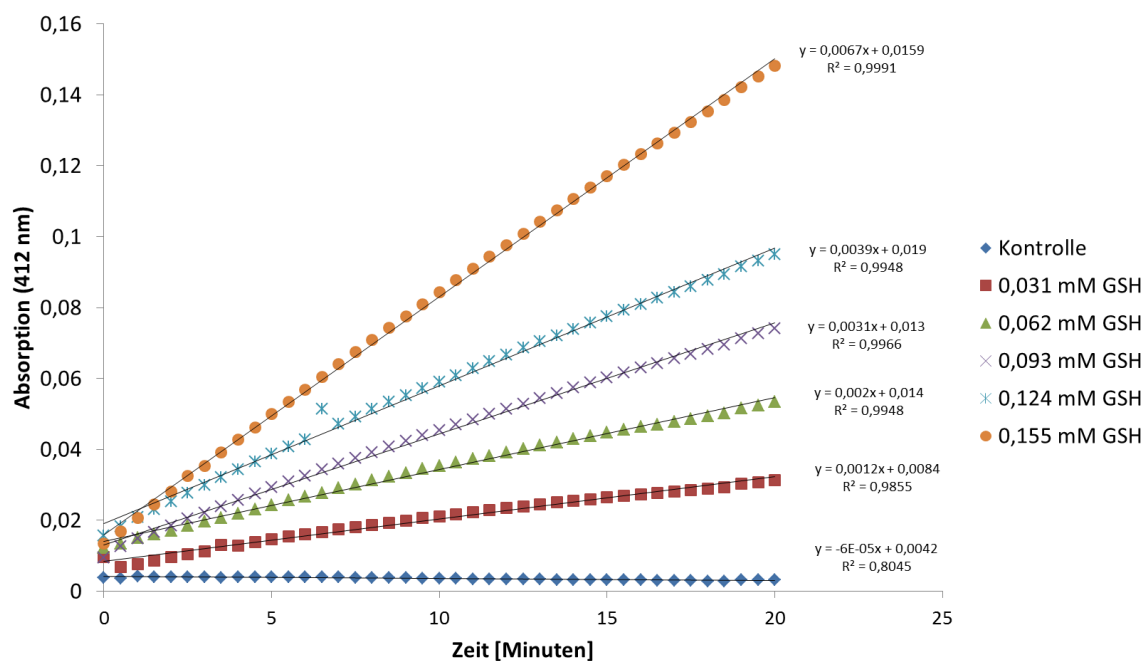
Das Chromatogramm zeigt Allicin, das aus Diallyldisulfid mit der in 2.5.3 dargestellten Prozedur synthetisiert wurde. Die Reinheit wurde anhand der Peakflächen der Einzelpeaks bestimmt und beträgt für diese Präparation 96,3 %.

3.2 Untersuchungen zum Signalweg der Apoptose - Induktion durch Allicin in *Saccharomyces cerevisiae*

3.2.1 Glutathion-Messung zur Ermittlung des elektrochemischen Redoxpotentials der Zelle

Glutathion ist der bedeutendste thiolbasierte Redoxpuffer in der Zelle. Allicin zeigt eine hohe Reaktivität gegenüber Thiolgruppen und oxidiert diese zu Mischdisulfiden. Vermutlich werden diese in weiteren Reaktionen zu Homodisulfiden umgesetzt. Deshalb sollte untersucht werden, ob - wie es aufgrund dieser theoretischen Überlegungen zu erwarten wäre - Glutathion durch Allicin zu Glutathion-Disulfid (GSSG) umgesetzt wird.

Um den Assay zu kalibrieren, wurden verschiedene bekannte Konzentrationen von Glutathion-Reinsubstanz anstelle der biologischen Probe in den Assay eingesetzt und die Messung mit diesen bekannten Proben durchgeführt. Die Steigung der Absorptionszunahme dient dabei als Messwert, der zur bekannten Glutathionkonzentration in Relation gesetzt wird. Eine separate Kalibration mit GSSG wurde ebenfalls durchgeführt (Abbildung 20).



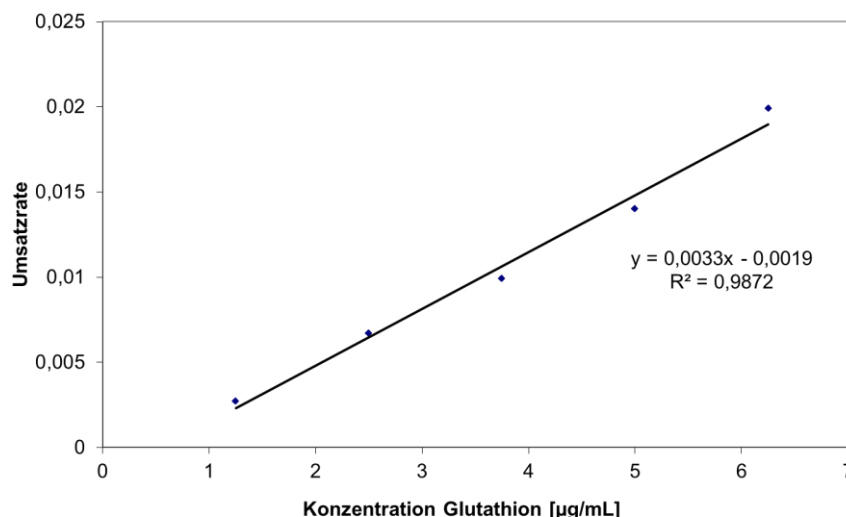


Abbildung 20: Beispiel für eine Kalibration des Glutathion-Reduktase-Assays

In den Glutathion-Reduktase-Assay wurde 12,5 µL Glutathion-Lösung (in Na-Phosphat-Puffer) eingesetzt; als Kontrolle diente das gleiche Volumen Na-Phosphat-Puffer ohne Glutathion. Gemessen wird im Spektrophotometer die Zunahme der optischen Dichte mit der Zeit (über eine Zeitspanne von 20 Minuten). Diese Zunahme ist linear und entsprechend kann die Steigung als Zunahme der Absorption pro Zeit bestimmt werden. Dieser Wert wird bestimmt, um mit drei Replikaten eine Kalibrationsgerade (B) zu erstellen, bei der die Umsatzrate gegen die Glutathionkonzentration aufgetragen wird. Mithilfe der Geradengleichung kann aus der Umsatzrate auf die exakte Glutathionkonzentration geschlossen werden.

In analoger Weise wurden die biologischen Proben (Allicin-behandelt/unbehandelt) bearbeitet. Nach Aufschluss der Zellen (siehe Material und Methoden Punkt 2.8.1) wurden 12,5 µL des Zell-Lysats in den Glutathion-Reduktase Assay gegeben und entsprechend der Kalibration über einen Zeitraum von 10 Minuten gemessen. Mit der Geradengleichung der Kalibrationsgerade wurde aus der Umsatzrate des Enzyms auf die Glutathionmenge zurückgeschlossen. Es wurden Minimal- und Maximalwerte berechnet, indem für die Hefezellen das Fehlen einer Vakuole angenommen wurde (Minimalwert) oder angenommen wurde, dass die Vakuole 20% des Zellvolumens einnimmt (Maximalwert). Diese Werte wurden auf das Zellvolumen angewendet, das zuvor bestimmt worden ist, um die absolute Glutathionkonzentration zu bestimmen. In analoger Weise wurden ebenfalls Proben behandelt, die mit 2-Vinylpyridin behandelt worden sind, um reduziertes Glutathion aus dem Gleichgewicht zu entziehen. Die erhaltenen Umsatzraten wurden sowohl durch die GSSG aufgenommene Kalibration in Glutathionkonzentrationen umgerechnet, als auch die Berechnung mithilfe der GSH-Kalibration durchgeführt, wobei die finale Menge durch zwei geteilt werden musste (weil GSSG ein GSH-Dimer darstellt).

Tabelle 5: Effekt von Allicinbehandlung auf den Glutathionpool des Hefestamms RS453. Die minimalen und maximalen Werte geben die Annahme wieder, dass die Zellen eine Vakuole mit einem angenommenen Zellvolumen von 20% haben oder dieses fehlt. Die maximale Auflösung dieses Testes, die Konzentrationsunterschiede zuverlässig wiedergeben kann, liegt bei 0,03 mM. Die dargestellten Werte sind gemittelt über vier unabhängige Replikate. Der Unterschied zwischen den Absolutkonzentrationen behandelter und unbehandelter Proben ist statistisch nicht signifikant ($p < 0,05$). Werte mit unterschiedlichen

Buchstaben repräsentieren statistische Unterschiede ($p < 0,05$), bestimmt mittels One-way ANOVA (Holm-Šidák-Methode).

	Experiment I (0.65 mM Allicin)		Experiment II (1.3 mM Allicin)	
	<i>Unbehandelt</i>	<i>Behandelt</i>	<i>Unbehandelt</i>	<i>Behandelt</i>
Absolute zelluläre Glutathion-Konzentration	$1.84^a \pm 0.26$ bis $2.30^a \pm 0.33$ mM	$1.19^b \pm 0.14$ bis $1.49^{ab} \pm 0.17$ mM	$1.35^{ab} \pm 0.27$ bis $1.59^{ab} \pm 0.29$ mM	$1.18^b \pm 0.12$ bis $1.50^b \pm 0.16$ mM
GSH	99,6 – 99,8 %	96,6 – 96,8 %	99,1 – 99,2 %	90,4 – 90,7 %
GSSG	0,2 – 0,4 %	3,2 – 3,4 %	0,8 – 0,9 %	9,3 – 9,6 %

Beispielhaft sind zwei Experimente gezeigt, in deren Mittelwert jeweils vier Replikate eingehen und zwei verschiedene Konzentrationen von Allicin getestet wurden. Der Anteil an reduziertem Glutathion betrug in beiden Fällen in den unbehandelten Proben über 99 % – die Zelle ist im nicht-gestressten Zustand hochgradig reduziert. Der Anteil an oxidiertem Glutathion war entsprechend mit 0,2 – 0,9 % gering. Die Behandlung von Hefezellen mit Allicin hatte zwei Effekte: zum einen eine deutliche Zunahme an oxidiertem Glutathion und eine statistisch signifikante Abnahme der absoluten messbaren Glutathionkonzentration. Diese beiden Effekte, die Allicin auf den Redoxpuffer Glutathion hat, spiegeln sich ebenfalls wider in der Berechnung des zellulären elektrochemischen Potentials, bei dem die absoluten Konzentrationen des Glutathionpools in die Nernst'sche Gleichung eingesetzt werden und das entsprechende, glutathiondefinierte elektrochemische Potential („Thiolstat“) berechnet wird. Aus diesem elektrochemischen Wert ist es aufgrund einer Vielzahl von Studien, die eine Korrelation zwischen dem elektrochemischen Potential und dem physiologischen Zustand beobachteten, möglich, auf einen Zustand der Zelle zu schließen.

Tabelle 6: Effekt von Allicinbehandlung auf das elektrochemische Redoxpotential des Hefestammes RS453. Die minimalen und maximalen Werte geben die Annahme wieder, dass die Zellen eine Vakuole mit einem angenommenen Zellvolumen von 20% haben oder dieses fehlt. Die dargestellten Werte wurden gemittelt über vier unabhängige Replikate. Der Unterschied zwischen den Absolutkonzentrationen behandelter und unbehandelter Proben ist statistisch nicht signifikant ($p < 0,05$). Werte mit unterschiedlichen Buchstaben repräsentieren statistische Unterschiede ($p < 0,05$), bestimmt mittels One-way ANOVA (Holm-Šidák-Methode).

	Experiment I (0.65 mM Allicin)		Experiment II (1.3 mM Allicin)	
	<i>Unbehandelt</i>	<i>Behandelt</i>	<i>Unbehandelt</i>	<i>Behandelt</i>
Berechneter E_{hc}	$< -215^a$ mV	-196^b bis -200^b mV	$< -215^a$ mV	-181^b bis -184^b mV
Physiologischer Zustand der Zelle nach Schafer und	Proliferation	Übergang Proliferation zu Apoptose	Proliferation	Apoptose

Buettner (2001)

Nach entsprechender Berechnung zeigte sich ein stark negatives Redoxpotential (d.h. reduzierend) für die unbehandelten Kontrollen beider Experimente mit weniger als -215 mV; dieser Potentialwert ist mit der Zellproliferation für tierische Zellsysteme korreliert.

Nach Zugabe von Allicin einer finalen Konzentration von 0,65 mM stieg das Redoxpotential auf einen Wert von -196 bis -200 mV (diese unterschiedlichen Werte kommen durch die Berechnung unter Einbezug oder Abzug des Vakuolenvolumens zustande. Mit diesem Potential befindet sich die Zelle nach (Schafer und Buettner, 2001) im Übergangszustand von Differenzierung zu Apoptose.

Mit einer entsprechend höheren Konzentration von 1,3 mM war, entsprechend den Ergebnissen der Glutathionquantifizierung, das zelluläre Redoxpotential höher als bei der niedrigeren Allicinkonzentration; die Zelle ist mehr oxidiert. Bei Behandlung mit dieser Allicinkonzentration befand sich die Zelle nach der Vorhersage von Schafer und Buettner (2001) deutlich im Bereich der Apoptose.

In einem nächsten Schritt sollte getestet werden, ob diese Vorhersage des physiologischen ‚Status‘ der Apoptose-induktion mit einer tatsächlichen Apoptose-induktion einhergeht.

3.2.2 Glutathion-defizitäre Hefemutanten zeigen eine verringerte Resistenz gegenüber Allicin

Um die Frage zu beantworten, ob die beobachteten Effekte auf den Glutathionpool physiologische Relevanz besitzen, wurden Mutanten hinsichtlich ihrer Allicinresistenz untersucht, die im Glutathion-Stoffwechsel beeinträchtigt sind. Diese zeigen entweder eine verringerte Glutathionkonzentration ($\Delta gsh1$, $\Delta gsh2$, die beide Glutathionbiosynthesemutanten darstellen) oder die Reduktion von oxidiertem Glutathion unterbleibt ($\Delta glr1$ = Mutante der Glutathion-Reduktase). Bei der Versuchsdurchführung wurde besonderes Augenmerk auf die Medien gelegt, weil YPD als Komplexmedium Glutathion enthält (z.B. aus Hefeextrakt), im Gegensatz zum definierten CSM-Medium, das zwar Aminosäuren, aber kein Glutathion enthält. Um zu beobachten, ob die Mutation durch Aufnahme von Glutathion aus dem Medium physiologisch komplementiert wird, wurden die Versuche mit Glutathion-mutanten sowie dem zugehörigen Wildtyp-Stamm BY4742 sowohl in YPD- als auch in CSM-Medium durchgeführt. Zur Untersuchung der Resistenz gegenüber Allicin wurde der Hemmhoftest (siehe 2.8.4.2) verwendet, weil dieser sowohl die Wirkung auf den Zelltod wie auch auf die Inhibition des Wachstums in sein Resultat miteinschließt.

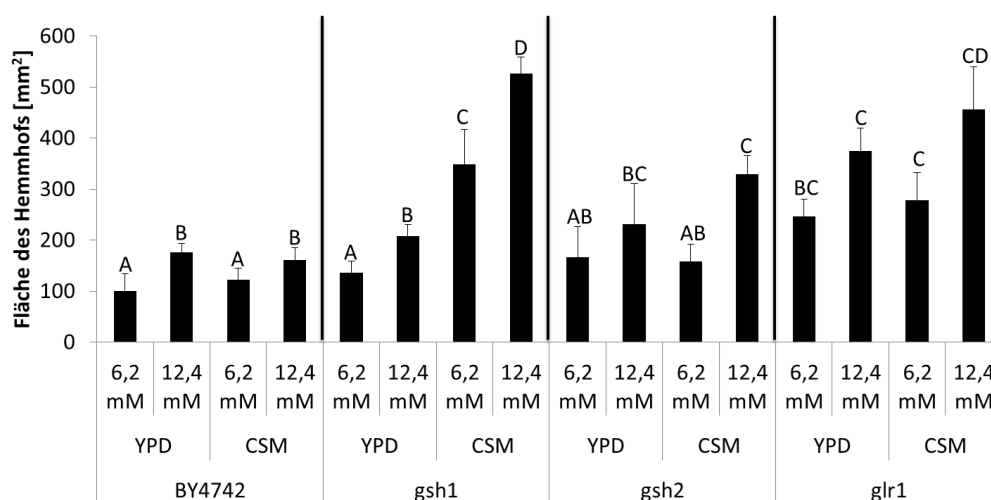


Abbildung 21: Vergleich der Wirkung von Allicin auf verschiedene Glutathion-mutanten und den Wildtyp BY4742

Verschiedene Glutathion-Mutanten wurden mit dem Wildtyp und untereinander hinsichtlich einer unterschiedlichen Resistenz gegenüber Allicin verglichen. Ferner verglichen wurde die Wirkung von den beiden Medien YPD und CSM. Während YPD als Komplexmedium Glutathion enthält, das die Hefezellen aufnehmen können und so die Mutation im Glutathion-metabolismus, zumindest teilweise, komplementieren können, ist CSM frei von Glutathion. Das bedeutet, dass die beobachteten unterschiedlichen Effekte von Allicin in den Mutanten direkt mit der Mutation korrelieren und nicht durch Glutathion im Medium beeinflusst sein können. Die unterschiedliche Resistenz wurde mit dem Hemmhofstest verglichen, dessen Durchführung in Kapitel 2.8.4.2 beschrieben ist. Dieser Versuch wurde zweimal wiederholt mit vergleichbaren Ergebnissen. Die gezeigten Werte sind gemittelt aus acht Messwerten; der Versuch wurde zweimal wiederholt. Die Buchstaben zeigen statistische Unterschiede an (ANOVA (Holm-Šidák-Methode), $p < 0,05$).

Während der Unterschied zwischen YPD-Medium und CSM-Medium im Wildtyp nicht signifikant war, stellte sich die Situation in der $\Delta gsh1$ Mutante gänzlich anders dar: Die $\Delta gsh1$ Mutante zeigte in YPD-Medium keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Hemmhofflächen zum Wildtyp, in CSM-Medium jedoch war die Fläche des Hemmhofs signifikant größer als im Wildtyp, sowohl verglichen mit der Kultivierung in YPD wie in CSM. Dies legt nahe, dass die $\Delta gsh1$ Mutation durch Aufnahme von Glutathion aus dem Medium – das YPD im Gegensatz zu CSM besitzt – physiologisch komplementiert werden kann. Ferner zeigt dies aber auch, dass der Glutathionstoffwechsel entscheidend ist für die Resistenz von Hefezellen gegenüber der Exposition von Allicin.

Der Unterschied zwischen YPD und CSM war in der $\Delta gsh2$ Mutante nicht gleich stark verglichen zur $\Delta gsh1$ Mutante, dennoch war die Hemmhoffläche in CSM bei der höheren Konzentration ($2 \text{ mg mL}^{-1} \approx 12 \text{ mM}$) signifikant größer als in YPD für die $\Delta gsh2$ Mutante. Ein ähnliches Bild ergab sich für die $\Delta glr1$ Mutante.

Aus diesen Daten kann geschlossen werden, dass die Wirkung von Allicin in YPD geringer ist als bei entsprechenden Konzentrationen in CSM-Medium. Dies macht für die weiteren Versuche deutlich, dass die Frage, welches Medium für die Versuche verwendet wird, von Bedeutung ist. Weil YPD Hefeextrakt enthält, CSM aber aus synthetischen Komponenten zusammengesetzt ist, besteht die Vermutung, dass in YPD Glutathion enthalten ist, das von den Zellen aufgenommen werden kann und auf diese Weise den Redox-Haushalt der Zelle moduliert. CSM jedoch enthält kein Glutathion, so dass

in diesem Medium die Zellen nur über das wirklich von der Zelle gebildete Glutathion verfügen und die nicht den Redoxstatus durch aufgenommenes, externes Glutathion verändern können.

3.2.3 Signalweg der Apoptose-induktion durch Allicin in Hefe

3.2.3.1 Allicin ist für die Apoptose-induzierenden Eigenschaften von Knoblauchsaff verantwortlich

In einer vorangegangenen Arbeit (Diplomarbeit Martin Gruhlke, 2009) war gezeigt worden, dass Knoblauchsaff in der Lage ist, Apoptose in Hefezellen zu induzieren. Aufgrund der Möglichkeit, nun selbst chemisch reines Allicin zu synthetisieren, sollte untersucht werden, ob Allicin die Komponente des Knoblauchsaffs ist, die für die Induktion der Apoptose verantwortlich ist. Bereits gezeigt worden war, dass Allicin den Redoxhaushalt der Zelle massiv zu stören in der Lage ist und das elektrochemische Redoxpotential in einen Bereich verschiebt, der mit der Induktion von Apoptose korrelieren kann. Entsprechend wurde die Hypothese formuliert, dass Allicin Apoptose in Hefe induziert. Diese Hypothese wurde mittels Expression eines humanen, antiapoptotischen Proteins in Hefe sowie eines Knockout-Stammes eines hefeeigenen, proapoptotischen Gens in Hefe überprüft.

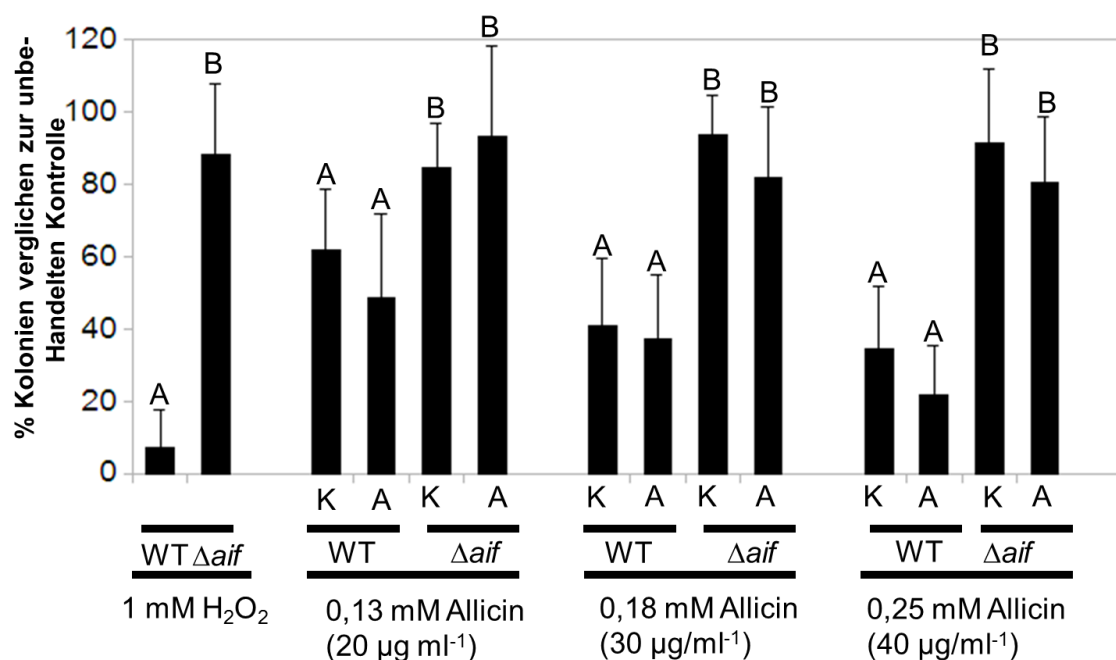


Abbildung 22: Effekt einer *AIF*-Deletion auf die Überlebensrate nach Behandlung mit H₂O₂, Knoblauchsaff (K) und chemisch synthetisiertem Allicin (A)

Hefekulturen wurden mit H₂O₂ (finale Konzentration 1 mM) als Positivkontrolle, Knoblauchsaff, dessen Allicinkonzentration mittels HPLC bestimmt worden war und chemisch synthetisiertem Allicin behandelt (die Konzentrationen geben eine finale Konzentration in der Kultur an). Details zur Durchführung finden sich in Kapitel 2.8.5. Es zeigt sich, dass die Wirksamkeit von Knoblauchsaff und chemisch synthetisiertem Allicin vergleichbar sind gegenüber Wildtyp Zellen; eine Deletion des proapoptotischen *AIF*-Gens führt zu einer erhöhten Überlebensrate gegenüber der Behandlung mit H₂O₂ und Allicin. Die aufgeführten Werte sind gemittelt aus neun Einzelwerten; der Versuch wurde dreimal wiederholt. Die Buchstaben indizieren statistisch signifikante Unterschiede innerhalb der jeweiligen Behandlungsgruppe (ANOVA; Holm-Šidák-Methode; $p < 0,05$).

Eine Deletion des hefeeigenen proapoptotischen AIF sollte zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Allicin führen, wenn Allicin Apoptose in Hefe in einem AIF-abhängigen Signalweg induziert. Um dieser Frage nachzugehen, wurden im Droptest Wildtyp- und $\Delta aif1$ -Mutantenzellen mit H_2O_2 als Positivkontrolle behandelt sowie mit Allicin in Form von Knoblauchsaff und chemisch synthetisiertem Allicin. Es zeigte sich bei den Wildtyp-Hefezellen, dass die Behandlung mit Knoblauchsaff und chemisch synthetisiertem Allicin in allen drei getesteten Konzentrationen zu einer vergleichbaren Reduktion der Anzahl von Kolonien kommt, was auf eine Verringerung der Anzahl lebendiger Zellen in der Hefekultur hindeutet. Aus diesen Resultaten lässt sich schließen, dass Allicin wohl die wirksame Substanz in frischem Knoblauchsaff darstellt in Bezug auf die toxische Wirkung gegenüber Hefezellen.

Vergleicht man die Wirkung von sowohl H_2O_2 als auch Allicin in beiden eingesetzten Allicin-Präparationen (Knoblauchsaff/synthetisiertes Allicin) zeigte sich, dass $\Delta aif1$ eine höhere Überlebensrate nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid zeigte als Wildtypzellen. Die Behandlung von Hefezellen mit Wasserstoffperoxid in diesem Konzentrationsbereich führte zur Induktion von Apoptose. Somit zeigt die Beobachtung, dass H_2O_2 Apoptose in Hefe in einer AIF1-abhängigen Weise induziert. Ebenso war die Überlebensrate der $\Delta aif1$ Mutante bei Behandlung mit Allicin in Form von Knoblauchsaff bzw. synthetischem Allicin in allen drei getesteten Konzentrationen statistisch signifikant erhöht. Es kann geschlossen werden, dass Allicin Apoptose in Hefezellen in einer AIF-abhängigen Weise induziert. Ferner konnten mit diesem Versuch bereits erzielte Resultate für Knoblauchsaff bestätigt werden und auf die Reinsubstanz Allicin zurückgeführt werden.

In einem weiteren Versuch wurde der Einfluss des humanen, antiapoptotischen Bcl_{xL} Proteins auf die Zelltodinduktion durch Allicin untersucht. Bereits gezeigt werden konnte verschiedentlich in der Literatur, dass Bcl_{xL} in analoger Weise wie in Säugetierzellen wirkt. Ein Bcl_{xL} -exprimierender Hefestamm im Hintergrund des Wildtyps BY4742 wurde mit einem nicht funktionalen Bcl_{xL} -Konstrukt verglichen ($Bcl_{xL}\Delta C$), dessen, für die Funktion des Proteins entscheidender, C-Terminus deletiert ist. Das Bcl_{xL} Protein hat in Säugetieren Einfluss auf die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien, so dass es Einfluss nimmt auf die AIF-unabhängige Route der Apoptose-Induktion. Die Konstrukte stehen unter der Kontrolle eines galactose-induzierbaren Promoters.

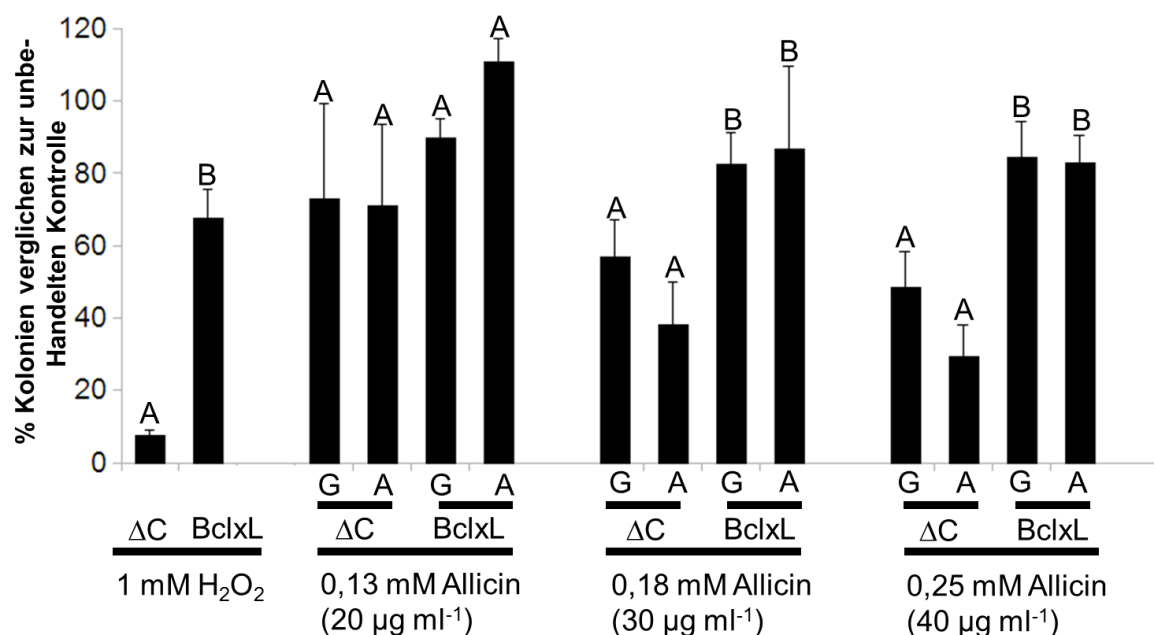


Abbildung 23: Effekt einer Bcl_{xL} Expression auf die Überlebensrate von Hefezellen nach Behandlung mit Alliin und H₂O₂ im Vergleich mit einer inaktiven Variante des Bcl_{xL} Proteins (ΔC)

Hefekulturen wurden in galactose-haltigem Medium (YPGal) zur Induktion der Genexpression angezogen und mit H₂O₂ und Alliin (Knoblauchsaff/chemisch synthetisiert) behandelt. Die Konzentrationen geben eine finale Konzentration in der Kultur an. Die Expression eines funktionalen Bcl_{xL} Konstruktes erhöht die Resistenz gegen sowohl H₂O₂ als auch Alliin in beiden Präparationen deutlich im Vergleich zum C-terminal deletierten und damit nicht-funktionalen Konstrukt. Die Durchführung erfolgte wie beschrieben im Material- und Methodenteil unter Punkt 2.8.5. Die aufgeführten Werte sind gemittelt aus neun Einzelwerten; der Versuch wurde dreimal wiederholt. Die Buchstaben indizieren statistisch signifikante Unterschiede innerhalb der jeweiligen Behandlungsgruppe (ANOVA; Holm-Šidák-Methode; $p < 0,05$).

Die Ergebnisse zeigten, dass eine Behandlung mit H₂O₂ als Positivkontrolle des Experimentes den Hefestamm, der die C-terminal deletierte Form des Bcl_{xL} Proteins exprimiert, eine vergleichbare Wirkung hatte wie im vorangegangenen Experiment auf den nicht transformierten Wildtypstamm BY4742. Das indizierte, dass das Bcl_{xL}ΔC in der Tat eine inaktive Form des Proteins darstellt. Im Gegensatz dazu erhöhte die Expression des funktionalen Bcl_{xL}-Konstruktes die Resistenz gegenüber H₂O₂.

In den getesteten Konzentrationen ergab sich für eine Behandlung mit Alliin ein ähnliches Bild, wobei bei allen drei Konzentrationen Knoblauchsaff und Alliin in ähnlicher Weise wirken. Tendenziell schien insbesondere bei den mit dem ΔC-Konstrukt transformierten Zellen chemisch synthetisiertes Alliin stärker zu wirken als Knoblauchsaff mit einer entsprechenden Allicinkonzentration, wobei dieser Unterschied nicht statistisch signifikant war. Bei einer Behandlung mit 0,13 mM Alliin (sowohl Knoblauchsaff wie auch chemisch synthetisiertes Alliin) war der Unterschied zwischen der funktionellen und nicht-funktionellen Form nur tendenziell, nicht aber statistisch signifikant. Signifikant war der Unterschied bei den beiden weiteren getesteten Konzentrationen (0,18 mM und 0,25 mM), bei denen der Bcl_{xL}-exprimierende Stamm eine statistisch signifikant höhere Überlebensrate als der C-terminal deletierte (ΔC) exprimierende Stamm aufwies.

Diese Beobachtung belegte, dass Bcl_{XL} auch in Hefe in der Lage war, gegen die Wirkung von Allicin und H₂O₂ zu schützen. Indem die Aktivität des Bcl_{XL} Proteins darin besteht, Apoptose zu unterdrücken, lässt sich aus diesen Befunden schließen, dass Allicin nicht nur AIF-abhängige, sondern auch AIF1 unabhängige Apoptose in Hefe induziert. Die Apoptose-Induktion korreliert mit der Verschiebung des zellulären Redoxzustandes.

3.2.3.2 Das Actinzytoskelett wird von Allicin beeinflusst.

Nachdem gezeigt worden war, dass Allicin in der Lage ist, Apoptose in *S. cerevisiae* zu induzieren, sind die nachfolgenden Fragen, auf welche Weise das Redoxsignal in der Zelle perzipiert wird und auf welchem Signalweg das perzipierte Signal weitergeleitet wird. Aufgrund von Studien in menschlichen Zellen, die zeigen, dass Allicin die Integrität des Tubulin-Cytoskeletts zerstört (Prager-Khoutorsky et al., 2007), sollte untersucht werden, ob das Cytoskelett ein Target für die Wirkung von Allicin darstellt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden das Actin- und das Tubulincytoskelett untersucht, wobei für die Bearbeitung des Tubulin-Cytoskeletts die Expression eines Tubulin-GFP gewählt wurde, während das Actin histologisch mittels eines phalloidin-gekoppelten Farbstoffs beobachtet werden sollte. Zwar wurde ein β -Tubulin-GFP Konstrukt in Hefe eingebracht und erfolgreich auf Identität getestet, aber vereinzelte Strukturen in allen getesteten Transformanten waren so schwach, dass eine Visualisierung eines Gesamtytoskeletts nicht erfolgreich war. Somit wurde mit diesem Ansatz der Effekt von Allicin auf das Tubulin-Cytoskelett nicht weiter verfolgt.

Ferner wurden die Actin-Filamente visualisiert, um so den Einfluss von Allicin auf diesen Bestandteil des Cytoskeletts zu untersuchen. Auch hier wurden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt. Ein Konstrukt, bei dem ein Actin-bindeprotein (ABP140) an GFP gekoppelt worden war, ergab nur eine aggregierte Fluoreszenz und es waren keine filamentösen Strukturen zu erkennen.

Als alternatives Verfahren wurde die Färbung mit Phalloidin, das an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist (Alexa 488), gewählt. Hierbei bindet Phalloidin an filamentöses Actin (F-Actin) in Formaldehyd-fixierten Zellen, das nach Auswaschen von überschüssigem Farbstoff im Fluoreszenzmikroskop sichtbar wird.

Dabei konnten Zellen, die nicht behandelt worden waren (Kontrolle), verglichen werden mit sowohl H₂O₂- wie Allicin behandelten (Abbildung 24).

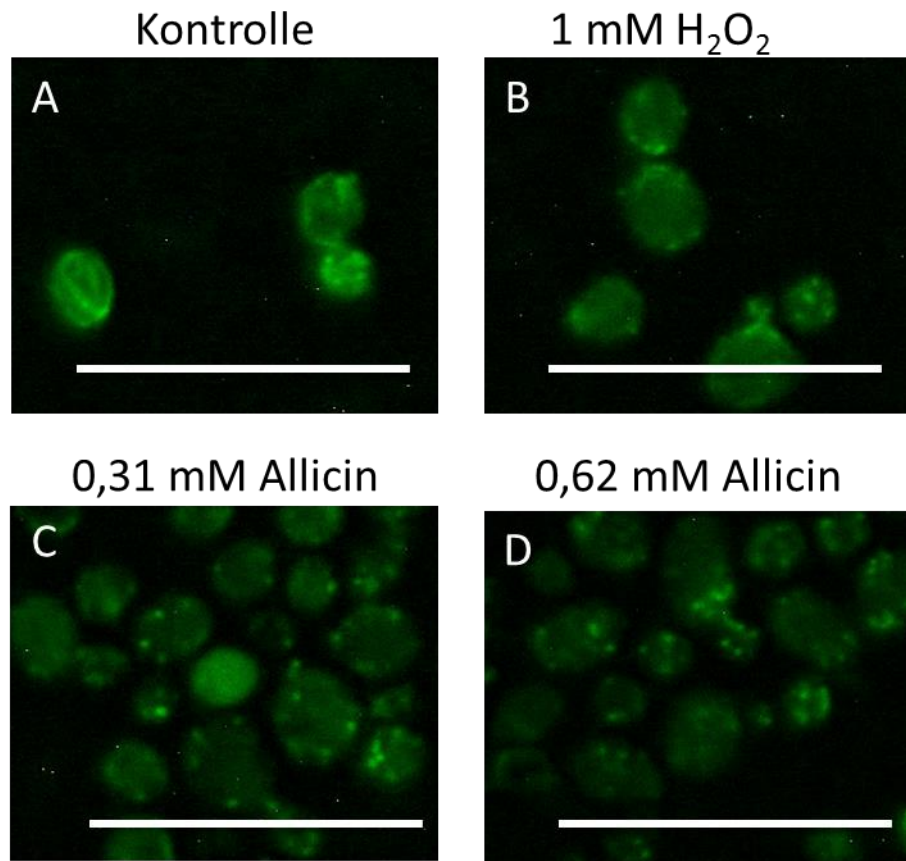


Abbildung 24: Actin-Cytoskelett nach Färbung mit Phalloidin-Alexa 488

Während in der Kontrolle deutlich filamentöse Strukturen, die das Cytoskelett repräsentieren, zu erkennen sind (A), kommt es bei der Behandlung mit H_2O_2 zu einem weitgehenden Verlust dieser Strukturen (B). Ebenso kommt es zum Verlust der filamentösen Strukturen bei Behandlung mit Allicin, wobei hier auffällig ist eine hohe Rate von Zellen mit punktuell aggregierter Fluoreszenz (C und D). Die Durchführung der Phalloidin-Färbung zur Visualisierung des Actin-Cytoskeletts ist unter Punkt 2.11.4 beschrieben. Die Größenmarkierung in weiß entspricht $10\ \mu\text{m}$.

Kontrollzellen zeigten deutliche Fluoreszenz in filamentösen Strukturen, die die gesamte Zelle durchspannen. Im Gegensatz dazu, war die Fluoreszenz in H_2O_2 behandelten Zellen insgesamt diffuser und in Aggregaten angeordnet, während die Filamente nicht mehr zu finden waren.

Ähnliches galt für die Behandlung mit Allicin, die ebenfalls zu einer Auflösung der Filamentstrukturen führte und zu einer aggregierten Fluoreszenz führte.

Sowohl Wasserstoffperoxid als auch Allicin zerstörten also die Filamentstruktur des Actins.

3.2.3.3 RAS2 und cAMP sind bedeutende Regulatoren der Antwort von Hefezellen auf Allicinstress

Es ist zu erwarten, dass eine Zerstörung der Integrität des Actin-Zytoskeletts Einfluss auf die zelluläre Signalweiterleitung hat. Um nun der Frage nachzugehen, ob die Beeinflussung der Actin-Integrität des Cytoskeletts eine Rolle spielt in der Induktion der Hefe-Apoptose, wurden Faktoren untersucht,

für die beschrieben ist, dass sie an der Induktion von Hefeapoptose nach Beeinflussung des Cytoskeletts bedeutsam sind.

Es wurde beschrieben, dass das G-Protein RAS2 an der Weiterleitung eines Stimulus, der durch die Beeinflussung des Actin-Cytoskeletts induziert wird, beteiligt ist (Gourlay, 2006). Deshalb wurde eine $\Delta ras2$ Mutante im Vergleich zum Wildtyp im Hemmhoftest untersucht. Es zeigte sich, dass die Hemmhöfe der $\Delta ras2$ Mutante in den beiden getesteten Konzentrationen signifikant kleiner sind als beim Wildtyp (Abbildung 25). RAS2 ist also bedeutsam für die Anfälligkeit von Hefezellen gegenüber Allicin.

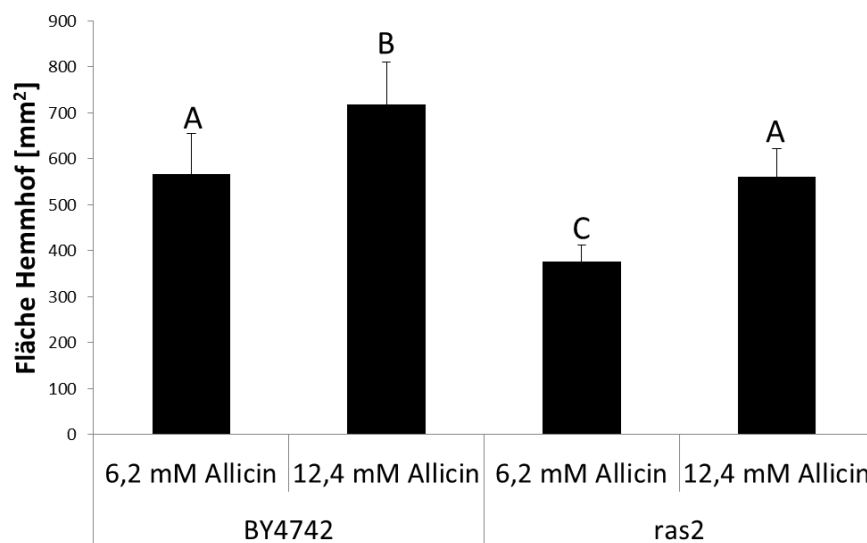


Abbildung 25: Empfindlichkeit der $\Delta ras2$ Mutante gegenüber Allicin im Vergleich zum Wildtyp BY4742

Die $\Delta ras2$ Mutante wurde auf ihre Resistenz gegen Allicin im Hemmhoftest (siehe 2.8.4.2) im Vergleich zum Wildtyp BY4742 getestet. Die Mutante weist statistisch signifikant kleinere Hemmhofflächen auf bei beiden getesteten Konzentration (6,2 und 12,4 mM), was darauf hindeutet, dass RAS2 wichtig ist für den allicin-induzierten Zelltod, weil das Fehlen dieses Faktors eine erhöhte Resistenz verleiht. Die dargestellten Werte sind gemittelt aus acht Einzelwerten; der Versuch wurde zweimal wiederholt. Der Test auf Signifikanz erfolgte mit einem One-way ANOVA unter Anwendung der Holm-Šidák Methode mit $p < 0,05$.

In der RAS2 Signalkaskade interagiert RAS2 mit einer Adenylat-cyclase und reguliert deren Aktivität. Die Adenylat-Cyclase vermittelt die Cyclisierung von Adenosin-Monophosphat, die Umkehrreaktion (also die Linearisierung von cAMP) wird durch die Phosphodiesterase vermittelt. Es wurde im nachfolgenden Versuch getestet, ob die $\Delta pde2$ Mutante eine veränderte Suszeptibilität gegenüber Allicin aufweist im Vergleich zum Wildtyp. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Abbildung 26 gezeigt.

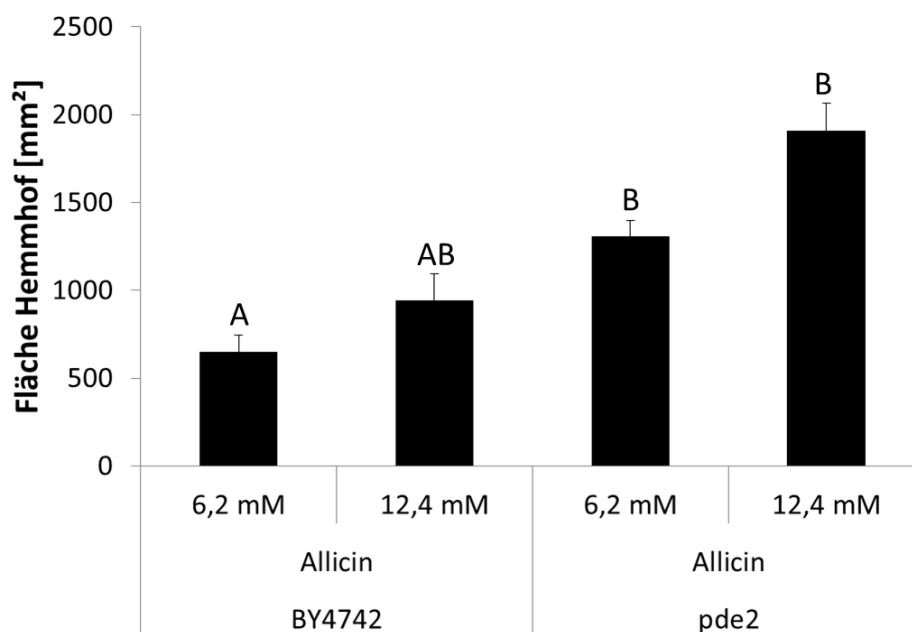


Abbildung 26: Empfindlichkeit der $\Delta pde2$ Mutante gegenüber Allicin und H_2O_2 im Vergleich zum Wildtyp BY4742

Eine Mutante der Phosphodiesterase 2 ($\Delta pde2$) wurde auf ihre Resistenz gegenüber Allicin getestet und mit dem korrespondierenden Wildtyp BY4742 verglichen. $\Delta pde2$ ist deutlich und statistisch signifikant anfälliger als der Wildtyp, was darauf hindeutet, dass der Abbau von cAMP als Substrat der PDE2 für die Resistenz von Hefe gegenüber Allicin wichtig ist. Die Durchführung erfolgte wie unter 2.8.4.2 beschrieben. Der Versuch wurde zweimal wiederholt, die dargestellten Werte sind der Mittelwert aus acht Messwerten innerhalb eines Versuches. Der Test auf Signifikanz erfolgte mit einer One-way ANOVA (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks) Methode mit $p < 0,05$.

Im Gegensatz zur $\Delta ras2$ -Mutante, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte Resistenz aufwies, war die $\Delta pde2$ Mutante empfindlicher als der Wildtyp gegenüber Allicin in beiden getesteten Konzentrationen. PDE2, die den Abbau von cAMP katalysiert, ist für die Resistenz von Hefezellen gegenüber Allicin wichtig.

3.2.3.4 Proteinkinase A von Hefe ist ein zentraler Regulator der allicin-induzierten Apoptose in Hefe und induziert eine Phosphorylierungskaskade

Ausgehend von der Beobachtung, dass eine Beeinflussung des cAMP-Gehalts in Hefezellen durch genetische oder pharmakologische Ansätze eine Veränderung der Resistenz von Hefezellen gegenüber Allicin bedingt, wurde die Frage gestellt, ob die cAMP-aktivierte Protein-Kinase A ebenfalls bedeutsam ist für die Antwort von Hefezellen auf Allicin. Die PKA zeigt einen modularen Aufbau. Deshalb wurden die vier Untereinheiten der Proteinkinase A (TPK1-3 katalytische Untereinheiten; BCY1 regulatorische Untereinheit) sowohl im Hemmhoftest, im Droptest als auch in Wachstumskinetiken hinsichtlich ihrer Allicin-suszeptibilität untersucht.

Im Hemmhofstest wurde die allgemeine Resistenz der PKA Untereinheiten (im Hintergrund BY4743) gegen H_2O_2 und zwei unterschiedliche Konzentrationen Allicin (6,2 und 12,4 mM) bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 27 dargestellt.

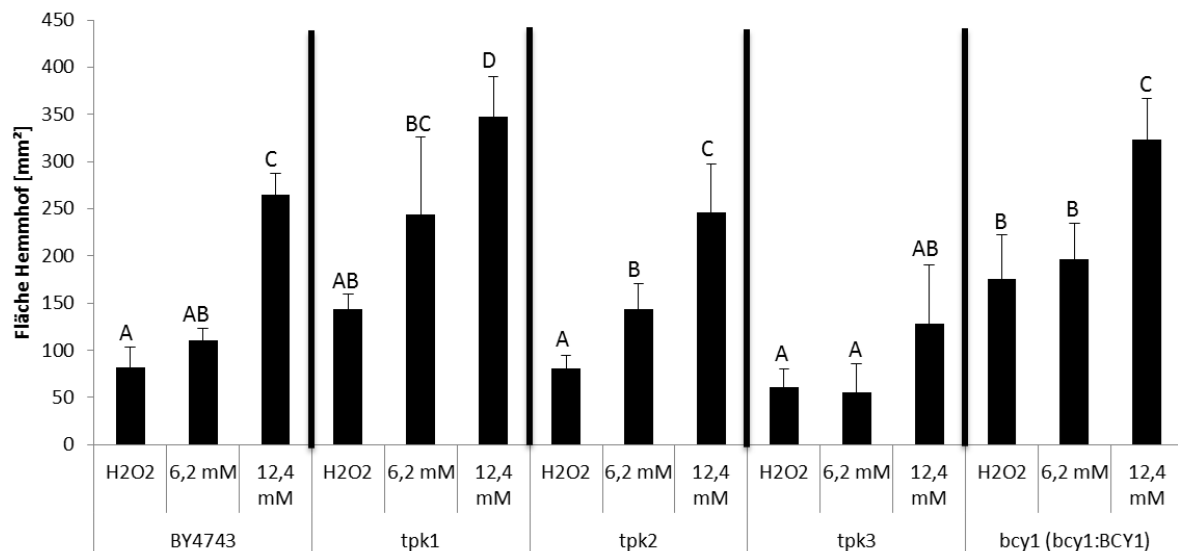


Abbildung 27: Hemmhofstest mit den unterschiedlichen PKA-Untereinheiten im Vergleich zum Wildtyp

Hefezellen wurden in CSM-Medium über Nacht kultiviert, am nächsten Tag mit Medium zu einer optischen Dichte von 1,0 verdünnt und entsprechend dem unter 2.8.4 beschriebenen Protokoll wurde der Hemmhofstest durchgeführt. Es zeigen sich Unterschiede zwischen den verschiedenen Untereinheiten der Protein-Kinase A: Die $\Delta tpk1$ Mutante ist erhöht anfällig gegenüber Allicin, während die $\Delta tpk3$ Mutante eine verstärkte Resistenz gegenüber Allicin aufweist. Die $\Delta tpk2$ Mutante zeigt keinen Unterschied zum Wildtyp. Die $\Delta bcy1$ Mutante ist signifikant susceptibler gegenüber H_2O_2 im Hemmhofstest, die Anfälligkeit gegenüber Allicin ist zu erkennen, allerdings für die gezeigten Daten nicht statistisch signifikant. Der Versuch wurde vier Mal mit vergleichbaren Resultaten wiederholt, die dargestellten Werte sind der Mittelwert aus acht Messwerten innerhalb eines Versuches. Der Test auf Signifikanz erfolgte mit einem One-way ANOVA unter Anwendung der Holm-Šidák Methode mit $p < 0,05$.

Die verschiedenen Mutanten in Untereinheiten der PKA verhielten sich im Vergleich zum Wildtyp unterschiedlich bei Exposition gegenüber Allicin und H_2O_2 . Während $\Delta tpk1$ signifikant mehr susceptibel gegenüber der Behandlung mit Allicin war und auch eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber H_2O_2 zeigte, verhielt sich $\Delta tpk2$ weitestgehend wie der Wildtyp. Die Mutante $\Delta tpk3$ hingegen zeigte eine erhöhte Resistenz gegenüber Allicin in diesem Assay, während die Resistenz gegenüber H_2O_2 in diesem Test nicht beeinflusst war. Im Gegensatz dazu war die Anfälligkeit von $\Delta bcy1$ gegen H_2O_2 signifikant erhöht, während der Unterschied bei Allicinexposition zum Wildtyp nicht markant war.

Für diese Versuche wurde ein heterozygoter Stamm der $\Delta bcy1$ Mutante verwendet, der einzig in der EUROSCARF Sammlung verfügbar war. Um zu testen, ob eine homozygote Mutante einen stärkeren Phänotyp aufweist, wurden zwei unabhängige Mutanten, LT21 (heterozygot) und LT22 (homozygot) auf ihre Anfälligkeit gegenüber Allicin hin getestet. Diese wurden dankenswerterweise von Ramon Gonzalez, Instituto de Fermentaciones Industriales, Madrid, Spanien zur Verfügung gestellt (Tabera et al., 2006).

Es zeigte sich, dass die homozygote $\Delta bcy1$ -Mutante LT22 eine deutlich erhöhte Anfälligkeit gegenüber Allicin und H_2O_2 aufwies. Allerdings war bei kürzerer Inkubationszeit die Wachstumsdichte dieser Mutante im Vergleich zu den übrigen Mutanten deutlich geringer, so dass ein solcher beobachteter Effekt zusätzlich auch auf einen Wachstumseffekt zurückzuführen sein könnte.

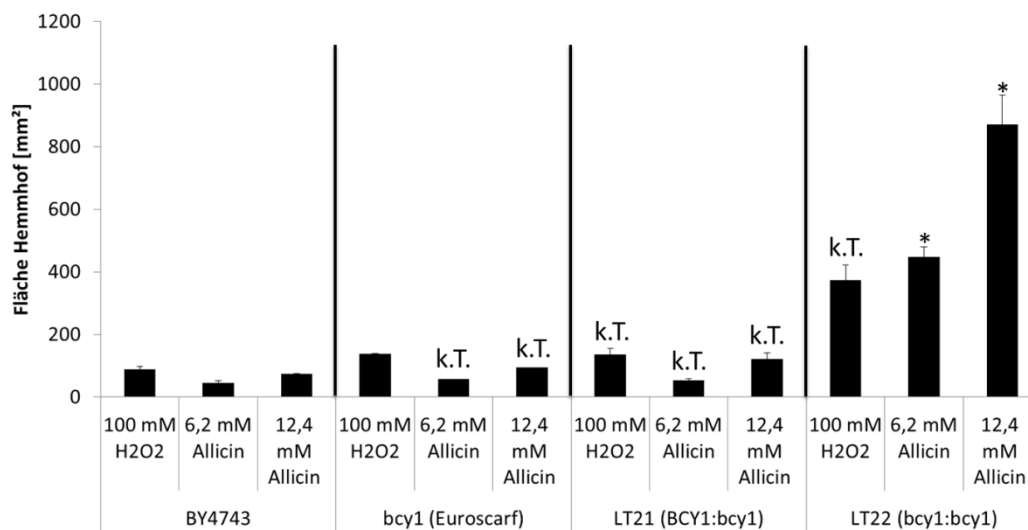


Abbildung 28: Hemmhof test mit den unterschiedlichen $\Delta bcy1$ Mutanten bei Behandlung mit H_2O_2 und Allicin

Hefezellen wurden in CSM-Medium über Nacht kultiviert und am nächsten Tag mit Medium zu einer optischen Dichte von 1,0 verdünnt bzw. im Falle von LT22 (homozygote Mutante des BCY1 Gens; (Tabera et al., 2006)) durch Zentrifugation konzentriert und entsprechend dem unter 2.8.4 beschriebenen Protokoll wird der Hemmhof test durchgeführt. Die EUROSCARF-Mutante ist gegenüber H_2O_2 erhöht anfällig. Die Mutante LT21 verhält sich entsprechend der EUROSCARF-Mutante, während die homozygote LT22-Mutante (*ibid.*) eine massiv erhöhte Anfälligkeit gegenüber Wasserstoffperoxid und Allicin aufweist.

* indiziert einen statistisch signifikanten Unterschied zum Wildtyp mit der entsprechenden Behandlung. Weil die Daten nicht normalverteilt sind, konnte nicht für alle Paare ein Test auf statistische Signifikanz durchgeführt werden. Entsprechende Fälle, in denen kein Test erfolgen konnte, sind mit k.T. markiert. Der Test auf statistische Signifikanz erfolgte mittels ANOVA, Turkey-Test (nach Reihenfolge) mit $p > 0,05$. Der Versuch wurde zweimal wiederholt, die dargestellten Werte sind der Mittelwert aus acht Messwerten innerhalb eines Versuches.

Um den Eindruck aus dem Hemmhof test in Bezug auf die konkrete Überlebensrate zu bestätigen, wurden Mutanten der PKA-Untereinheiten im Droptest auf ihre Vitalität untersucht. Entsprechend den vorangegangenen Experimenten wurden H_2O_2 und Allicin (in zwei Konzentrationen) getestet.

Es zeigte sich, dass sowohl H_2O_2 wie Allicin in den getesteten Konzentrationen die Überlebensrate des Wildtyps BY4743 verringerten. Es ist zu beachten, dass die hier eingesetzten Konzentrationen für

H₂O₂ höher waren als bei Experimenten, die mit Hefestämmen im Hintergrund BY4742 durchgeführt worden sind. Es zeigte sich, dass die Überlebensrate bei den eingesetzten Konzentrationen deutlich reduziert worden ist; die Resultate sind in Abbildung 29 dargestellt.

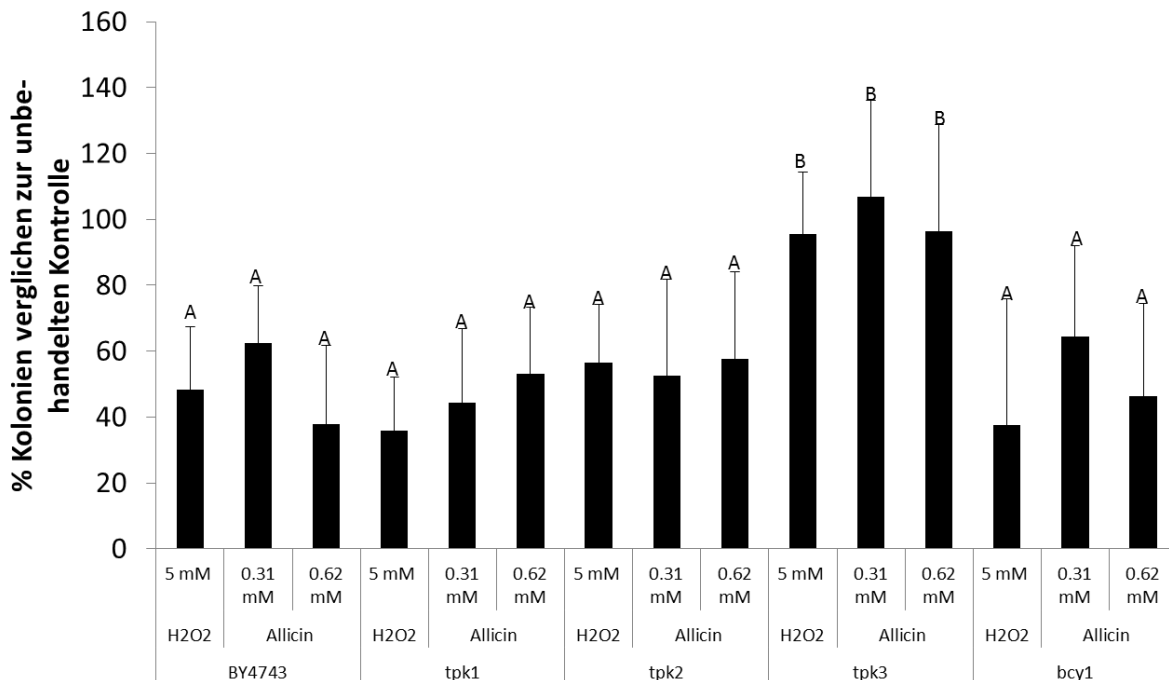


Abbildung 29: Droptest von allen Protein-Kinase A Untereinheiten 16 h nach Behandlung mit 5 mM H₂O₂ oder 0,31 bzw. 0,62 mM Allicin

Hefezellen wurden in CSM-Medium bis zu einer OD₆₀₀ = 1 in Schüttelkultur angezogen, dann auf Kulturrohrchen verteilt und mit H₂O₂ bzw. Allicin bis zu den angegebenen finalen Konzentrationen behandelt. Nach 16 Stunden wurden die Kulturen verdünnt und ausplattiert auf YPD-Medium. Nach weiteren 24 Stunden wurde die 1:10⁶ Verdünnung ausgezählt. Es zeigt sich, dass Allicin in deutlich geringeren Konzentrationen als H₂O₂ die Zahl lebender Zellen verringert. In diesem Test verhalten sich die *Δtpk1*, *Δtpk2* sowie die *Δbcy1* Mutante weitestgehend wie der Wildtyp, während sich die *tpk3* Mutante als signifikant resistenter im Vergleich zu den übrigen Mutanten erweist. Der Test auf Signifikanz erfolgte mit einem One-way ANOVA unter Anwendung der Holm-Šidák Methode mit p<0,05. Dieser Versuch wurde viermal wiederholt mit vergleichbaren Resultaten; die dargestellten Werte sind der Mittelwert aus acht Einzelmesswerten innerhalb eines Versuches.

Sowohl H₂O₂ wie auch Allicin in beiden getesteten Konzentrationen reduzierten die Überlebensrate der Hefezellen in Wildtyp-Zellen deutlich. Dabei war auffällig, dass die Wirkung der eingesetzten 5 mM Konzentration von H₂O₂ vergleichbar war mit der der 0,31 mM Konzentration von Allicin; das zeigte, dass Allicin deutlich toxischer für Hefezellen ist als das ebenfalls aufgrund seiner Redoxaktivität wirksame Wasserstoffperoxid. Die höhere der beiden eingesetzten Allicin-Konzentrationen (0,62 mM) zeigte eine stärkere Toxizität auf die Hefezellen, die aber nicht statistisch signifikant war.

Sowohl *Δtpk1* als auch *Δtpk2* zeigten in diesem Assay keine Unterschiede zum Wildtyp, wobei auffällig war, dass sowohl in *Δtpk1* als auch in *Δtpk2* die im Wildtyp beobachtete und auch zu

erwartende verringerte Überlebensrate bei einer Erhöhung der Toxizität ausblieb. Die Überlebensraten in beiden Mutanten unterschieden sich bei Behandlung mit 0,31 und 0,62 mM Allicin nicht.

Im Gegensatz dazu wies $\Delta tpk3$ eine signifikant erhöhte Überlebensrate im Vergleich zum Wildtyp auf. Sowohl Wasserstoffperoxid wie auch Allicin verringerten die Lebensrate dieser Mutante nur marginal, im Gegensatz zu den übrigen getesteten Mutanten und zum Wildtyp.

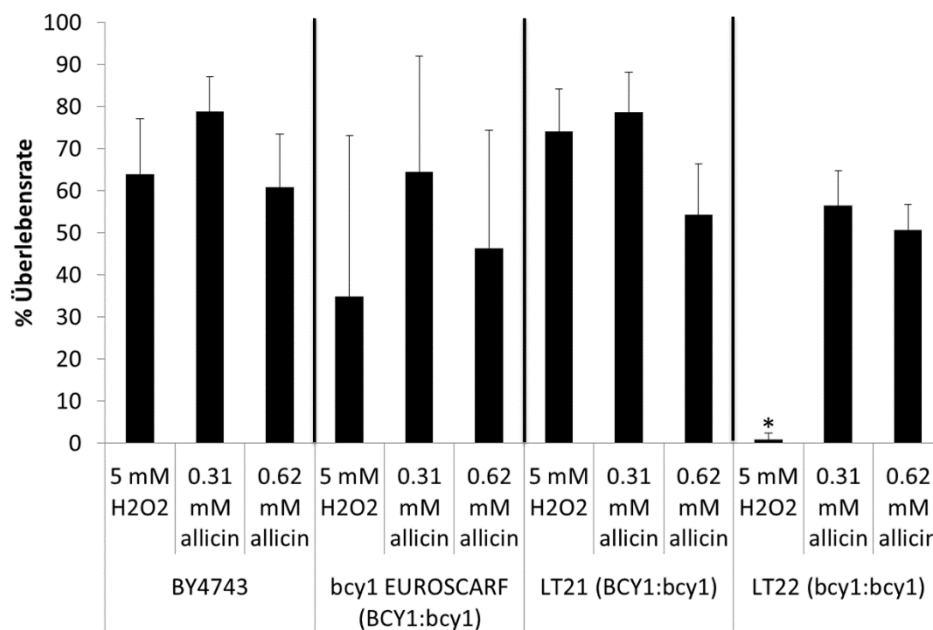


Abbildung 30: Droptest von den unterschiedlichen zur Verfügung stehenden $\Delta bcy1$ Mutanten mit 5 mM H₂O₂ oder 0,31 bzw. 0,62 mM Allicin

Hefezellen wurden in CSM-Medium bis zu einer OD₆₀₀ = 1 in Schüttelkultur angezogen und dann auf Kulturröhrchen verteilt und mit H₂O₂ bzw. Allicin bis zu den angegebenen finalen Konzentrationen behandelt. Zwischen den verschiedenen $\Delta bcy1$ Mutanten besteht, mit Ausnahme der Behandlung des LT22 Stammes mit H₂O₂, kein signifikanter Unterschied. Der homozygote LT22-Stamm ist bezüglich des Zelltods hypersensitiv gegenüber Wasserstoffperoxid. Der Test auf statistische Signifikanz erfolgte mittels ANOVA, Dunn-Test (nach Reihenfolge) mit $p < 0,05$. Der Versuch wurde zweimal wiederholt. Die dargestellten Werte stellen den Mittelwert aus acht Einzelmesswerten innerhalb eines Versuches dar.

Wachstumskinetik nach Allicin-Behandlung

Der Hemmhoftest beruht als Test für die Resistenz auf dem Umstand, dass Zellen in ihrer Überlebensrate beeinflusst werden oder in ihrer Vermehrung. Der Droptest überprüft ausschließlich die Überlebensrate. Um zu testen, ob die Proteinkinase A neben ihrer Funktion bei der Zelltodinduktion durch Allicin auch bei der Regulation der Zellproliferation eine Rolle spielt, wurde die Kinetik des Wachstums aufgenommen, bei der in einer Mikrotiterplatte Hefezellen über einen Zeitraum von 12 Stunden inkubiert wurden. Dabei diente eine Probe, die unbehandelt war, als Negativkontrolle, die Zugabe von H₂O₂ in einer finalen Konzentration von 1 mM diente als

Positivkontrolle für die Auswirkung redoxaktiver Substanzen auf die Proliferation von Hefezellen. Die Durchführung dieses Experimentes ist gezeigt unter Punkt 2.8.6.

Es zeigte sich für den Wildtyp, dass Allicin konzentrationsabhängig die Proliferation der Hefezellen inhibierte, was an der verlangsamten Zunahme der optischen Dichte abgelesen werden kann (vgl. Abbildung 31). Die eingesetzten Konzentrationen unter den Versuchsbedingungen verringerten die Zunahme des Wachstums der Wildtyp-Hefekultur, inhibierten es aber nicht vollständig. Die Steigung, mit der bei Allicinbehandlung der Graph der optischen Dichte mit der Zeit stieg, war bei Allicin-behandelten Proben konzentrationsabhängig geringer als bei der unbehandelten Kontrolle.

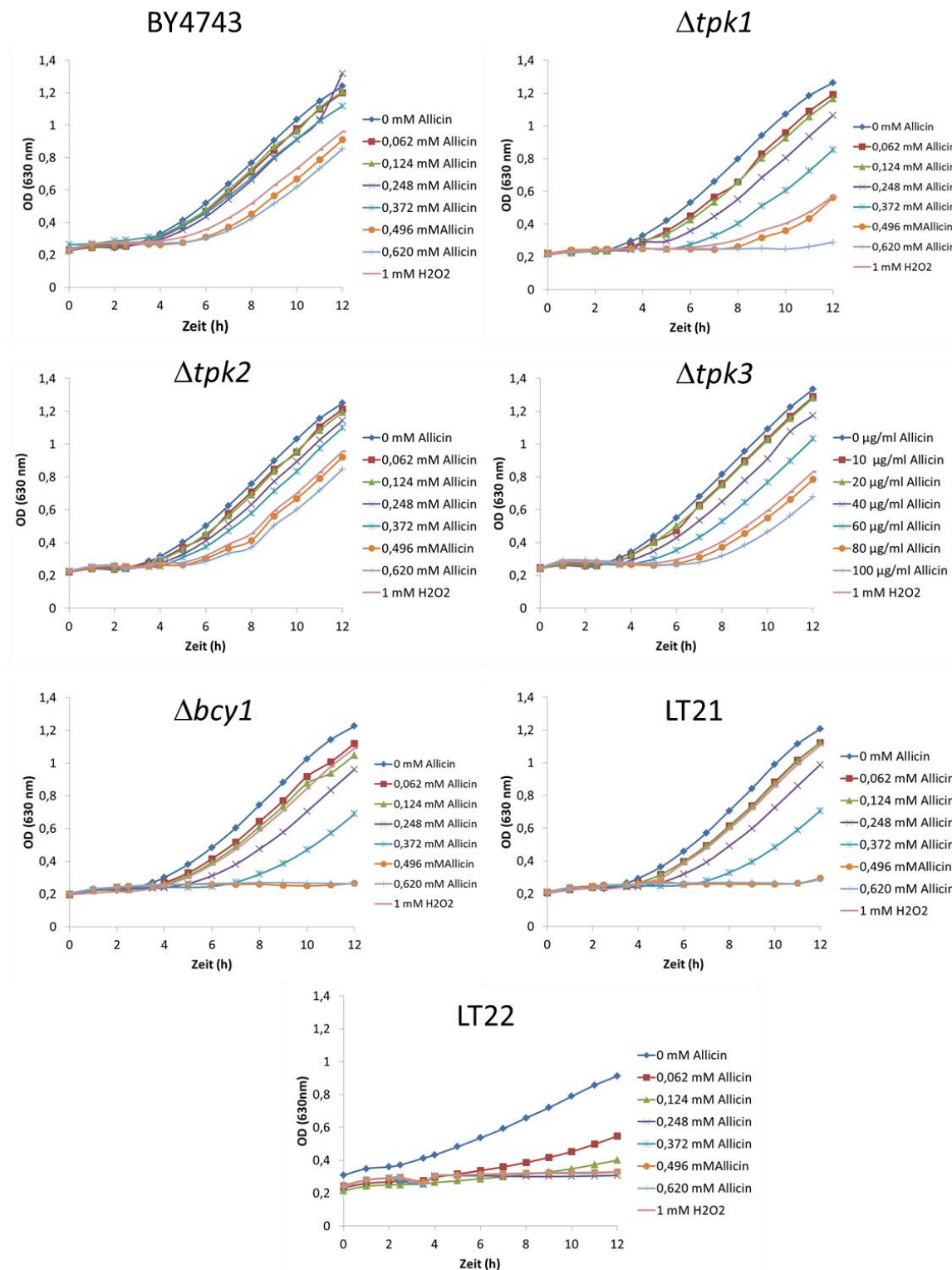


Abbildung 31: Wachstumskinetik der unterschiedlichen PKA-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp nach Behandlung mit Allicin und H_2O_2 als Positivkontrolle

Die Wachstumskinetiken wurden in 96-well Platten unter Schütteln der Kulturen in einem Gesamtvolumen von 1 mL aufgenommen. Die genauen experimentellen Details sind 2.8.6. zu entnehmen. Pro Behandlung wurden je drei unabhängige Proben auf der Platte gemessen, so dass die gezeigten Datenpunkte Mittelwerte aus den drei gemessenen Proben darstellen. Dieser Versuch wurde dreimal wiederholt mit vergleichbaren Resultaten.

Nach etwa drei Stunden setzte die Zunahme ein. Auch Wasserstoffperoxid verlangsamte die Zellproliferation von Wildtyp-Zellen, wobei die Wirkung der eingesetzten 1 mM H₂O₂ etwa der Wirkung einer Allicinkonzentration von 0,5 mM Allicin entsprach, so dass man schließen könnte, dass Allicin bezüglich der Zellproliferations-inhibition etwa doppelt so aktiv ist im Vergleich zu H₂O₂.

Verglich man die $\Delta tpk1$ Mutante mit dem Wildtyp, so zeigte sich zunächst, dass sich die unbehandelte Kontrolle der Mutante nicht von der des Wildtyps unterscheidet. Auch bei $\Delta tpk1$ führte die Allicinexposition dosisabhängig zu einer Inhibierung der Zellproliferation. Im Gegensatz zum Wildtyp inhibierte die höchste der getesteten Konzentrationen (0,62 mM) das Wachstum dieses Hefestammes komplett. $\Delta tpk1$ war also susceptibler für die Behandlung mit Allicin. Auch bei der Exposition gegen H₂O₂ war die $\Delta tpk1$ Mutante im Vergleich zum Wildtyp susceptibler hinsichtlich der Proliferation.

Im Unterschied dazu zeigten $\Delta tpk2$ und $\Delta tpk3$ in diesem Assay keinen deutlichen Unterschied zum Wildtyp.

Die regulatorische Untereinheit $\Delta bcy1$ (EUROSCARF) zeigte wiederum eine im Vergleich zu $\Delta tpk1$ erhöhte Suszeptibilität; die beiden höchsten der getesteten Konzentrationen inhibierten das Wachstum dieses Hefestammes komplett.

Der ebenfalls heterozygote Stamm LT21 unterschied sich vom Verhalten des $\Delta bcy1$ -Stammes von EUROSCARF nicht. Ein deutlicher Unterschied war aber beim homozygoten Hefestamm LT22 zu finden. Bereits die nicht-behandelte Kontrolle zeigte eine geringere Zunahme in der optischen Dichte im Vergleich zum Wildtyp BY4743. Einzig bei einer Behandlung mit der niedrigsten der getesteten Konzentrationen (0,062 mM) ist bei LT22 noch deutliches Wachstum zu beobachten; alle weiteren getesteten Konzentrationen, einschließlich der Behandlung mit H₂O₂, inhibierten das Wachstum des Hefestammes LT22 komplett.

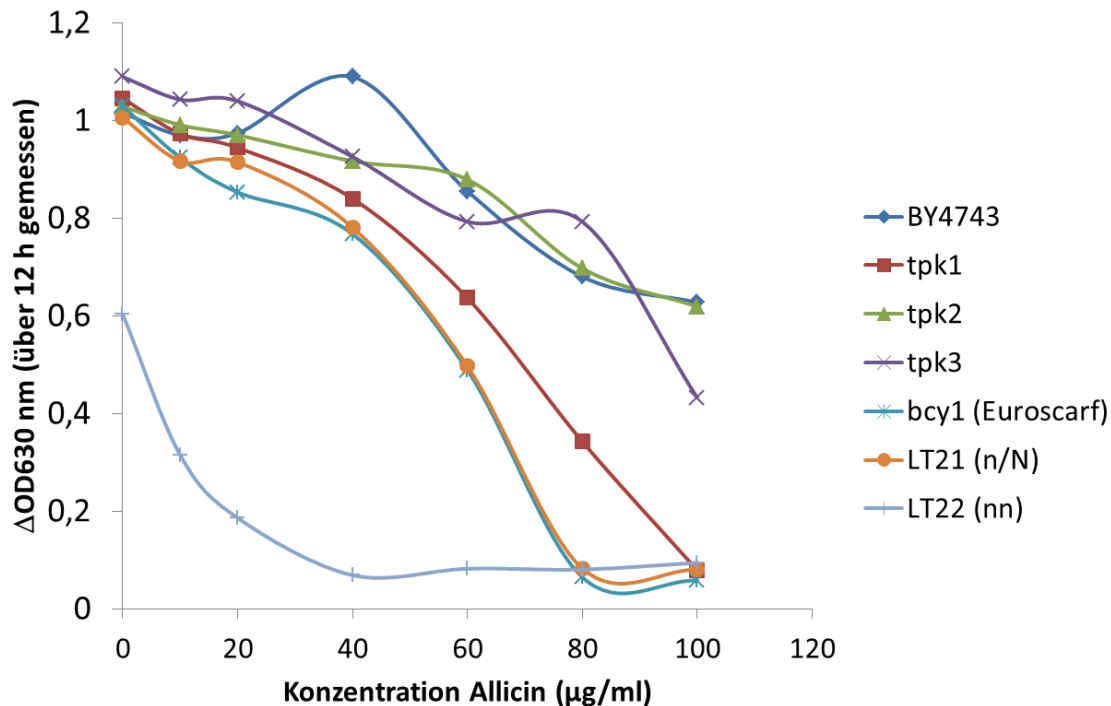


Abbildung 32: Vergleich des Nettowachstums der unterschiedlichen Hefekulturen in Abhängigkeit von der Allicin-exposition

Die Zunahme der optischen Dichte nach 12 Stunden wurde für die verschiedenen Hefestämme in Abhängigkeit von der Menge an eingesetztem Allicin dargestellt. Es zeigen sich für die Hefestämme unterschiedliche Tendenzen: Während BY4743, $\Delta tpk2$ und $\Delta tpk3$ sich weitestgehend gleich verhalten, ist die Inhibition des Wachstums bei $\Delta tpk1$ stärker; ein noch stärkerer Effekt zeigt sich bei den heterozygoten $\Delta bcy1$ Mutanten von EUROSCARF und LT21; hiermit ist bestätigt, dass auch die heterozygote Mutante einen Phänotyp aufweist.

Im Vergleich dazu war der Phänotyp der homozygoten Linie LT22 noch deutlicher. Die Zunahme des Wachstums ist bereits in der unbehandelten Kontrolle geringer als beim Wildtyp; die Inhibition des Wachstums ist deutlich stärker als bei allen anderen getesteten Mutanten.

Die Darstellung in Abbildung 32, bei der die Zunahme der optischen Dichte als Maß für das Wachstum der Kultur in Abhängigkeit von der Allicinkonzentration gezeigt wurde, fasst die Ergebnisse der Einzelgrafiken von Abbildung 31 zusammen. Mit Ausnahme des Hefestammes LT22 zeigten alle getesteten Hefestämme bei der unbehandelten Kontrolle ($=0 \text{ mg mL}^{-1}$ Allicin) eine vergleichbare Zunahme der optischen Dichte über eine Wachstumsperiode von 12 Stunden. LT22 wies bereits bei der unbehandelten Kontrolle eine deutlich geringere Zunahme der optischen Dichte auf.

Es konnten insgesamt verschiedene Tendenzen beobachtet werden: Während sich der Wildtyp, $\Delta tpk2$ und $\Delta tpk3$ mit Ausnahme kleinerer Abweichungen nicht voneinander unterscheiden hinsichtlich der Inhibition der Zellproliferation durch Allicin, war die Verringerung des Wachstums durch Allicin bei $\Delta tpk1$ stärker ausgeprägt und setzte bereits bei geringeren Konzentrationen ein.

Die beiden unabhängigen heterozygoten Mutanten von *BCY1* ($\Delta bcy1$ und LT21) zeigten einen ähnlichen Effekt in deutlich verstärkter Form; bereits geringere Konzentrationen inhibierten das Wachstum der *bcy1* Mutanten stärker als es der Fall beim Wildtyp war. Es ließ sich also feststellen, dass auch heterozygote Mutanten im *BCY1* Gen, wie $\Delta bcy1$ und LT21, einen Phänotyp aufweisen, der darin besteht, dass Allicin die Proliferation stärker hemmt als beim Wildtyp (Abbildung 32).

Die homozygote *bcy1*-Mutante (LT22) zeigte eine weitere Verstärkung des Phänotyps, der im Gegensatz zur heterozygoten Mutante, aber auch für die unbehandelte Kontrolle zutrifft. Das Nettowachstum der unbehandelten Kultur war mit einer Zunahme von 0,6 OD₆₃₀ (im Gegensatz zu ~1,1 OD₆₃₀ beim Wildtyp) deutlich geringer. Die Inhibition der Zellproliferation war bei LT22 deutlich stärker als bei allen übrigen getesteten Hefestämmen. Bereits eine Konzentration 0,248 mM Allicin führte zu einer vollständigen Inhibition der Zellproliferation.

Entsprechend dieser Befunde für Allicin wurde auch der Einfluss von H₂O₂ auf die Zellproliferation verglichen. Weil nur eine Konzentration H₂O₂ getestet worden ist, ist diese Darstellung keine Konzentrationsabhängigkeit, sondern ein Mittelwert für die Messwerte dieser einen Konzentration.

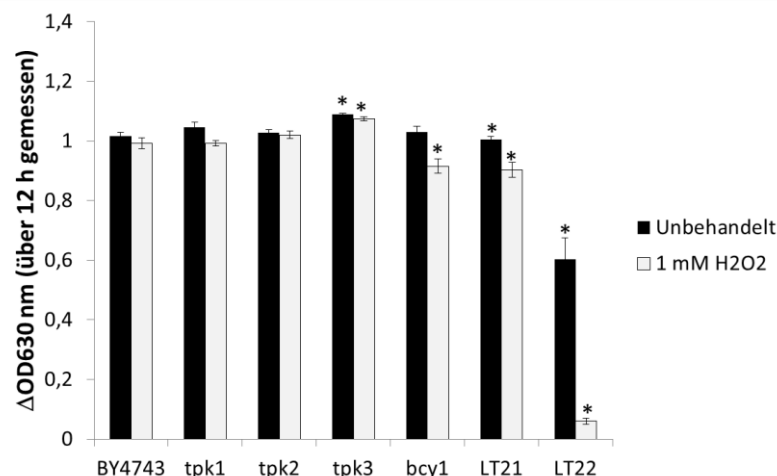


Abbildung 33: Vergleich des Nettowachstums der unterschiedlichen Hefekulturen nach Behandlung mit H₂O₂

Während der Wildtyp und die Untereinheiten $\Delta tpk1-3$ nicht oder nur marginal durch H₂O₂ in ihrem Wachstum inhibiert werden, führt eine Behandlung mit 1 mM H₂O₂ bei den Mutanten im *BCY1* Gen (EUROSCARF *bcy1*, LT21, LT22) zu einer deutlichen Inhibition des Wachstums. Während $\Delta bcy1$ (EUROSCARF) und LT21 zwar deutlich inhibiert werden, ist der Effekt bei der homozygoten Mutante LT22 dramatisch, indem das Wachstum dieser Mutante durch H₂O₂ beinahe vollständig inhibiert wird. * indiziert einen statistisch signifikanten Unterschied der Mutante zum Wildtyp der entsprechenden Behandlung. Die Testung auf statistisch signifikante Abweichungen erfolgte mit ANOVA (Holm-Šidák-Methode), $p < 0,05$.

Die Wirkung von H₂O₂ auf das Wachstum der unterschiedlichen Hefestämme unterschied sich vom Verhalten gegenüber Allicin. Während der Wildtyp sowie alle drei katalytischen Untereinheiten nicht oder nur geringfügig durch H₂O₂ in ihrem Wachstum inhibiert wurden, war der Unterschied bei den

Mutanten im *BCY1* Gen deutlich. Eine homozygote $\Delta bcy1$ Mutante LT22 wurde durch H_2O_2 nahezu vollständig in ihrer Proliferation inhibiert. *BCY1* reagiert somit auf H_2O_2 anders als es die anderen Untereinheiten zeigten.

3.2.3.5 Bedeutung Reaktiver Spezies für die Toxizität des Allicins

Ein bedeutender Faktor in vielen Zelltod-Signalwegen ist die Akkumulation von Reaktiven Sauerstoff-Spezies. Die vorangegangenen Experimente zeigten eine unterschiedliche Sensitivität der getesteten Hefestämme auf H_2O_2 als typischen Vertreter von ROS. Folglich wurde nachfolgend untersucht, ob Allicin die Akkumulation von ROS induziert und inwieweit diese ggf. für die physiologische Wirkung des Allicins bedeutsam sind. Die Akkumulation von ROS wurde mittels DCFDA und Lucigenin getestet. Letzteres ist zwar in Säugetierzellen gebräuchlich, musste aber für das Hefesystem zunächst etabliert werden.

Der DCFDA (Dichlorofluorescein-Diacetat) Test, dessen experimentelle Details unter Punkt 2.10.2.1 beschrieben sind, ist ein schneller und einfacher Test, der es erlaubt, mittels der Zunahme von Fluoreszenz auf die Anwesenheit von reaktiven Spezies zu schließen. Dabei ist jedoch dieser Test nicht spezifisch für Reaktive Sauerstoffspezies wie Superoxid oder H_2O_2 , sondern spricht generell auf reaktive Spezies an.

Aufgrund des Umstandes, dass in den vorangegangenen Tests nur $\Delta bcy1$ und $\Delta tpk3$ Unterschiede zum Wildtyp aufwiesen, wurden in den folgenden, physiologischen Untersuchungen nur noch diese beiden Untereinheiten in die Versuche miteinbezogen. Zunächst wurden zur Klärung der Frage, ob ROS bei der Wirkung von Allicin bedeutsam sind, die drei Hefestämme BY4743, $\Delta tpk3$ und $\Delta bcy1$ für drei Stunden mit Allicin behandelt, dann mit DCFDA gefärbt und nach 15 Minuten in je drei Sichtfeldern die Anzahl der fluoreszierenden und der nicht-fluoreszierenden Zellen bestimmt, so dass der Anteil der fluoreszierenden Zellen als Maß für die Bildung von Reaktiven Spezies angenommen werden konnte (Abbildung 34).

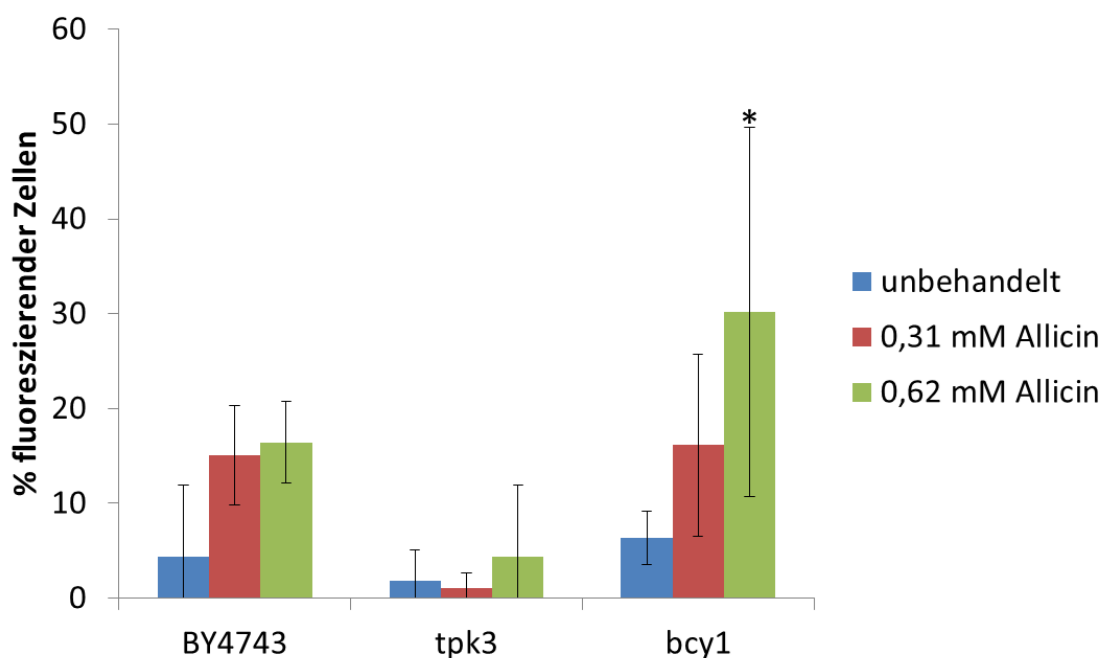


Abbildung 34: Akkumulation von Reaktiven Sauerstoffspezies 3 Stunden nach Allicin-Behandlung

Hefezellen des Wildtyps und der $\Delta tpk3$ und $\Delta bcy1$ Mutante wurden in YPD Medium angezogen und mit Allicin (0,32 mM und 0,62 mM) behandelt; nach drei Stunden wurden die Zellen mit DCFDA einer Konzentration 10mM für 15 Minuten inkubiert und dann fluoreszenzmikroskopisch die Zahl der Zellen mit positivem Fluoreszenzsignal ausgewertet (vgl. Punkt 2.10.2.1). Nur die Behandlung der $\Delta bcy1$ Mutante mit 0,62 mM Allicin zeigt einen statistischen Unterschied zur unbehandelten Kontrolle des $\Delta bcy1$ Stammes. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus 4 Sichtfeldern mit jeweils mindestens 100 Zellen. Der Versuch wurde zweimal wiederholt. * zeigen einen statistisch signifikanten Unterschied zur unbehandelten Kontrolle des jeweiligen Hefestammes an (t-Test, $p < 0,05$).

Die unbehandelte Wildtypkontrolle zeigte eine geringe Rate fluoreszierender Zellen (etwa 7%). Eine Behandlung mit Allicin führte zu einer klaren Zunahme an fluoreszierenden Zellen auf etwa 15 %, die jedoch aufgrund der hohen Standardabweichung nicht als statistisch signifikant angesehen werden konnte.

Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der $\Delta tpk3$ Mutante, dass in der unbehandelten Kontrolle die Anzahl fluoreszierender Zellen etwa der des Wildtyps entsprach, aber keine Zunahme der Rate fluoreszierender Zellen nach Behandlung mit Allicin zu beobachten war.

Die $\Delta bcy1$ Mutante wies ebenfalls bei der unbehandelten Kontrollprobe keine erhöhte Anzahl fluoreszierender Zellen im Vergleich zum Wildtyp bei entsprechender Behandlung auf. Eine Behandlung mit Allicin jedoch führte konzentrationsabhängig zu einer deutlichen Erhöhung der Anzahl fluoreszierender Zellen, wenngleich hier die Varianzen zwischen den unterschiedlichen Sichtfeldern groß war, was sich in einer hohen Standardabweichung in der quantitativen Darstellung widerspiegelt.

Es musste ausgeschlossen werden, dass Allicin selbst- als reaktive Spezies – durch eine Reaktion mit DCFDA die Fluoreszenz induziert. Deshalb wurde eine 10 mM DCFDA-Lösung mit Allicin (in einer finalen Konzentration von 6,2 mM) gemischt und die Fluoreszenz des DCFDA bei 495 nm Excitation und 530 nm Emission im Fluorometer gemessen. Allicin erhöhte die Fluoreszenz des DCFDAs im Vergleich zu einer mit Wasser versetzten Kontrollprobe nicht.

Als alternativen Assay, der darüber hinaus geeignet ist, kinetische Experimente durchzuführen, wurde die ROS Akkumulation mit Lucigenin verfolgt; diese Methode gilt als spezifisch für ROS und beruht auf dem Prinzip, dass nach der Reaktion mit reaktiven Spezies Photonen emittiert werden, die in einem Luminometer gemessen werden.

Diese Methode ist in pflanzlichen und tierischen Systemen gut etabliert, jedoch für die Verwendung in Hefe bislang eher ungebräuchlich. Deshalb wurde der Assay zunächst etabliert mit Substanzen, die bekannt dafür sind, dass sie in der Lage sind, die ROS-Bildung in Zellen zu induzieren; dazu wurde Naphthochinon verwendet (Abbildung 35).

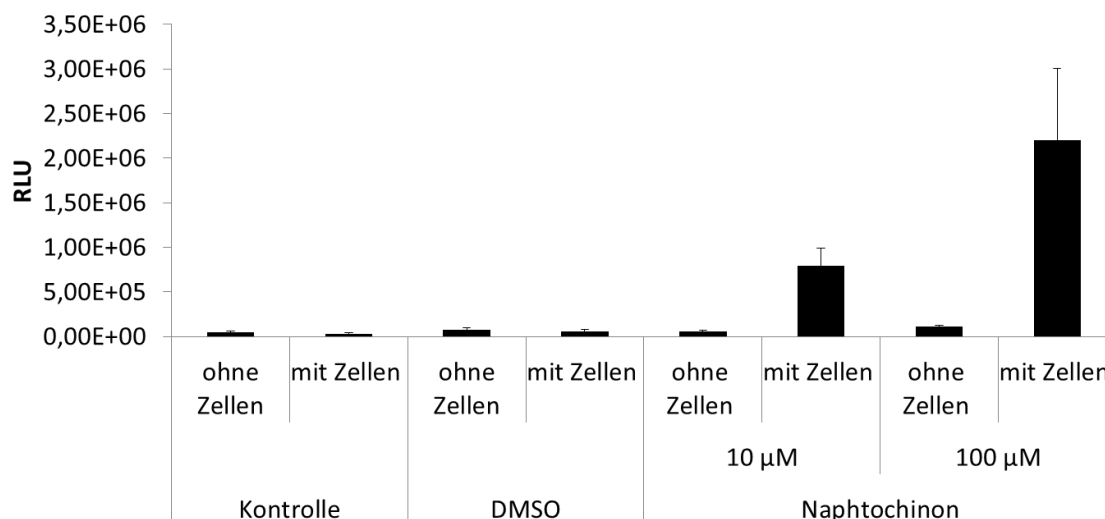


Abbildung 35: Etablierung der ROS-Messung mittels Lucigenin, indem den Zellen Naphthochinon als Superoxid-formierendes Agens zugesetzt wurde

Naphthochinon induziert die Bildung von ROS in Hefezellen, was mit Lucigenin verfolgt wird. Hefezellen des Wildtypstammes BY4742 wurden auf eine OD_{600} von 1 eingestellt und für 16 h mit Naphthochinon behandelt, bevor 100 µL der Kultur mit 100 µL Lucigenin (in DMSO, 50 µM) versetzt wurden und die Photonenemission im Luminometer (über einen Zeitraum von 10 Sekunden) gemessen wurde. Jeder Messwert entspricht dem Durchschnitt aus drei unabhängigen Messungen. Proben ohne Zellen waren Medium ohne Hefezellen mit entsprechender Behandlung. Nähere Details zur Durchführung des Lucigenin-Assays sind unter 2.10.3 beschrieben. Die dargestellten Werte entsprechen dem Mittelwert aus drei Messungen.

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Methode auch für Hefe geeignet ist, die Bildung Reaktiver Sauerstoffspezies zu verfolgen. Unbehandelte Zellen zeigten eine geringe Emission von Photonen; sie entsprach etwa der Antwort von Medium ohne Zellen. Eine Behandlung mit DMSO führte weder bei der Probe, die Zellen enthält, noch bei der zellfreien Probe zu einer Erhöhung über das Level der unbehandelten Kontrolle. Die Behandlung mit Naphthochinon führte in den Proben, die Zellen enthielten, zu einer deutlichen Akkumulation von ROS in einer konzentrationsabhängigen Weise.

Dieses Testverfahren wurde nunmehr angewendet, um herauszufinden, ob Allicin in der Lage ist, die Bildung von ROS in Zellen zu induzieren. Dazu wurde in einer kinetischen Messung über 5 Stunden die Emission von Lichtquanten nach Allicinbehandlung verfolgt, um die Daten der DCFDA Färbung, die nach 3 Stunden ausgewertet wurde, zu rekapitulieren. Die Resultate sind in Abbildung 36 dargestellt.

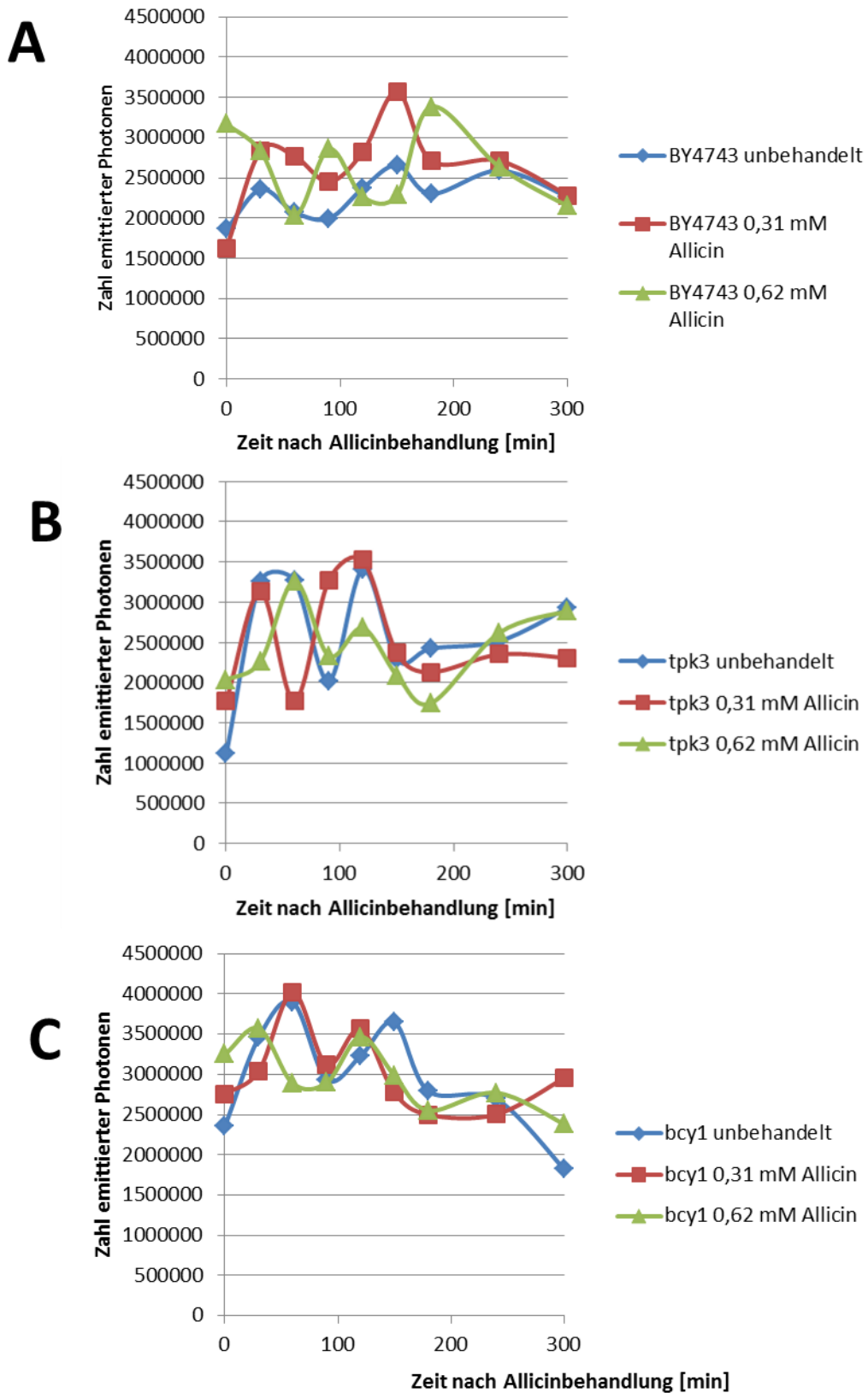


Abbildung 36: Kinetik der ROS-Akkumulation nach Allicinbehandlung im Lucigenin-Assay

Alle getesteten Genotypen (BY4742, $\Delta tpk3$, $\Delta bcy1$) zeigen über einen Zeitraum von 300 Minuten in der unbehandelten Kontrolle und nach Behandlung mit Allicin in den getesteten Konzentrationen (0,31 und 0,62 mM) keinen Unterschied hinsichtlich der Akkumulation Reaktiver Sauerstoffspezies. Mit diesem Assay kann keine Akkumulation von ROS nachgewiesen werden. Nähere Details zur Durchführung des Lucigenin-Assays sind in Kapitel 2.10.2.2. aufgeführt. Die Messpunkte entsprechen dem Punkt aus drei unabhängigen Messungen innerhalb eines Versuches. Der Versuch wurde zweimal wiederholt.

Weil die Resultate der DCFDA- und Lucigenin-messung kein einheitliches Bild ergaben, sollte unter Zuhilfenahme von Mutanten getestet werden, ob ROS für die Wirkung von Allicin von Bedeutung sind. Dazu wurden Mutanten, die in der ROS-Detoxifizierung, entweder von H_2O_2 oder O_2^- , bedeutsam sind (cytosolische Catalase, CTT1; cytosolische Superoxid-Dismutase, SOD1; mitochondriale Superoxid-Dismutase, SOD2) hinsichtlich einer veränderten Allicinresistenz gegenüber dem Wildtyp getestet. Im Falle, dass die Allicin-Wirkung trotzdem auf ROS beruht, sollten Mutanten, die an der Detoxifizierung von ROS beteiligt sind, in diesem Falle eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber Allicin aufweisen und würden zugleich auf eine biologische Signifikanz der ROS hinweisen. Die Resultate dieses Versuches sind in Abbildung 37 gezeigt.

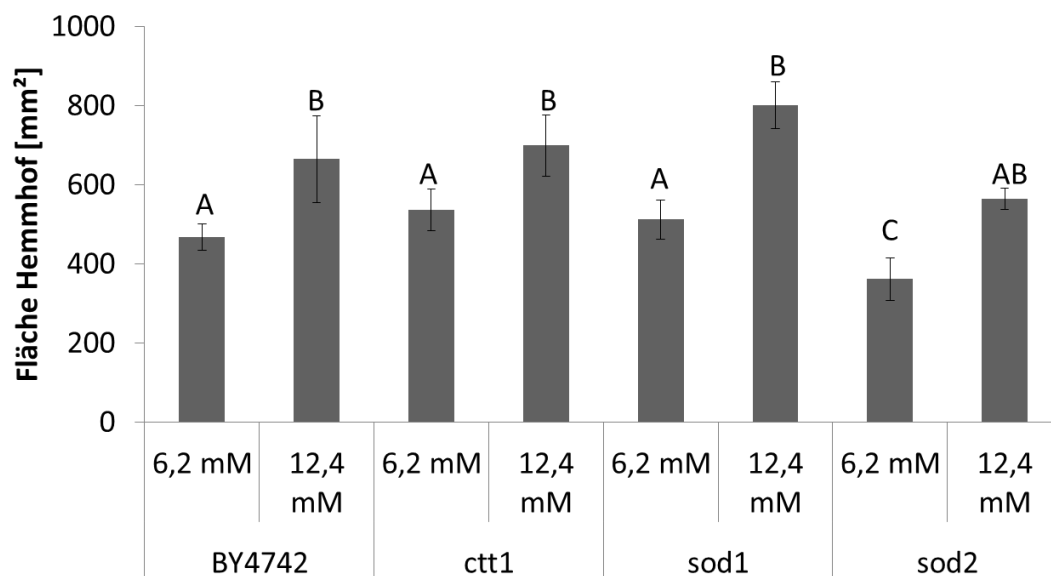


Abbildung 37: Empfindlichkeit von Mutanten, die im ROS-Metabolismus beeinflusst sind, gegenüber Allicin

Allicin wirkt auf Wildtypzellen in diesem Assay, vergleichbar zu den vorangegangenen Versuchen, in einer konzentrationsabhängigen Weise. Während die Mutanten in der cytosolischen Catalase ($\Delta ctt1$) keinen Unterschied zum Wildtyp aufweisen, Mutanten der cytosolischen Kupfer-Zink Superoxid-Dismutase nur bei der höheren Konzentration eine tendenziell größere Fläche des Hemmhofs zeigen, die jedoch nicht statistisch signifikant unterschiedlich war zum Wildtyp oder der $\Delta ctt1$ Mutante bei der entsprechenden Konzentration, sind die Hemmhoflächen der Mutante der mitochondrialen Mangan-Superoxid-Dismutase $\Delta sod2$ statistisch kleiner als beim Wildtyp, was eine erhöhte Resistenz dieser Mutante gegenüber Allicin nahelegen würde. Der Hemmhofstest wurde durchgeführt wie in Kapitel 2.8.4.2 beschrieben. Die Testung auf statistisch signifikante Abweichungen erfolgt mit ANOVA (Holm-Šidák-Methode), $p < 0,05$. Der Versuch wurde zweimal wiederholt. Die dargestellten Werte stellen den Mittelwert aus acht Einzelmesswerten innerhalb eines Versuches dar.

Es zeigte sich, dass die Mutationen in der ROS-Detoxifizierung keine erhöhte Suszeptibilität gegenüber Allicin bedingen; sowohl die Beeinflussung der Entgiftung von H_2O_2 (im Falle der $\Delta ctt1$ -Mutante) als auch der Superoxid-Detoxifizierung (durch den Knockout in den Superoxid-Dismutase Genen in den Mutanten $\Delta sod1$ und $\Delta sod2$) führte nicht zu einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber Allicin. Im Gegenteil zeigte die $\Delta sod2$ -Mutante eine Tendenz zu erhöhter Resistenz gegenüber Allicin im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp (Abbildung 37). Dieser Test zeigte somit, dass ROS offenbar für die Toxizität von Allicin nicht von zentraler Bedeutung sind.

3.2.3.6 Die Bedeutung der Protein-Kinase A für die Apoptose in Hefe steht in Verbindung mit AIF1.

Der Apoptose-Induzierende Faktor (AIF1) ist für die Induktion von Zelltod durch Allicin notwendig, was durch den Umstand belegt ist, dass eine $\Delta aif1$ Mutante deutlich resistenter gegenüber Allicin ist als der Wildtyp. Deshalb lag die Frage nahe, ob die Aktivität des AIF1 mit der Protein-Kinase A korreliert ist.

Die Lokalisation von AIF1 bedingt die Funktion des Proteins. In nicht-apoptotischen Zellen findet sich das Protein in den Mitochondrien, während im Zuge der Induktion der Apoptose das AIF1 Protein in den Zellkern transloziert wird. Dieser Prozess kann durch ein AIF-GFP Fusionsprotein verfolgt werden. In diesem Versuch sollten die zwei Fragen beantwortet werden, ob die Applikation von Allicin zu einer, für die Apoptoseinduktion *via* AIF typischen, Translokation des AIF1 Proteins in den Zellkern kommt, zum anderen, ob diese Verschiebung des Proteins abhängig ist von der Aktivität der Protein-Kinase A, die als den Zelltod regulierend identifiziert wurde.

Es wurde ein AIF-GFP exprimierendes Plasmid unter Kontrolle des Methioninmangel-induzierbaren Promoters *Met25* (dankenswerterweise zur Verfügung gestellt von Prof. Frank Madeo, Universität Graz, Österreich) in Wildtypzellen (BY4743) sowie den PKA-Mutanten $\Delta tpk3$ und $\Delta bcy1$ transformiert.

Nach Induktion der Expression in methioninfreiem Medium (CSM-Met) wurden die Zellen für drei Stunden entweder unbehandelt inkubiert oder oxidativem Stress in Form von Allicin bzw. als Positivkontrolle H_2O_2 ausgesetzt. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Hefezellen im Fluoreszenzmikroskop beobachtet.

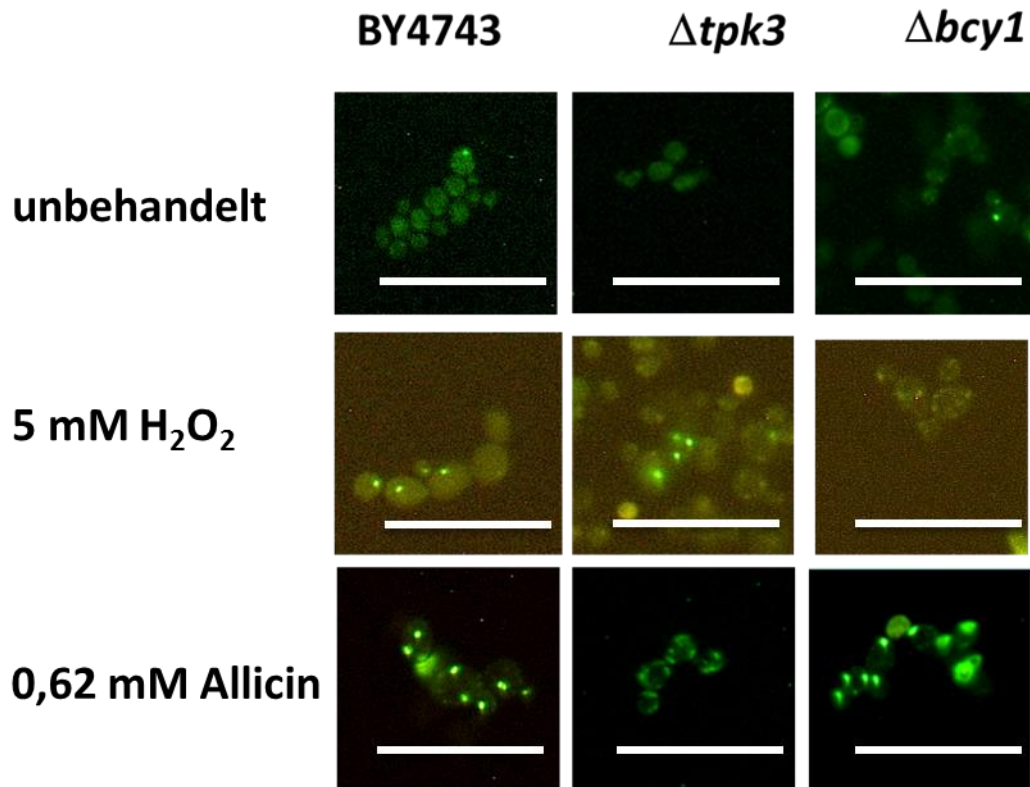


Abbildung 38: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der AIF-Translokation nach Behandlung mit Allicin und H_2O_2

Hefezellen wurden in methionin-freiem CSM-Medium induziert und für drei Stunden mit Allicin (0,62 mM) behandelt. Unbehandelte Zellen zeigen in allen drei Genotypen eine minimale Aggregation von GFP, was auf einen kleinen Anteil von Zellen hindeutet, in denen AIF1 kernlokalisiert vorliegt. Eine Behandlung mit H_2O_2 induziert in Wildtyp und $\Delta bcy1$ eine Kernlokalisierung, während der Anteil von Zellen mit aggregierter GFP-Fluoreszenz als Maß für die Kernlokalisierung geringer ist. Im Wildtyp ist zu erkennen, dass Allicin eine Aggregation des AIF1-GFP Fusions-Proteins bewirkte, erkennbar an der fokussierten Fluoreszenz des GFP Signals. In der $\Delta tpk3$ Mutante zeigt die Behandlung mit Allicin eine geringere Anzahl von Zellen, die eine klar aggregierte (d.h. *bona fide* zellkernlokalisierte) AIF1-Lokalisation aufweist. Im Fall der $\Delta bcy1$ Mutante hingegen induziert Allicin wiederum die Verlagerung des AIF1 Proteins in den Kern. Die mikroskopische Durchführung dieses Assays erfolgte wie in Punkt 2.11.2 beschrieben. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt. Die Größenmarkierung entspricht 20 μm .

Im Wildtyp (BY4743) zeigten unbehandelte Zellen eine geringe Rate von Zellen, bei denen die Fluoreszenz des GFPs aggregiert vorlag, was als Indikator für die Kernlokalisierung des AIFs genutzt wurde. Eine Behandlung mit Allicin erhöhte deutlich die Rate an Zellen, bei denen das AIF kernlokalisiert vorlag.

Ebenfalls zeigte $\Delta tpk3$ bei der unbehandelten Kontrolle eine geringe Rate von Zellen, bei denen das GFP-Signal aggregiert (kernlokalisiert) vorlag. Eine Behandlung mit Allicin führte hier nicht zu einer Erhöhung der Rate von Zellen mit kernlokalisiertem GFP-Signal. Im Gegensatz dazu verhielt sich

qualitativ der $\Delta bcy1$ Stamm entsprechend dem Wildtyp. Auch hier führte Allicin zu einer Erhöhung der Rate kernlokalisierter Zellen.

Um diese qualitativen Befunde quantitativ auszuwerten, wurde dieser Assay durchgeführt und pro Behandlung drei Sichtfelder mit jeweils mindestens 100 Zellen ausgezählt und der prozentuale Anteil von Zellen ermittelt, die eine Kernlokalisierung des AIF1-Proteins aufwiesen. Entsprechende Daten sind in Abbildung 39 zu sehen.

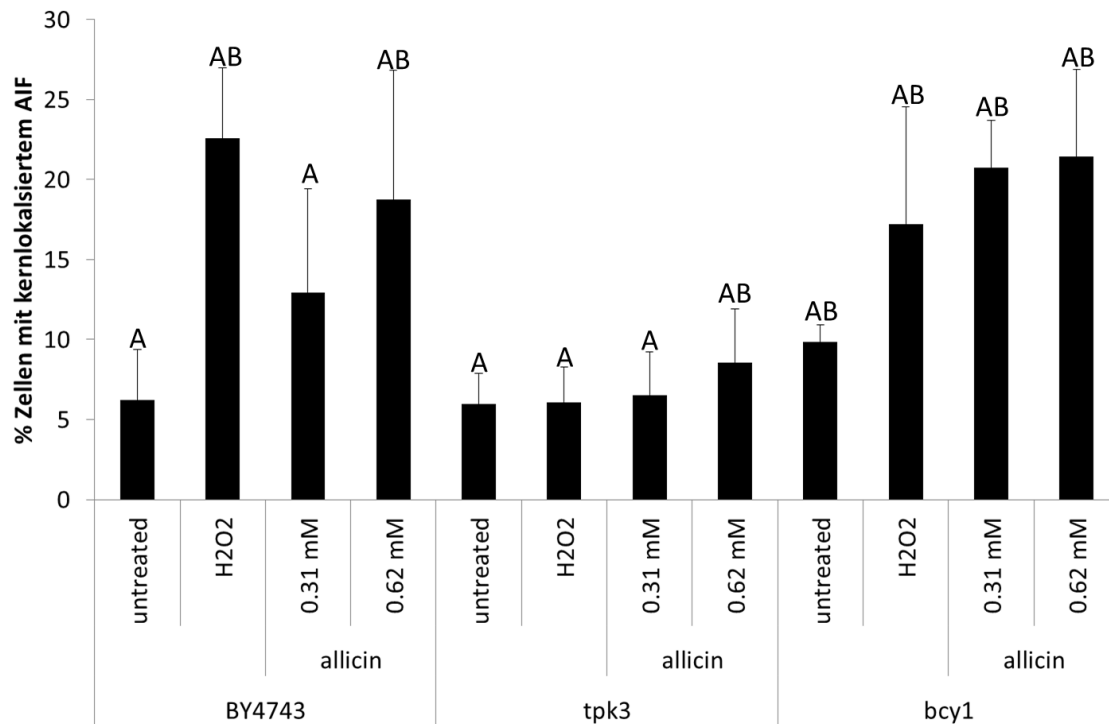


Abbildung 39: Lokalisation des AIF-Proteins nach Behandlung mit Allicin oder Wasserstoffperoxid als Positivkontrolle

Hefezellen des Wildtyps und der $\Delta tpk3$ und $\Delta bcy1$ Mutante wurden in methioninfreiem CSM Medium kultiviert zur Induktion der AIF-GFP Expression und mit 5 mM H_2O_2 bzw. Allicin (0,32 mM und 0,62 mM) behandelt; nach drei Stunden wurden die Zellen mikroskopisch hinsichtlich der Lokalisation des AIF-Signals bewertet. Die gezeigten Werte sind der Mittelwert aus drei unabhängigen Sichtfeldern mit je mindestens 100 Zellen. Die Buchstaben indizieren statistisch signifikante Unterschiede (One-way ANOVA, Holm-Šidák-Methode; $p < 0,05$).

In diese Versuche mit eingeschlossen wurde die Behandlung mit H_2O_2 als Positivkontrolle. Eine Behandlung mit H_2O_2 erhöhte im Wildtyp deutlich die Rate an Zellen, die eine deutliche AIF-Aggregation aufwiesen; während in unbehandelten Zellen etwa 7% der Zellen eine AIF-GFP Aggregation zeigten, stieg die Rate bei Behandlung mit 5 mM H_2O_2 auf etwa 23%. In konzentrationsabhängiger Weise erhöhte auch Allicin bei BY4743 Wildtyp-Zellen den Anteil von Zellen, die eine deutliche AIF-GFP Aggregation aufwiesen.

$\Delta tpk3$ Zellen unterschieden sich hinsichtlich des Anteils von Zellen, die AIF-GFP Aggregation aufwiesen, nicht deutlich vom Wildtyp; bei Behandlung mit H_2O_2 jedoch blieb bei $\Delta tpk3$ die Erhöhung

der Rate mit erhöhter AIF-GFP-Aggregation aus; gleiches traf auch für die Behandlung mit beiden getesteten Allicin-konzentrationen zu. Somit bestätigten die quantitativen Daten die Resultate, die qualitativ anhand der Bilder gezeigt wurden.

Für die $\Delta bcy1$ Mutante war zu beobachten, dass eine Behandlung mit H_2O_2 – in ähnlicher Weise wie es der Wildtyp zeigte – eine Erhöhung der AIF-GFP Aggregation bewirkte. Auch die Behandlung mit beiden getesteten Allicin-konzentrationen führte entsprechend dem Wildtyp zu einer Erhöhung der Rate von Zellen mit aggregierter GFP-Fluoreszenz als Maß für die Kernlokalisierung des AIF-Proteins.

Um die Beobachtung, dass die Translokation des AIF als für die apoptotische Funktion des Proteins notwendige Voraussetzung in $\Delta tpk3$ nach Behandlung mit H_2O_2 und Allicin als Apoptose-induzierende Stimuli ausbleibt, weiter funktional zu untersuchen, wurden die AIF-GFP Hefestämme als funktionelle Überexpressionslinien des AIF1 Proteins genutzt und getestet, ob eine erhöhte Expression des AIF1 Proteins im Wildtyp wie in den PKA Mutanten zu einer veränderten Suszeptibilität im Vergleich zur nicht-überexprimierenden Kontrolle führt.

Zunächst wurde dazu untersucht, ob die GFP-Konstrukte funktionell sind und somit die Eignung aufweisen, als Überexpressionskonstrukte in diesem Versuch zu fungieren. Dazu wurden Transformanten im Hintergrund BY4743 (Wildtyp) in methioninhaltigem bzw. methioninfreiem Medium vorgezogen, um entweder die Expression des AIF-Konstruktes zu induzieren (methioninfreies Medium) oder zu unterdrücken (methioninhaltiges Medium).

Die Kulturen wurden auf eine $OD_{600} = 1$ eingestellt und mit H_2O_2 behandelt mit finalen Konzentrationen von 1, 5 und 10 mM H_2O_2 . Nach 16 Stunden wurden die Zellen auf YPD Medium ausplattiert und nach weiteren 24 Stunden wurde die Anzahl der Kolonien im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gezählt.

H_2O_2 bewirkte eine konzentrationsabhängige Abnahme der Überlebensrate der Hefezellkultur in den Zellen, in denen die AIF-Überexpression nicht induziert ist. Während bei einer Konzentration von 1 mM in diesem Experiment etwa 80 % der Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle überlebten, waren es bei einer Behandlung mit 10 mM H_2O_2 nur noch rund 20% der Zellen.

Bei Zellen, die aufgrund von Methioninmangel das AIF-Protein überexprimierten, war die Überlebensrate reduziert im Vergleich zu Zellen, bei denen die AIF-GFP Expression nicht induziert war. Eine Behandlung mit 1 mM führte zu einer statistisch signifikanten, deutlich reduzierten Überlebensrate im Vergleich zu nicht-induzierten Zellen (Abbildung 40). In einem weiteren Experiment (dessen experimentelle Details unter Punkt 2.10.3 beschrieben sind) wurden nicht-transformierte BY4743 Zellen beider Medien in entsprechender Weise kultiviert, um festzustellen, ob der Methioninmangel für den beobachteten Effekt verantwortlich ist. Es konnte zwischen der Kultivierung in methioninhaltigem und methioninfreiem Medium kein Unterschied festgestellt werden. Aufgrund dieser Befunde wurden die mit dem AIF-GFP-Konstrukt transformierten Hefestämme als funktionale Überexpressionskonstrukte genutzt.

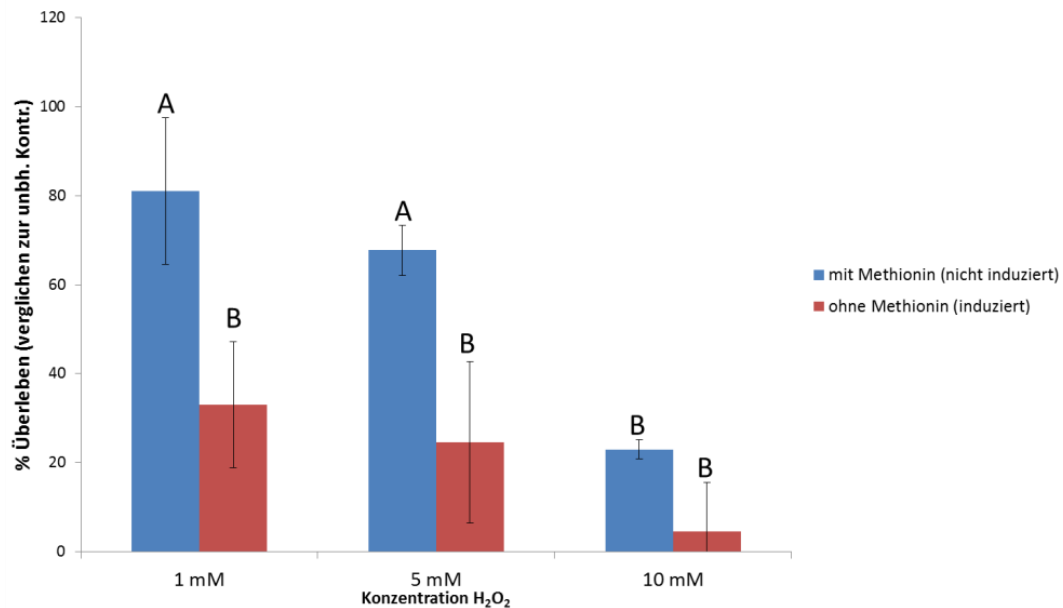


Abbildung 40: Versuch zur Klärung der Frage, ob die AIF-GFP-Konstrukte als funktionale Überexpressionen des AIF1 Proteins in Hefe verwendet werden können

Wildtyp-Hefezellen (BY4743), die mit einem AIF-GFP Konstrukt transformiert sind, das unter der Kontrolle des Methioninmangel-induzierbaren *Met25* Promoters steht, wurden über Nacht in methionin-haltigem (20 mg L⁻¹; Repression der Expression) bzw. methionin-freiem (Induktion der Expression) CSM Medium kultiviert. Die Kultur wurde auf eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt und anschließend mit H₂O₂ verschiedener Konzentrationen behandelt. Unbehandelte wie behandelte Kulturen wurden nach 16 Stunden Inkubation bei 28°C auf YPD-Platten in Verdünnungen ausgebracht. Es wurde die Verdünnung von 1:1x10⁵ nach 24 Stunden ausgezählt und die Überlebensrate bestimmt, indem die Kolonienzahl der behandelten Probe durch die Zahl der Kolonien der unbehandelten Kontrolle dividiert wurde. Die statistische Auswertung erfolgte mittels One-way ANOVA, Holm-Šidák-Methode; p<0,05. Die gezeigten Messwerte entsprechen dem Mittelwert aus sechs Einzelmesswerten innerhalb eines Versuches.

Das Experiment wurde ausgeweitet, indem neben Wildtypzellen auch die - bereits für die Auszählung der AIF-Aggregation verwendeten mit dem AIF-GFP Konstrukt transformierten Stämme im Hintergrund $\Delta bcy1$ und $\Delta tpk3$ in die Untersuchung mit einbezogen wurden und neben einer Behandlung mit H₂O₂ auch eine Behandlung mit Allicin in den Konzentrationen 0,31 und 0,62 mM durchgeführt wurde.

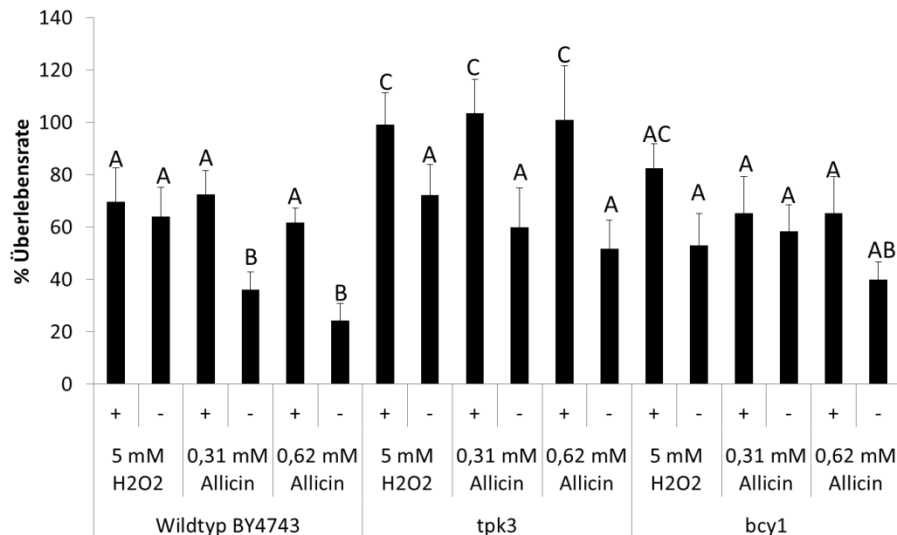


Abbildung 41: Einfluss einer AIF1-Überexpression auf den H₂O₂- und Allicin-induzierten Zelltod sowie die modulierende Rolle der PKA auf diesen Effekt

Hefezellen, die mit einem AIF-GFP Konstrukt unter der Kontrolle des *Met25* Promoters transformiert sind, wurden entweder in Anwesenheit von Methionin (+; nicht induziert) bzw. bei Methioninmangel (-; Induktion) kultiviert und mit H₂O₂ (5 mM) bzw. Allicin (0,31 und 0,62 mM) behandelt. In allen Stämmen ist zu beobachten, dass eine Überexpression des AIF nach Behandlung mit H₂O₂ oder Allicin zu einer verringerten Überlebensrate führt. Diese wurde festgestellt mittels Droptest, dessen experimentelle Details unter 2.8.5 beschrieben sind. Die statistische Auswertung erfolgte mittels One-way ANOVA, Holm-Šidák-Methode; $p < 0,05$. Die gezeigten Werte entsprechen dem Mittelwert aus sechs Einzelmesswerten innerhalb eines Versuches; der Versuch wurde zweimal durchgeführt.

Wildtypzellen, die mit dem AIF-Konstrukt transformiert und in methioninhaltigem (= nicht die AIF-Expression induzierendem) Medium kultiviert wurden, zeigten eine reduzierte Überlebensrate nach Behandlung sowohl mit H₂O₂ wie auch mit Allicin (Abbildung 41). Bei gleicher Behandlung war die Überlebensrate des gleichen Konstruktes im Hintergrund $\Delta tpk3$ höher, während sich $\Delta bcy1$ wie in den vorangegangenen Experimenten, die sich dieser Methode bedienten, ähnlich zum Wildtyp verhielt.

Eine Induktion der Genexpression durch Methioninmangel führte bei Behandlung mit Allicin zu einer deutlichen Reduktion der Überlebensrate; im Gegensatz zum vorangegangenen Experiment war die Überlebensrate bei der Behandlung mit H₂O₂ nur geringfügig verringert.

In der $\Delta tpk3$ Mutante führte eine Induktion der AIF Überexpression ebenfalls zu einer Verringerung der Überlebensrate im Vergleich zu einer Linie, die nicht das AIF-GFP Konstrukt überexprimiert. Im direkten Vergleich der gleichen Behandlungen des Wildtyps und $\Delta tpk3$ zeigte die Mutante eine absolut höhere Überlebensrate, aber nicht eine vollständige Unterdrückung der pro-apoptotischen Funktion der AIF1-Überexpression. Die relativen Unterschiede, die eine Überexpression des AIF-Konstruktes nach Behandlung mit beiden Stressoren bewirkt, unterschieden sich kaum zwischen Wildtyp und $\Delta tpk3$ Mutante.

Interessanterweise schien bei der $\Delta bcy1$ Mutante der Einfluss der AIF-Überexpression weniger stark zu sein als in den beiden anderen getesteten Mutanten; der relative Unterschied zwischen der überexprimierenden und nicht-überexprimierenden Linie war bei allen Behandlungen (H_2O_2 und Allicin) geringer, verglichen mit Wildtyp bzw. $\Delta tpk3$.

3.2.3.7 TPK3 beeinflusst die Frequenz von Kernfragmentierungen nach Allicinbehandlung

Ein bedeutendes Merkmal der Wirkung des AIF-Proteins ist die DNA- und Kernfragmentierung. Ausgehend von der Beobachtung, dass eine $\Delta tpk3$ Mutante in der Lokalisation des AIF beeinflusst war, wäre zu erwarten, dass auch eine Beeinflussung der Kernfragmentierung nachgewiesen werden kann. Dieser Test sollte mittels DAPI (4',6 Diamidin-2-phenylindol) erfolgen.

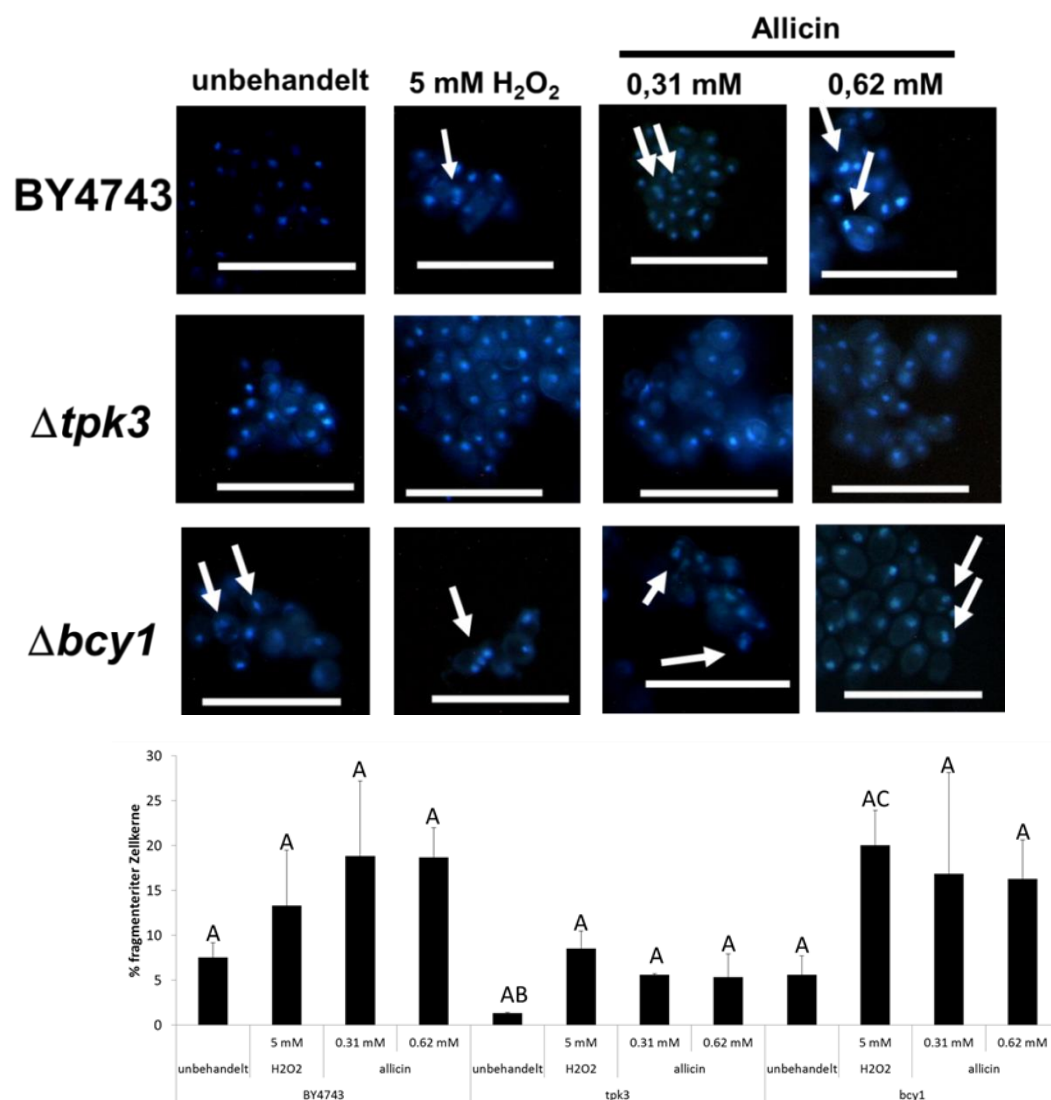


Abbildung 42: Allicin induziert Kernfragmentierung in einer von PKA regulierten Weise

Die verschiedenen getesteten Genotypen (BY4743, $\Delta tpk3$, $\Delta bcy1$) wurden mit Wasserstoffperoxid als Positivkontrolle bzw. Allicin behandelt und für 16 Stunden weiter inkubiert. Eine qualitative Auswertung ergab, dass H_2O_2 und Allicin eine erhöhte Rate von fragmentierten Kernen bedingen, wobei dieser Effekt in der $\Delta tpk3$ Mutante in geringerem Umfang zu beobachten war. Die Kernfragmentierung wurde festgestellt durch Färbung mit 4',6 Diamidin-2-phenylindol (DAPI). Die Größenskala entspricht 20 μm .

Eine quantitative Auswertung bei je drei Sichtfeldern mit jeweils mindestens 100 Zellen konnte den qualitativen Befund bestätigen, dass sowohl H_2O_2 als auch Allicin Kernfragmentierung induzieren und die Rate an Zellen, die diesen apoptotischen Marker aufweisen, bei $\Delta tpk3$ geringer war als bei der Wildtypkultur bzw. $\Delta bcy1$. Dieser Genotyp zeigt nur bei H_2O_2 eine tendenziell höhere Rate mit kernfragmentierten Zellen, während sich die Allicinbehandlung dieses Genotyps nicht vom Wildtyp unterscheidet. Experimentelle Details zur Durchführung sind gezeigt in Abschnitt 2.11.3.2. Eine Testung auf statistische Signifikanz erfolgte durch One-way ANOVA, Holm-Šidák-Methode; $p < 0,05$. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt mit vergleichbaren Ergebnissen.

Bei Wildtypzellen führte eine Behandlung mit H_2O_2 und Allicin zu einer Erhöhung der Rate von Zellen, die eine Kernfragmentierung aufwiesen (vgl. Abbildung 42). Dieser tendenzielle Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant, besonders bedingt durch den Umstand, dass die Standardabweichungen groß waren. Die $\Delta bcy1$ Mutante unterschied sich vom Wildtyp darin, dass H_2O_2 eine höhere Rate an kernfragmentierten Zellen aufwies. Bei der Behandlung mit Allicin unterschied sich diese Mutante nicht vom Wildtyp.

Im Gegensatz dazu war die Kernfragmentierung in der $\Delta tpk3$ Mutante geringer im Vergleich zum Wildtyp, sowohl bei Behandlung mit H_2O_2 als auch Allicin. Wiederum war dieser Unterschied nicht statistisch signifikant.

Diese Tendenz belegte, dass auch in diesem Assay $\Delta tpk3$ sich vom Wildtyp und auch von $\Delta bcy1$ unterschied.

3.2.4 Zur Bedeutung des ORF YKL071w auf die Resistenz gegenüber Allicin und der YAP-1 abhängigen Stressantwort

3.2.4.1 Charakterisierung des *OSI1* (*YKL071w*)-Lokus

Im vorangegangenen Teil der Arbeit wurde die Fragestellung bearbeitet, auf welchem Wege Allicin toxisch ist für Hefezellen. Um Faktoren zu identifizieren, die die Resistenz von Hefezellen gegenüber Allicin vermitteln, wurde in Rückgriff auf eine publizierte Microarray-Studie (Yu et al., 2010) das Gen *YKL071w* hinsichtlich seiner Rolle in der Allicin-Toxizität näher untersucht. Dieser Open Reading Frame (ORF) zeigte die stärkste differenzielle Expression bei Allicinbehandlung (*ibid.*), weshalb angenommen wurde, dass dieser ORF zur Resistenz gegenüber Allicin beiträgt. Weil *YKL071w* nicht nur durch Allicin, sondern durch viele oxidative Stressoren in der Genexpression induziert wird, wurde dieser Open Reading Frame *OSI1* für Oxidative Stress Induced genannt.

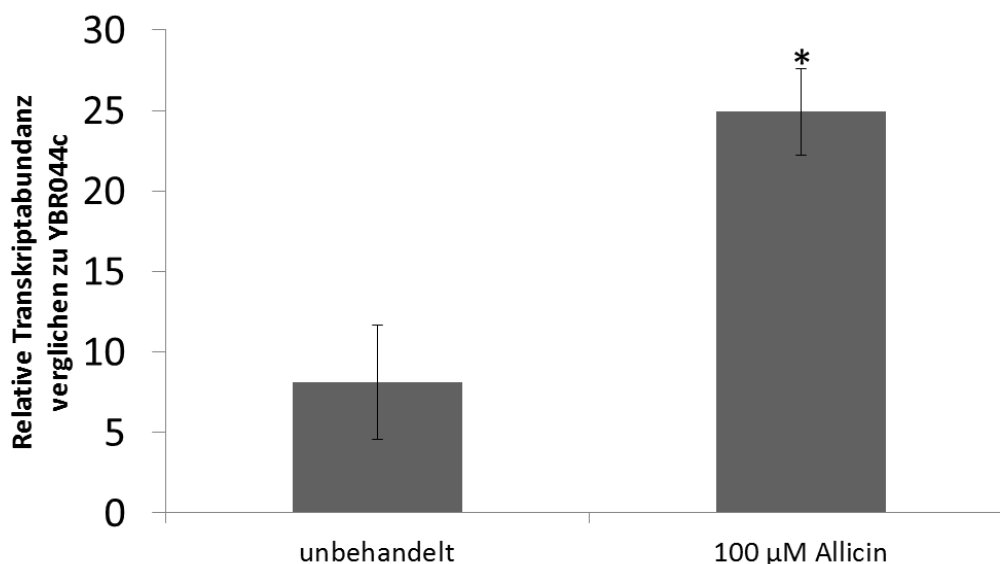


Abbildung 43: Änderung der Expression von *OSI1* (*YKL071w*) nach Behandlung mit Allicin (100 µM) bei einer Inkubationsdauer von einer Stunde

Eine Kultur des Wildtypstammes BY4742 wurde in YPD angezogen bis zu einer $OD_{600}=1$. Dazu wurde Allicin in einer finalen Konzentration von 100 µM gegeben und für eine Stunde bei 28°C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde RNA extrahiert und nach cDNA Synthese die Transkriptmenge mittels qPCR bestimmt, wobei der Transkriptlevel gegen das Gen *YBR044c* normiert wurde. Es zeigt sich eine deutliche, statistisch signifikante Zunahme der Expression von *OSI1* nach Behandlung mit Allicin. Der Unterschied zwischen der unbehandelten und behandelten Probe ist statistisch signifikant (t-Test; $p<0,05$). Der dargestellte Wert entspricht dem Mittelwert aus drei Einzelmesswerten.

Zunächst sollte überprüft werden, ob die beschriebene Eigenschaft, dass Allicin die Expression von *OSI1* stimuliert, indem Wildtyp-Hefezellen mit 100 µM Allicin behandelt wurden und die Expression mittels qPCR quantifiziert wurden. Als Referenzgen diente *YBR044c* (*TCM62*), ein Bestandteil des Succinat-Dehydrogenase Komplexes.

Die Ergebnisse der qPCR ergaben, dass die Expression des *OSI1* Gens nach Behandlung mit 100 µM Allicin statistisch signifikant stärker exprimiert wurde als in der unbehandelten Kontrolle (Siehe Abbildung 43)

Laut der Arbeit von Yu *et al.* ist *OSI1* das am stärksten differenziell regulierte Gen nach Allicinexposition (Yu *et al.*, 2010). Deshalb wurde die Promoterregion des *OSI1* Gens *in silico* untersucht und festgestellt, dass ein Cluster von Bindestellen des YAP1-Transkriptionsfaktors zu finden ist, die jeweils zusammen mit einer Spacer-Sequenz ein 12 bp großes „Tandem repeat“ aus YAP1-Erkennungssequenz TTAGTAA bilden. Insgesamt finden sich sechs intakte Tandem Repeats. Ein weiteres weist eine Mutation in der YAP1 Erkennungssequenz auf (TTAGCAA anstelle von TTACTAA), wobei die Funktionalität dieser Variation in dieser Arbeit nicht getestet wurde.

[illegible]

Abbildung 44: Nukleotidsequenz von *OS11* plus 1 kb vor dem Startcodon ATG und 1 kb nach dem Stoppcodon

Der Open Reading Frame des *OSI1* Gens ist blau untermalt. Im Promoterbereich des Gens sind die Spacer grün hervorgehoben, in violett die YAP1 Bindesequenzen. Rot hervorgehoben ist eine Erkennungssequenz des *PDR3* Transkriptionsfaktors, der aber *bona fide* keinen Einfluss auf die Resistenz des *OSI1* Gens hat (Bachelor-Arbeit Ivan Schlembach, 2011).

Aufgrund dieser Erkenntnis, dass eine YAP1-Bindesequenz gehäuft in der Promoterregion von *OSI1* auftritt und weil der YAP1-Transkriptionsfaktor ein zentraler Regulator der oxidativen Stressantwort in *S. cerevisiae* ist, sollte die Rolle von YAP1 in der Antwort von Hefezellen auf Allicin untersucht werden.

In einem ersten Schritt wurde ein Konstrukt entwickelt, in dem eine Luciferase unter der Kontrolle des *OSI1* Promoters steht und das im Rahmen eines Forschungspraktikums von Ivan Schlembach umgesetzt worden ist. Die kinetische und konzentrationsabhängige Zunahme der Luciferaseaktivität in Wildtyp- und *Δyap1* Zellen wurde nach Behandlung mit verschiedenen oxidativen Stressoren (H_2O_2 , Allicin und Diamid) verfolgt (Resultate dazu sind in Abbildung 45 gezeigt). Dazu wurde die Luminiszenz über einen Zeitraum von 10 Sekunden gemessen; die Durchführung dieses Versuches ist in Kapitel 2.10.3 beschrieben.

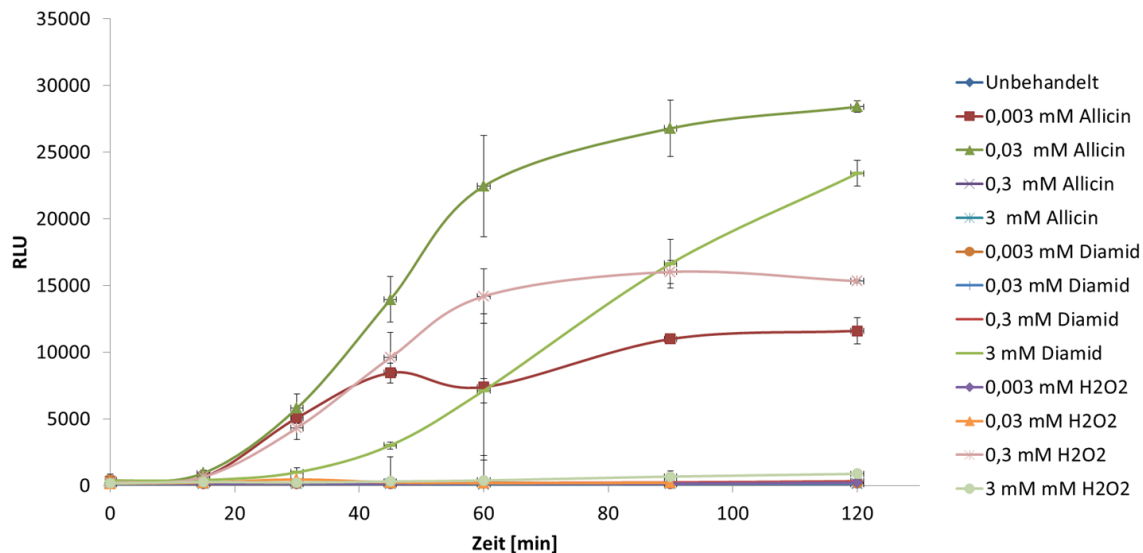


Abbildung 45: Aktivität des *OSI1*-Promoters nach Behandlung mit verschiedenen oxidativen Stressoren, gemessen anhand der Lichtemission durch Luciferase

Die Expression der Luciferase wird gesteuert durch den *OSI1*-Promoter. Die emittierte Luminiszenz wurde über einen Zeitraum von 10 Sekunden gemessen. Nach etwa 10 Minuten war nach Exposition des oxidativen Stressors eine Zunahme an Lichtemission zu beobachten. Im Falle von Allicin induzierte eine Konzentration von 0,03 mM Allicin eine maximale Antwort, im Falle von Diamid eine Konzentration von 3 mM und im Falle von H_2O_2 eine Konzentration von 0,3 mM, so dass die Wirkung von Allicin auf den *OSI1* Promoter bei einer 100x geringeren Konzentration als bei Diamid zu beobachten war. Die gezeigten Werte entsprechen dem Mittelwert aus drei Messwerten pro Zeitpunkt und Behandlung. Nähere Angaben zur Versuchsdurchführung sind in Kapitel 2.10.3 aufgeführt.

Zu erkennen war, dass alle drei oxidativen Stressoren die Expression der Luciferase induzierten, wenngleich sehr unterschiedlich hinsichtlich der Effektivität der unterschiedlichen Konzentrationen. Allicin induzierte bei einer Konzentration von 0,003 mM (3 μ M) die Expression der Luciferase, wobei bei 45 Minuten ein Maximum erreicht war, das über den gesamten Zeitraum von zwei Stunden, während dem die Messung erfolgte, konstant blieb. Eine Konzentration von 0,03 mM (30 μ M) Allicin führte zu einer deutlich stärkeren, maximalen Induktion des *OSI1*-Promoters, wobei ebenfalls nach etwa 10 Minuten die Induktion begann und steiler anstieg, als es bei der niedrigeren Konzentration der Fall war. Eine weitere Erhöhung der Allicinkonzentration jedoch führte zu einem vollständigen Ausbleiben der Luciferase-Expressionsinduktion, was dafür spricht, dass hier eine toxische Konzentrationsschwelle überschritten wurde.

Im Gegensatz dazu ist Diamid weniger aktiv als Allicin. Diamid wurde als zusätzliche Kontrolle verwandt, für das eine Aktivierung von YAP1-abhängiger Expression beschrieben ist. Während Allicin in der geringsten getesteten Konzentration (3 μ M) schon deutlich die Expression der Luciferase induzierte, war bei gleicher Konzentration für Diamid keinerlei Induktion zu beobachten, ebenso wie bei den nächst höheren Konzentrationen bis zu 300 μ M (=0,3 mM). Bei Diamid war erst bei einer Konzentration von 3 mM eine deutliche Induktion des *OSI1*-Promoters zu beobachten, wobei sich die Kinetik der Induktion deutlich von der des Allicins unterschied. Die Aktivierung und Zunahme des

OSI1-Promoters erfolgte deutlich langsamer, als es für Allicin der Fall war. Somit war bezogen auf seine Induktionsfähigkeit des *OSI1*-Promoters Allicin 100x aktiver als Diamid.

Ein intermediäres Bild ergab die Behandlung mit H_2O_2 . Auch H_2O_2 bedingte bei den niedrigen getesteten Konzentrationen (3 und 30 μM) keine Induktion des Promoters. Eine Behandlung mit 300 μM (0,3 mM) H_2O_2 führte zu einer deutlichen *OSI1*-Promoter Induktion, die geringfügig stärker war als bei einer Behandlung mit 3 μM Allicin. Bei einer Exposition von höheren Konzentrationen (3mM) von H_2O_2 blieb die *OSI1*-Promoter-abhängige Expression der Luciferase aus, was nahe legte, dass hier eine Inhibition der Transkription durch H_2O_2 erfolgte.

Weil die Anzahl der YAP1-Bindestellen nahe legt, dass die Regulation des *OSI1*-Promoters abhängig ist von der Aktivität des YAP1-Transkriptionsfaktors, wurde getestet, ob eine Aktivierung des Promoters auch in einer $\Delta yap1$ Mutante erfolgen konnte; wenn YAP1 für die Aktivierung notwendig ist, sollte in dieser Mutante nach Exposition gegenüber oxidativen Stressoren keine Aktivierung mehr möglich sein.

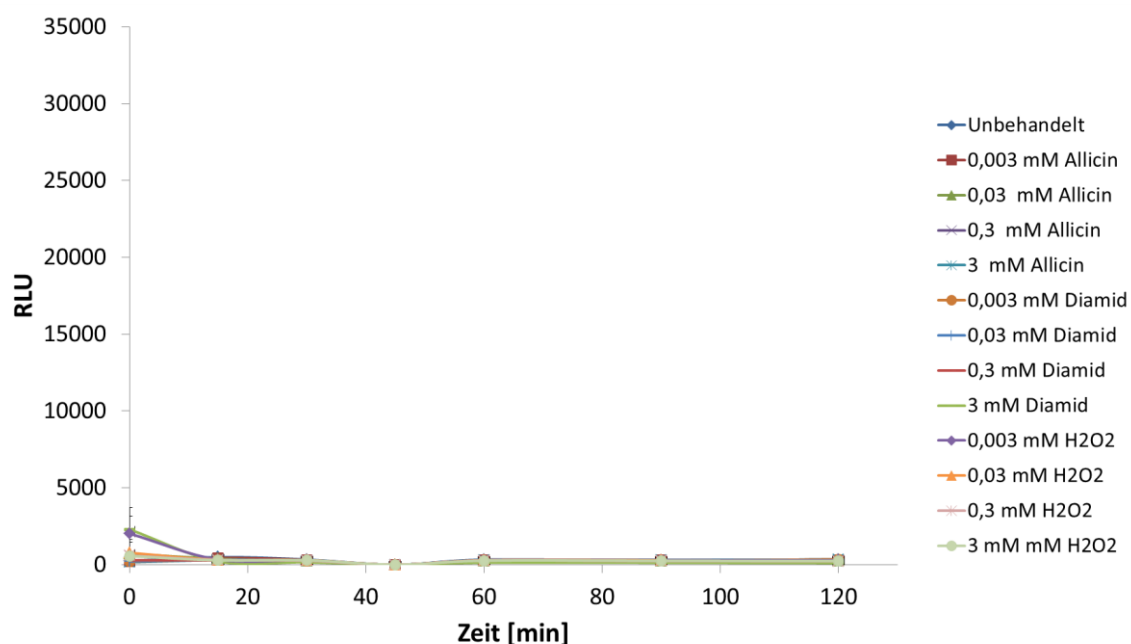


Abbildung 46: Aktivität des *OSI1*-Promoters nach Behandlung mit verschiedenen oxidativen Stressoren im $\Delta yap1$ -Hintergrund, gemessen anhand der Lichtemission durch Luciferase

Die Expression der Luciferase wird reguliert durch den *OSI1*-Promoter. Die emittierte Luminiszenz wurde über einen Zeitraum von 10 Sekunden gemessen. Im Gegensatz zu einer Expression des *OSI*-Promoter-Luciferase-Konstruktes im Wildtyp-Hintergrund unterbleibt eine Expression der Luciferase-Expression, wenn das Konstrukt im $\Delta yap1$ -Hintergrund exprimiert wird. Die gezeigten Werte entsprechen dem Mittelwert aus drei Messwerten pro Zeitpunkt und Behandlung. Nähere Angaben zur Versuchsdurchführung sind in Kapitel 2.10.3 aufgeführt.

Im Gegensatz zur Situation im Wildtyp, bei dem eine Behandlung mit allen drei Oxidanzien eine deutliche Expression der Luciferase hervorrief, kam es im $\Delta yap1$ Hintergrund bei keiner der getesteten Behandlungen zu einer Expression der Luciferase (Abbildung 46).

Dieses Ergebnis zeigte die Bedeutung von YAP1 für Expression von *OSI1*.

Es wurde eine Mutante des *OSI1*-Gens (*YKL071w*) sowie eine durch Transformation von Wildtyp-Zellen mit dem Plasmid pDH20 (erhalten von Dr. Dominik Heer, Universität Zürich) erzeugte Überexpressionslinie von *OSI1* untersucht.

Als erster Assay wurde in einem Hemmhoftest die Anfälligkeit von $\Delta osi1$ und der *OSI1*-Überexpressionslinie auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Allicin getestet.

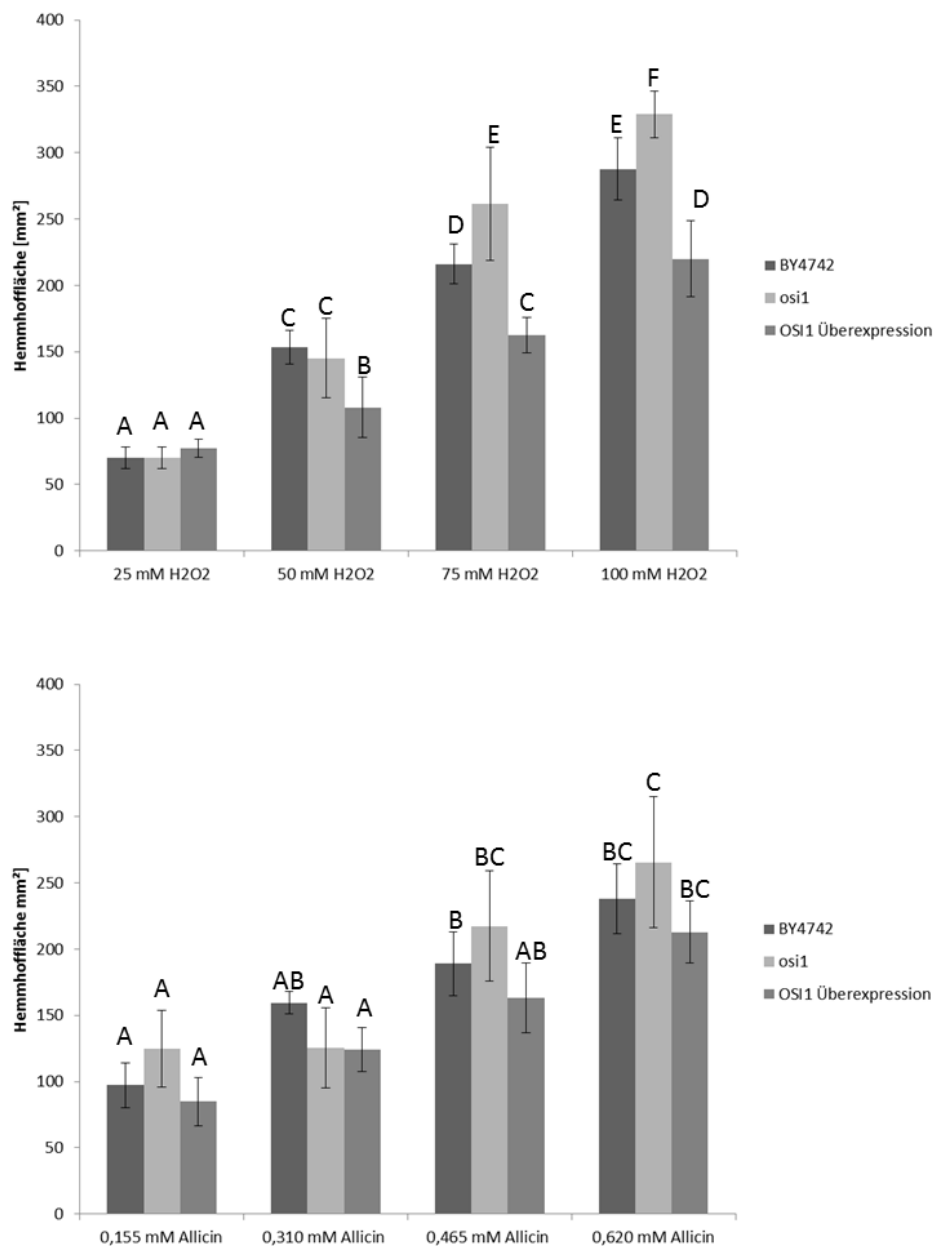


Abbildung 47: Testung der Empfindlichkeit der *osi1* Mutante und einer *OSI1*-Überexpressionslinie hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegen Allicin und Wasserstoffperoxid im Hemmhoftest

Wildtypzellen, eine *osi1*-Mutante sowie eine *OSI1*-Überexpressionslinie unter Kontrolle des starken konstitutiven *GDH*-Promoters wurden auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Allicin und H_2O_2 in verschiedenen Konzentrationen getestet. Während bei Behandlung mit H_2O_2 die *osi1* Mutante statistisch signifikant suszeptibler ist bei Behandlung mit höheren Konzentrationen (75 und 100 mM) und die Mutante statistisch signifikant resistenter ist, ist eine veränderte Resistenz von Hefezellen gegenüber Allicin nur tendenziell, nicht aber statistisch signifikant nachweisbar. Daraus wird geschlossen, dass *OSI1* eine Rolle spielt für die Resistenz von Hefezellen gegenüber H_2O_2 , jedoch für die Resistenz gegen Allicin von nachrangiger Bedeutung ist. Die statistische Testung wurde mittels One-way ANOVA, Holm-Šidák-Methode; $p < 0,05$, durchgeführt. Die gezeigten Werte entsprechen dem Mittelwert aus acht Einzelmesswerten; der Versuch wurde zweimal wiederholt.

Es zeigte sich, dass die Hemmhoftflächen bei Behandlung mit Wasserstoffperoxid in den Konzentrationen 75 mM und 100 mM in der $\Delta osi1$ Mutante größer waren als die des Wildtyps mit entsprechender Behandlung. Die Hemmhoftflächen der Überexpressionslinie im Gegensatz dazu waren statistisch signifikant kleiner als die des Wildtyps. Dies zeigte eine Beteiligung von OSI1 an der Resistenz gegenüber Wasserstoffperoxid (Abbildung 47, oberes Diagramm)

Bei Behandlung mit Allicin hingegen zeigte sich bei den höheren getesteten Konzentrationen (0,465 und 0,620 mM eine) schwache Tendenz, dass die *osi1* Mutante erhöht empfindlich, die *OSI1* Überexpressionslinie geringfügig resistenter war als der Wildtyp. Dieser Unterschied war bei den beiden niedrigeren getesteten Konzentrationen nicht zu beobachten; alle beschriebenen Unterschiede zwischen Mutante, Überexpressionslinie und Wildtyp waren bei einer Allicinkonzentration nicht statistisch signifikant (Abbildung 47, unteres Diagramm).

Es wurde gezeigt, dass der YAP1-Transkriptionsfaktor für die Genexpression von *OSI1* bedeutsam ist. Um weitergehend zu untersuchen, wie Allicin auf YAP1 einwirkt, wurde die Frage gestellt, ob Allicin die Lokalisation des YAP1-Proteins beeinflusst. Eine Kernlokalisierung des YAP1-Proteins ist notwendige Voraussetzung für die Aktivität des Proteins als Transkriptionsfaktor.

Es wurde ein YAP1-GFP Konstrukt in BY4742 Wildtyp-Zellen eingebracht und mit Konzentrationen von Allicin und H_2O_2 behandelt, die im vorangegangenen Test die maximale Antwort ergaben. Das YAP1-GFP Konstrukt wurde dankenswerterweise von Prof. Michel Toledano (Institut de Biologie et de Technologie Saclay, Frankreich) zur Verfügung gestellt.

Es wurde erwartet, dass die Aggregation des YAP1-Proteins im Zellkern ein schneller Prozess ist; deshalb wurde die Anzahl von Zellen mit kernaggregiertem GFP-Signal nach 10 Minuten ermittelt.

Es zeigte sich, dass zum Zeitpunkt $t=0$ bei keine der Behandlungen eine deutlich erhöhte Rate an Zellen mit kernlokalisiertem YAP1-GFP-Signal aufwies. Nach 10 Minuten stieg die Zahl der Zellen, bei denen das YAP1-GFP Signal kernlokalisiert vorlag, sowohl nach Behandlung mit Allicin als auch mit H_2O_2 signifikant an. Dabei ist eine Konzentrationsabhängigkeit zu beobachten. Neben der Induktion der *OSI1*-Genexpression zeigen sowohl Allicin wie H_2O_2 in den getesteten Konzentrationen eine Aktivität, die Aggregation des YAP1-GFP-Signals hervorzurufen. Eine Untersuchung zu späteren

Zeitpunkten ergab ein ähnliches Bild; nach ca. 30 Minuten nahm die Rate von Zellen mit Kernlokalisierung des YAP1-GFP Konstruktes wieder ab (*Daten nicht gezeigt*).

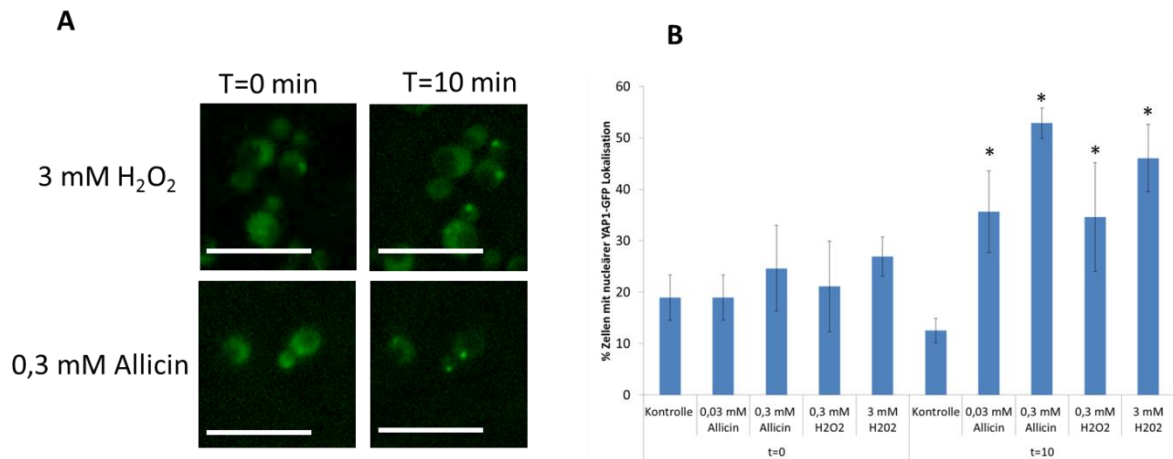


Abbildung 48: Allicin und H₂O₂ führen zu einer erhöhten Rate an kernlokalisiertem YAP1

(A) Mit Hilfe eines YAP1-GFP Konstruktes wurde die Lokalisation des YAP1-Proteins in der unbehandelten Kontrolle 10 Minuten nach Behandlung mit Allicin und H₂O₂ getestet. Die eingesetzten Konzentrationen entsprachen denen, die bei der Aktivierung des *OSI1*-Promoters die stärkste Aktivität gezeigt haben. Der Stern zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied ($p > 0,05$) zum jeweiligen Zeitpunkt zur unbehandelten Kontrolle an. Die Größenskalierung entspricht 10 μ m. (B) Für die quantitative Auswertung wurden pro Behandlung und Zeitpunkt drei Sichtfelder zu je 300 Zellen gezählt. Eine statistische Auswertung erfolgte mittels One-way ANOVA unter Verwendung Holm-Šidák-Methode mit einem Signifikanzniveau $p > 0,05$. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt.

Wenn H₂O₂ und Allicin die Kernlokalisierung als Bedingung für die Aktivität des YAP1 Transkriptionsfaktors bedingen und YAP1-abhängige Genexpression induzieren können, stellte sich die Frage, ob YAP1 selbst für die Resistenz gegen diese Oxidanzien wichtig ist. Deshalb wurde in einem Hemmhoftest die differenzielle Resistenz der $\Delta yap1$ Mutante im Vergleich zum Wildtyp getestet.

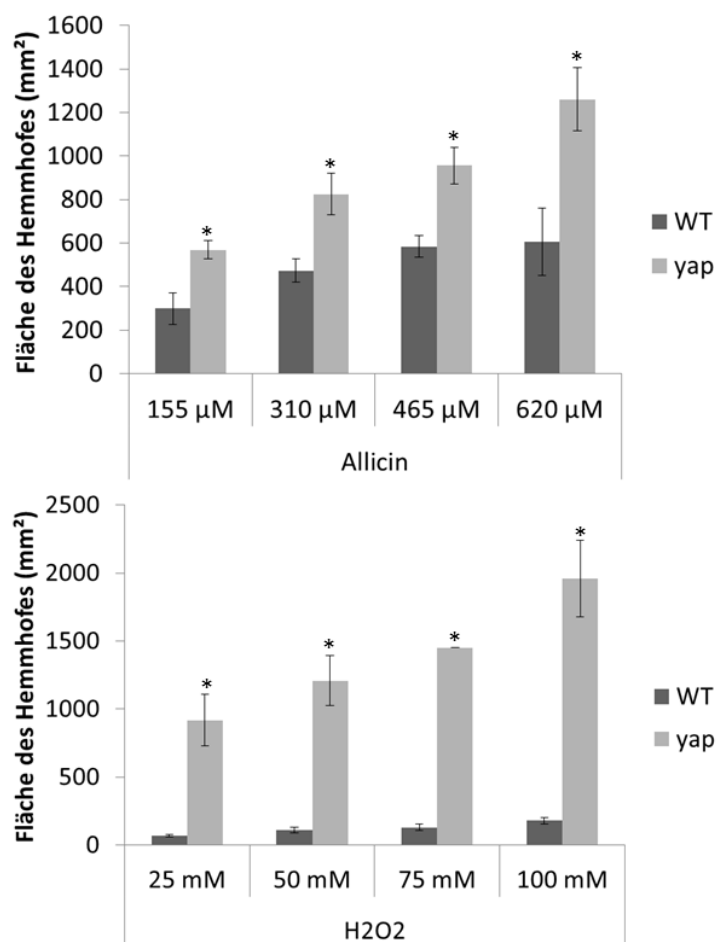


Abbildung 49: Unterschiedliche Anfälligkeit der $\Delta yap1$ Mutante im Vergleich zum Wildtyp gegen Allicin und H₂O₂ im Hemmhoftest

In den getesteten Konzentrationen (155, 310, 465 und 620 μM) zeigt die $\Delta yap1$ Mutante eine erhöhte Anfälligkeit gegen Allicin (oberes Bild). Dieser Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante ist statistisch signifikant (t-Test auf statistischen Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante bei der gleichen Behandlung; $p < 0,05$). Der Unterschied zwischen der $\Delta yap1$ Mutante und dem Wildtyp ist jedoch bei der Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen H₂O₂ deutlich ausgeprägter als bei Behandlung mit Allicin; auch hier sind die Unterschiede statistisch signifikant (t-Test; $p < 0,05$; getestet zwischen Wildtyp und Mutante innerhalb der jeweiligen Behandlung). Die Durchführung des Hemmhoftests ist unter Punkt 2.8.4.2 beschrieben. Die gezeigten Werte entsprechen dem Mittelwert aus acht Einzelmesswerten; der Versuch wurde zweimal wiederholt.

Bei einer Behandlung mit Allicin zeigten sowohl der Wildtyp als auch die $yap1$ -Mutante eine konzentrationsabhängige Zunahme der Hemmhofflächen. In der $\Delta yap1$ Mutante war die Fläche des Hemmhofes bei allen getesteten Konzentrationen statistisch signifikant größer als bei entsprechender Behandlung des Wildtyps; $\Delta yap1$ ist also deutlich susceptibler gegen Allicin (Abbildung 49, oberes Diagramm).

Gegen eine Behandlung mit H₂O₂ in den getesteten Konzentrationen (25, 50, 75, 100 mM) zeigte der Wildtyp Hemmhofflächen von $\sim 150 - 250 \text{ mm}^2$. Zu beachten ist hier, dass geringere Konzentrationen an H₂O₂ eingesetzt wurden als in den Tests mit PKA-Mutanten aufgrund der zu erwartenden höheren

Empfindlichkeit. Deshalb waren die Hemmhoflächen entsprechend kleiner. Die $\Delta yap1$ Mutante war im Gegensatz dazu gegen die Behandlung mit H_2O_2 deutlich anfälliger; mit Hemmhoflächen von ~1000 bis ~2000 mm^2 sind die Hemmhoflächen der Mutante etwa 4-6-mal größer als die des Wildtyps, was eine deutliche Suszeptibilität der $\Delta yap1$ Mutante zeigt (Abbildung 49, unteres Diagramm).

Typische Gene, deren Expression durch YAP1 reguliert wird, gehören neben Vertretern der Glutathionbiosynthese (*GSH1*) und der Glutathionregeneration (*GLR1*) auch Thioredoxine als zentrale Faktoren der Redoxprotektion. Abschließend wurde also untersucht, ob Thioredoxine wichtig sind für die Resistenz gegen Allicin. Die Thioredoxingene werden auf Expressionsebene – neben denen des Glutathionstoffwechsels – von YAP1 reguliert. Diese Testung der Mutanten erfolgte unter Verwendung des Hemmhoftests (2.8.4.2).

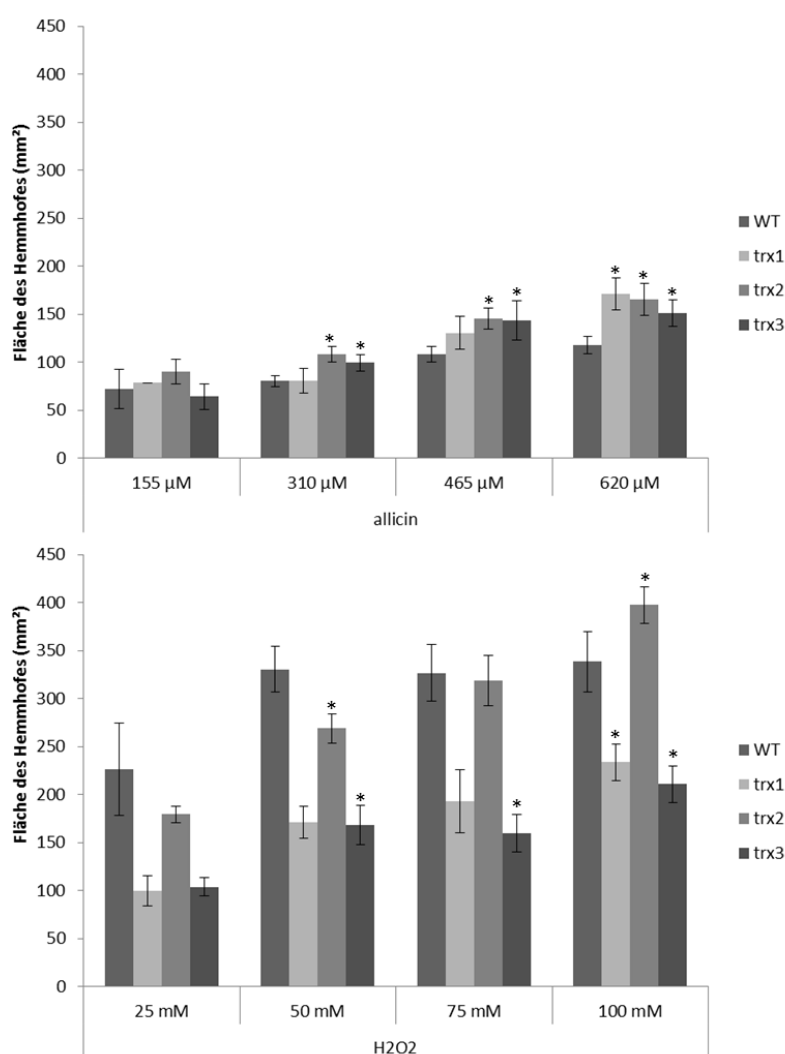


Abbildung 50: Vergleich der Wirkung von Allicin auf verschiedene Thioredoxinmutanten und den Wildtyp BY4742

Die Unterschiede der Thioredoxin-Mutanten $\Delta trx1-3$ zum Wildtyp bei Behandlung mit Allicin sind klein, jedoch statistisch signifikant. Bei Behandlung mit H_2O_2 sind die $\Delta trx1$ und $\Delta trx3$ Mutante resistenter als der Wildtyp.

Der Stern indiziert einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante innerhalb der jeweiligen Behandlung. Da die Daten nicht normalverteilt für die allicin-behandelten

Proben mit 155 μM , 310 μM und 465 μM sind, erfolgte die statistische Auswertung mittels ANOVA, (Tukey Test) mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$. Es zeigt sich eine geringfügig höhere Anfälligkeit von Thioredoxinmutanten gegenüber Allicin.

Auch bei H_2O_2 zeigt der Stern einen signifikanten Unterschied zum Wildtyp an. Auch hier sind die Daten nicht normalverteilt, so dass eine statistische Testung auf Reihenfolge (Turkey-Test) erfolgte. Im Gegensatz zu Allicin ergibt sich für die Thioredoxinmutanten kein einheitliches Bild; während die Δtrx2 Mutante bei den niedrigeren getesteten Konzentrationen (25-75 mM) H_2O_2 sich nicht vom Wildtyp unterscheidet und bei 100 mM H_2O_2 erhöht sensitiv gegenüber Wasserstoffperoxid ist, sind die Δtrx1 und Δtrx3 Mutanten resistenter gegen Wasserstoffperoxid-Behandlung. Die gezeigten Werte entsprechen dem Mittelwert aus acht Einzelmesswerten; der Versuch wurde zweimal wiederholt.

3.3 Physiologische Untersuchungen zur Wirkung von Allicin auf menschliche- und Säugetierzellen

3.3.1 Auswirkungen von Allicinexposition auf den Redoxzustand von Glutathion in verschiedenen Zelllinien

Wie bereits im Hefesystem gezeigt, führte die Exposition von Zellen gegenüber Allicin zu einer Veränderung des Thiolstatus in Bezug auf das Verhältnis von reduziertem und oxidiertem Glutathion. In diesem Versuch wurde in unterschiedlichen Säugetier-zelllinien (Maus/Mensch) untersucht, inwieweit Allicin auch in diesen Zell-Linien zu einer Veränderung des Redoxstatus führte. Dazu wurde -aufgrund der Vielzahl getesteter Zelllinien und Konzentrationen - anstelle des für Hefe verwendeten Glutathion-Recycling Assays Monobromobiman verwendet. Diese Substanz bindet an die Thiolgruppe vornehmlich von Glutathion (weil die Reaktion über Glutathion-S-Transferasen vermittelt wird) und bildet so ein fluoreszierendes Addukt. Im Falle einer Oxidation, die zur Bildung eines Disulfids führt, kann dies nicht mehr geschehen, so dass die Fluoreszenz bei höherem Oxidationszustand der zellulären Thiole geringer ist.

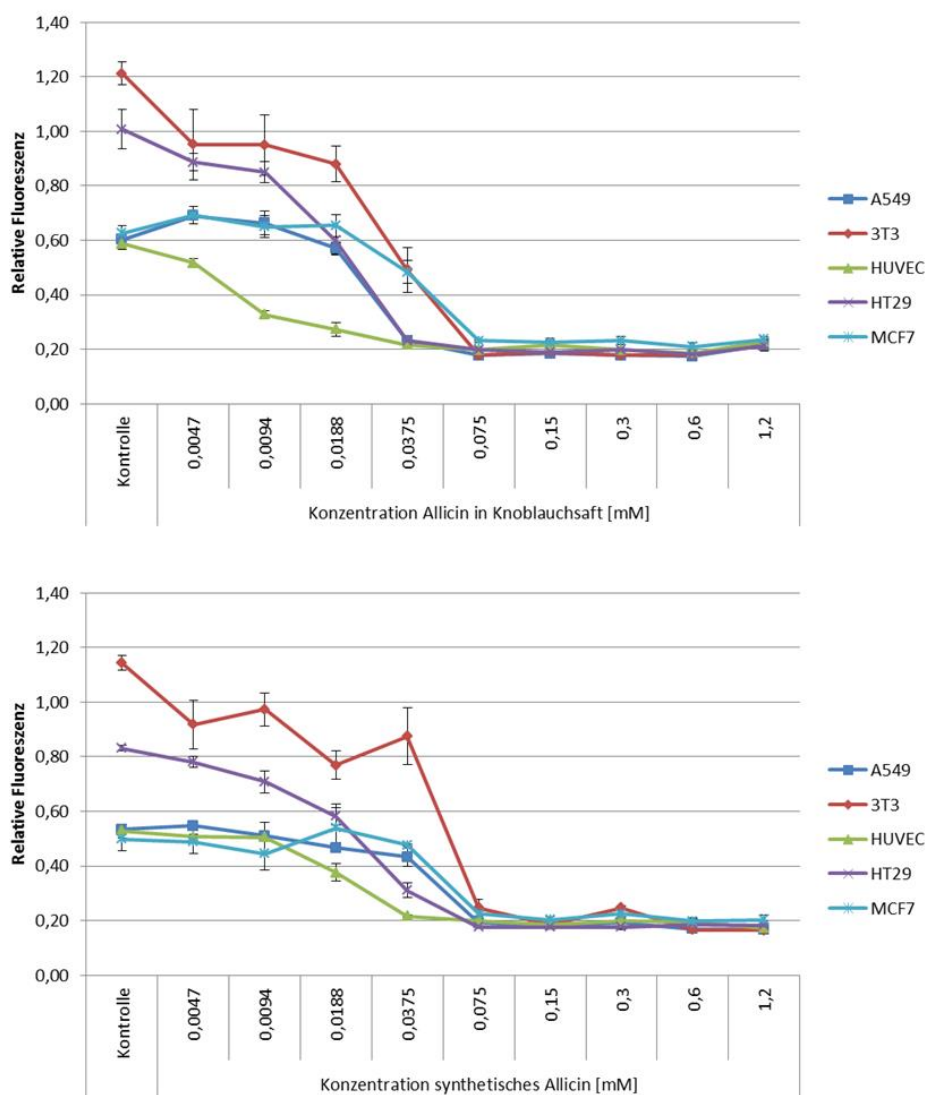


Abbildung 51: Fluoreszenzänderungen von Monobromobiman in verschiedenen Zelllinien nach Exposition mit Knoblauchsaff (A) und chemisch synthetisiertem Allicin (B)

Die Messung erfolgte nach 5 h. Dargestellt sind die Differenzwerte der Werte von $t=5h$ und $t=20$ min, die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Die unterschiedlichen Zelllinien zeigen drastische Unterschiede bei der Fluoreszenz in der unbehandelten Kontrolle, was darauf hindeutet, dass Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Zelllinien in Bezug auf die Glutathionkonzentration bestehen. Bei einer Konzentration von 0,075 mM sinkt die Fluoreszenz auf einen Grundwert ab. Die Werte stellen den Durchschnitt aus drei unabhängigen Replikaten dar. Eine nähere Beschreibung der experimentellen Details sind in Abschnitt 2.9.3 dargestellt.

Die unterschiedlichen Zelllinien unterschieden sich erheblich in Bezug auf ihre Fluoreszenzintensität bei der unbehandelten Kontrolle, wie Abbildung 51 zeigt. Das deutet darauf hin, dass der Redoxzustand zwischen den verschiedenen Zell-Linien in den unbehandelten Kontrollen der jeweiligen Zelllinien unterschiedlich ist. Mit zunehmender Allicinkonzentration sank die Fluoreszenzintensität ab, was ein Indikator dafür ist, dass weniger freie Thiolgruppen des Glutathions in den Zellen vorliegen, z.B. durch die Bildung von Disulfiden im Zuge von Allicin-induzierter

Oxidation oder der Bildung von Mischdisulfiden (S-Allylmercaptogluthathion). Eine Exposition der Zellen gegenüber einer Konzentration von 0,075 mM (=75 μ M; 12,98 μ g mL⁻¹) führte bei allen Zelllinien zum Absinken auf ein Fluoreszenzniveau, das auch mit höheren Allicinkonzentrationen nicht weiter gesenkt werden konnte, so dass man diesen Wert als einen Grenzwert ansehen kann. Dieser Wert war sowohl bei Knoblauchsaff wie auch bei synthetischem Allicin zu beobachten; ein deutlicher Unterschied hinsichtlich der Wirkung von synthetischem Allicin und Knoblauchsaff zeigte sich in diesem Assay nicht. Es ist auffällig, dass sich die unterschiedlichen Zell-Linien nicht gleich verhalten: Während die Abnahme der Fluoreszenzintensität bei 3T3-Zellen (Maus-Fibroblasten) bei niedrigen Konzentrationen nur gering war, zeigten sich als anderes Extrem HUVEC-Zellen (menschliche Endothel-Zellen) hinsichtlich der Abnahme der Fluoreszenz des Glutathion-Bimanaddukts besonders sensitiv. Diese Versuche wurden durchgeführt am Laboratoire d'Immunologie, Hôpital Cochin (Université Paris V), Paris.

3.3.2 Nach Allicinexposition akkumulieren Zellen Reaktive (Sauerstoff)Spezies

Um festzustellen, ob die Oxidation der Zellen durch die Einwirkung von Allicin direkt oder durch die Akkumulation von Reaktiven (Sauerstoff)spezies, wie Wasserstoffperoxid, verursacht ist, wurde die Akkumulation von Reaktiven Spezies mittels 2,7-Dichlorofluorescein-Diacetat quantifiziert.

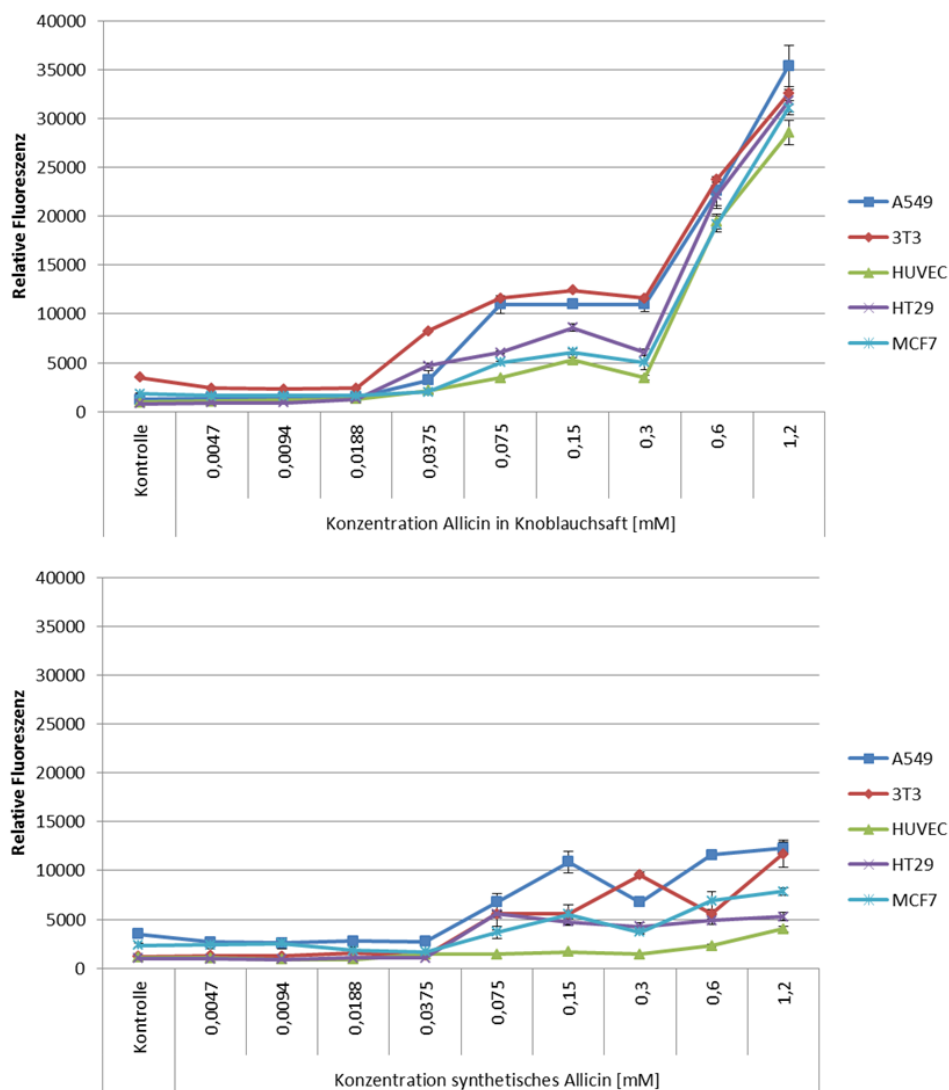


Abbildung 52: Akkumulation Reaktiver Spezies, getestet mit 2,7-Dichlorofluorescein-Diacetat (DCFDA)

Die Messung erfolgte, entsprechend der des Glutathions mittels Monochlorobiman, nach 5 h, wobei die hier dargestellten Werte die der Differenzwerte der Werte von $t=5h$ und $t=0,5 h$ sind. Dargestellt sind Messungen mit Knoblauchsaff (oben) und mit synthetischem Allicin (B, unten). Die Werte stellen den Durchschnitt aus drei unabhängigen Replikaten dar. Es bestehen Unterschiede zwischen der Behandlung mit Knoblauchsaff und Allicin: Während eine Behandlung mit Allicin nur zu einer geringfügigen Erhöhung der Fluoreszenz als Maß für die Akkumulation reaktiver Spezies führt, kommt es bei der Behandlung mit Knoblauchsaff zu einer deutlichen Zunahme der Fluoreszenz, was darauf hindeutet, dass Knoblauchsaff Komponenten (zusätzlich zu Allicin) enthält, die eine Akkumulation reaktiver Spezies hervorrufen. Mit diesem Assay lässt sich keine Aussage darüber treffen, welche Reaktiven Spezies akkumulieren, weil eine Identifikation in diesem unspezifischen Test nicht möglich ist.

Allicin bewirkte konzentrationsabhängig eine Zunahme von Reaktiven Spezies, sowohl bei Behandlung mit Knoblauchsaff als auch mit synthetischem Allicin, wobei der Effekt von chemisch

synthetisiertem Allicin nur geringfügig ist; die Behandlung mit Knoblauchsaff hingegen bewirkt eine massivere Zunahme der Fluoreszenz als Mass für die Akkumulation Reaktiver Spezies (Siehe Abbildung 52) . Der Schwellenwert, ab dem eine deutliche Antwort bei Behandlung mit zu beobachten war, lag bei allen Zelllinien bei etwa bei 0,0375 mM, jedoch ist die Wirkung bei Knoblauchsaff etwa um einen Faktor Drei höher als bei synthetischem Allicin. Es zeigte sich, dass Knoblauchsaff ab einer Allicin-Konzentration von 0,0375 mM zu einer mäßigen Ansammlung (Verdopplung bis Verdreifachung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle), ab einer Konzentration von 0,3 mM zu einer massiven Akkumulation Reaktiver Spezies führte. Bei Behandlung mit synthetischem Allicin akkumulierten die Zellen bei der Konzentration von 0,0375 mM ebenfalls Reaktive Spezies, was sich in einer Verdopplung bis Verdreifachung des Fluoreszenzsignals widerspiegelte. Allerdings kam es bei einer weiteren Erhöhung der Allicin-Konzentration nicht, wie beim Knoblauchsaff, zur massiven Zunahme an Reaktiven Spezies. Auffällig war die unterschiedliche Antwort der verschiedenen Zell-Linien auf die Behandlung mit synthetischem Allicin: Während 3T3- (Maus-Fibroblasten) und A549- Zellen (humane Lungen-Karzinomzellen) eine Verdreifachung der DCFDA-Fluoreszenz zeigten, war die Zunahme bei HUVEC-Zellen (humane Endothelzellen) deutlich geringer; auch bei hohen Konzentration kommt es nur zu einer Verdopplung des Fluoreszenzsignals. Es zeigte sich also in der Induktion der ROS-Produktion ein deutlicher Unterschied zwischen Knoblauchsaff und Allicin: Während die ROS-Produktion nach Allicinbehandlung, auch bei hohen Konzentrationen, eher gering war, erfolgte nach Behandlung mit Knoblauchsaff eine starke Ansammlung Reaktiver Spezies.

3.3.3 Nach Allicinexposition sinkt die Proliferationsrate deutlich ab

Um zu testen, ob die gemessenen physiologischen Faktoren Redoxzustand und ROS-Akkumulation sich widerspiegeln in einer veränderten Proliferationsrate, wurde diese durch einen Inkorporierungsversuch mit Tritium-gelabeltem Thymidin (^3H -Thymidin-Assay) durchgeführt. Es zeigten sich zwischen den unterschiedlichen Zell-Linien deutliche Unterschiede hinsichtlich der Proliferation in den unbehandelten Kontrollen (Siehe Abbildung 53). Während 3T3 Zellen die stärkste Proliferationsrate zeigten, ist die Proliferationsrate von HUVEC-Zellen viel geringer. Die anderen, in die Untersuchung einbezogenen Zell-Linien zeigten eine intermediäre Wachstumsrate zwischen unbehandelten Kontrolle zwischen diesen beiden Extremwerten. Auffällig ist, dass sich die unterschiedlichen Zell-Linien in diesem Faktor erheblich voneinander unterscheiden.

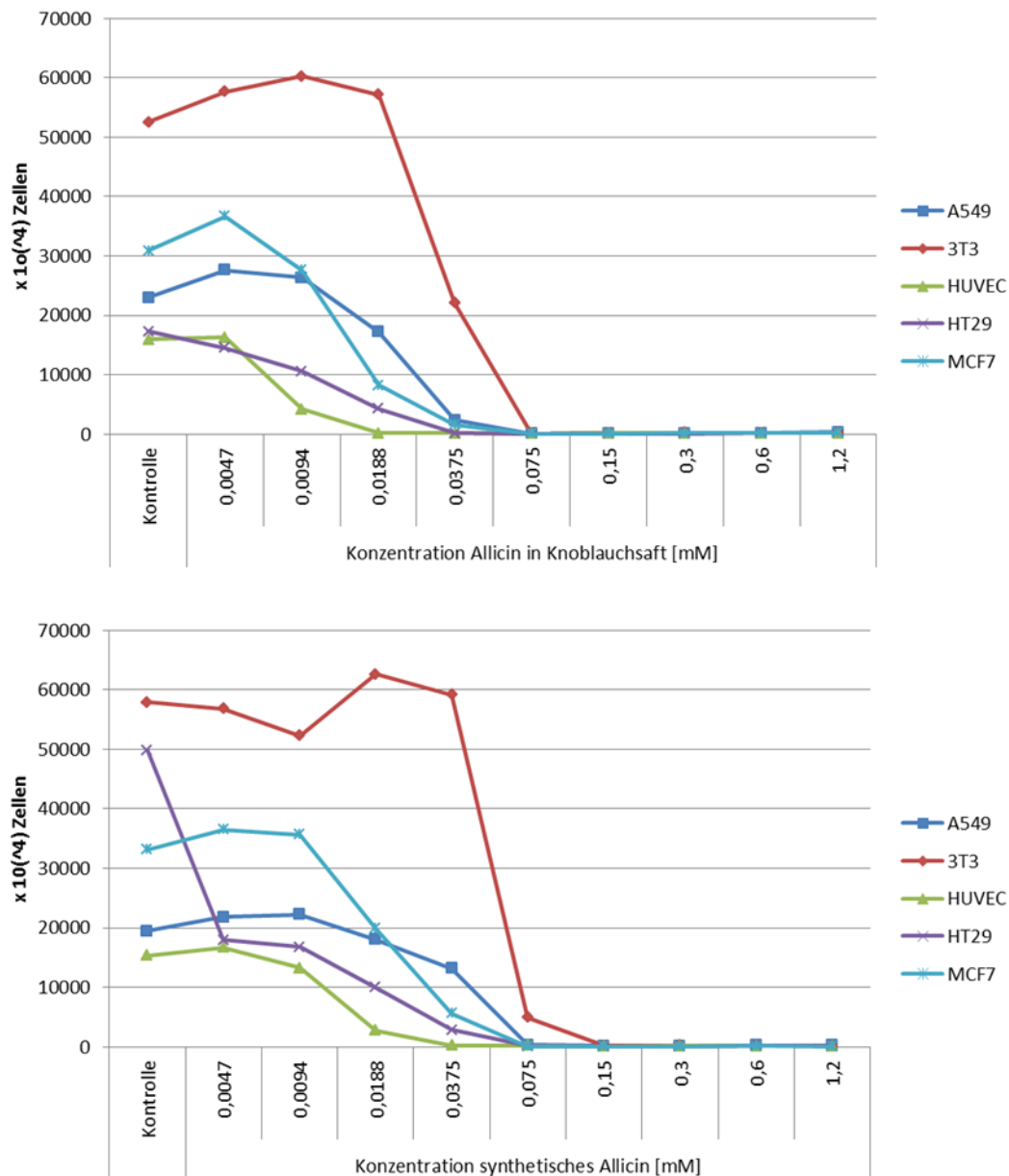


Abbildung 53: Zellproliferation mittels ³H-Thymidin-Assay

Allicin und Knoblauchsaft inhibiert die Proliferation von verschiedenen Zelllinien. Bereits in der unbehandelten Kontrolle waren deutliche Unterschiede hinsichtlich der Proliferationsrate zwischen den einzelnen Zell-Linien zu beobachten. Während 3T3 Zellen stark proliferierten, war die Rate der unbehandelten Kontrolle von HUVEC und A549 Zellen markant geringer. Eine Behandlung mit Allicin, entweder in Form von Knoblauchsaft oder als chemisch synthetisierte Reinsubstanz, führte zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Zellproliferation nach 24 Stunden. Bei einer Konzentration von 0,075 mM wurde die Zellproliferation in allen Zell-Linien (mit Ausnahme von 3T3 bei Behandlung mit chemisch reinem Allicin, wo eine geringfügige Proliferationsaktivität zu beobachten war) vollständig inhibiert. Die dargestellten Werte entsprechen dem Mittelwert aus drei technischen Replikaten. Details zur experimentellen Durchführung des Experimentes sind in Kapitel 2.9.7. gegeben.

Auffällig war, dass bei fast allen Zelllinien (mit Ausnahme von HT-29) niedrige Allicin-Konzentrationen zu einer geringfügigen Stimulation der Zell-Proliferation zeigten, ein Effekt der häufig für toxische Substanzen beobachtet wird und in dem Begriff Hormesis beschrieben wird. Allicin bedingte eine konzentrationsabhängige Inhibition der Zellproliferation. Sowohl Knoblauchsaff als auch chemisch synthetisiertes Allicin inhibierten die Proliferation der unterschiedlichen Zell-Linien ab einer Konzentration von 0,075 mM (75 μ M) vollständig; einzig bei einer Behandlung mit chemisch synthetisiertem Allicin zeigte die 3T3-Zell-Linie eine minimale Proliferation bei Behandlung mit dieser Konzentration. Diese inhibierende Konzentration korrelierte mit der Oxidation von Glutathion, wie es im Biman-Assay bestimmt wurde.

3.3.4 Allicin-exponierte Zellen haben eine drastisch reduzierte Überlebensrate

Neben der Inhibition der Zellproliferation sollte auch getestet werden, ob Allicin die Überlebensrate der Zellen beeinflusst. Daher wurde getestet, inwieweit die beobachteten Effekte auf den Thiolstatus und die Akkumulation Reaktiver Spezies sich widerspiegeln in der Überlebensrate der Zellen. Zur Quantifizierung der Zellproliferationsrate wurde der Tetrazolium-Farbstoff MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid) verwendet, der nach Reduktion (z.B. durch mitochondriale Reduktasen) zu einem rot-violetten, wasserunlöslichen Formazan umgesetzt wird. Die Beeinflussung der Proliferation kann erfolgen, indem die Absorption des in DMSO gelösten Formazansalzes bei einer Absorption von 550 nm in behandelten Proben verglichen wird mit der unbehandelten Kontrolle. Nähere Details zur experimentellen Prozedur ist in Kapitel 2.9.5 gegeben.

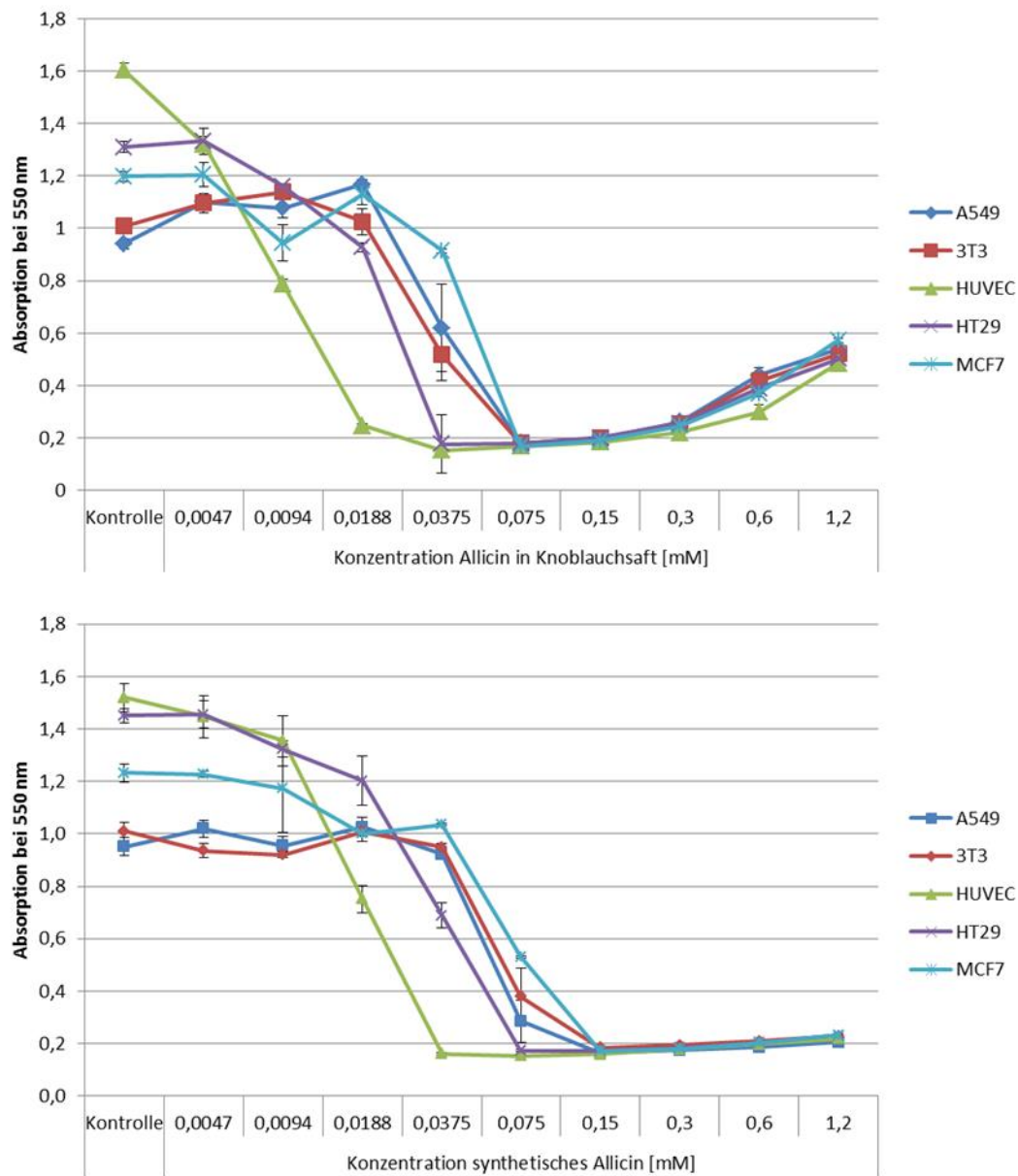


Abbildung 54: MTT-Assay der unterschiedlichen getesteten Zelllinien bei Behandlung mit Knoblauchsaft bzw. Allicin

Die Behandlung sowohl mit Knoblauchsaft als auch mit synthetischem Allicin verringerte den Umsatz des MTT-Farbstoffes, was einen Rückschluss auf metabolische Aktivität erlaubt und somit auf die Vitalität der Zellen zurückschließen lässt. Die Absorption bei 550 nm nahm mit zunehmender Allicin-Konzentration ab, sowohl in Form von chemisch synthetisiertem Allicin oder in Form von Knoblauchsaft. Ein Minimalwert wurde bei 0,075 mM Allicin in Knoblauchsaft bzw. 0,15 mM chemisch synthetisiertem Allicin erreicht; bei Knoblauchsaft ist dieser Minimalwert für HUVEC und HT29 bei 0,0375 mM bzw. 0,075 mM bei den übrigen Zell-Linien erreicht. Dies legt nahe, dass Knoblauchsaft im Vergleich zu chemisch-synthetisiertem Allicin einen stärkeren Effekt auf die Proliferationsrate hat.

Wie in Abbildung 54 dargestellt, zeigte sich in unbehandelten Kontrollen ein deutlicher Unterschied in der Umsetzung von MTT zwischen den getesteten Zelllinien, was für eine unterschiedliche metabolische Aktivität der jeweiligen Zelllinien spricht. Darüber hinaus ist aber die Beeinflussung des MTT-Umsatzes durch Allicin zwischen den verschiedenen Zelllinien unterschiedlich. Am deutlichsten ist die Auffälligkeit der HUVEC-Zelllinie, die sowohl bei Knoblauchsaff wie auch bei Allicin einen deutlich geringeren MTT-Umsatz als Maß für die Vitalität der Zellen aufwies als die übrigen Zellen, was für eine erhöhte Suszeptibilität von HUVEC gegenüber MTT sprechen würde. Die übrigen Zelllinien verhielten sich etwa vergleichbar, wobei die Streuung bei synthetisch hergestelltem Allicin geringer ist als bei einer Behandlung mit Allicin in Form von Knoblauchsaff. Alle Zelllinien wurden bei Knoblauchsaff bei einer Konzentration von 0,075 mM (=75 µM) maximal gehemmt, eine maximale Hemmung ist bei Allicin bei einer Konzentration von 0,150 mM (=150 µM) erreicht.

3.3.5 Beeinflussung der Überlebensrate durch Allicinexposition und Abschätzung der Apoptose-induktion

Der Farbstoff YOPRO-1 wird als ein Indikator für die Induktion von Apoptose verwendet; er ist für lebendige intakte Zellen impermeabel; im Gegensatz dazu ist er in der Lage, nach Induktion der Apoptose, die mit einer Zerstörung der Zellmembran einhergeht, in die Zelle einzudringen und dort Fluoreszenz der Zelle zu bedingen.

Wenngleich es ein erstes Indiz ist, kann YOPRO nicht als abschließender Beweis für die Induktion von Apoptose herangezogen werden.

Aus verschiedenen Studien mit unterschiedlichen Zelllinien ist bekannt, dass Allicin Apoptose zu induzieren in der Lage ist. In diesem Versuch sollte nun überprüft werden, ob es Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Zell-Linien gibt hinsichtlich der Induktion von Apoptose und ferner, ob sich die Wirkungen von chemisch synthetisiertem Allicin und auf den Allicingehalt normalisierten Knoblauchsaff unterscheiden. Diese Befunde sind im Zusammenhang mit den Proliferationsassays (³H-Thymidin, CV), dem Vitalitätsassay (MTT) und der Abschätzung der Apoptose-induktion zu sehen. Letztere wurde an zwei Zeitpunkten gemessen: 30 und 60 Minuten nach Behandlung mit Allicin in Form von Knoblauchsaff bzw. chemisch synthetisiertem Allicin.

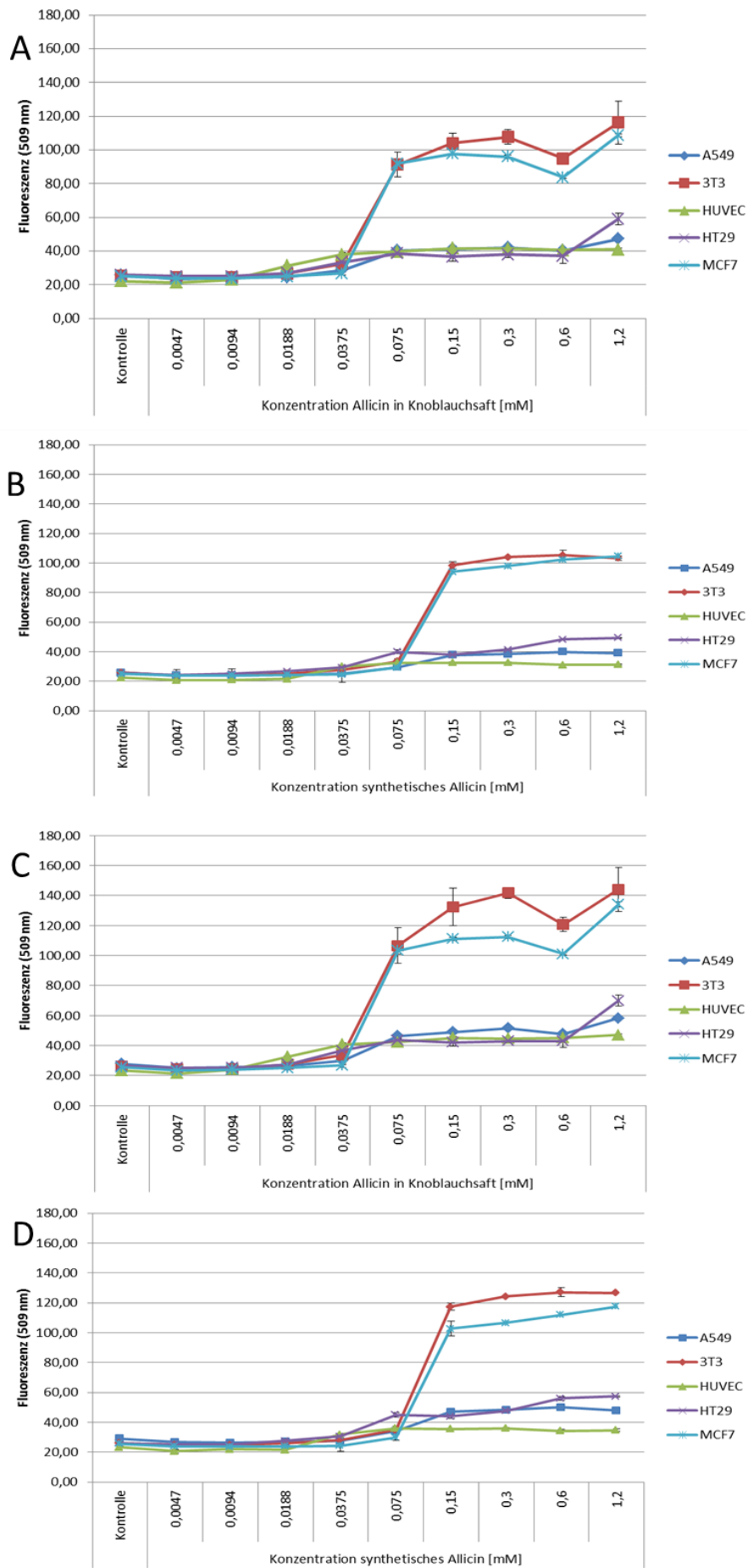


Abbildung 55: YOPRO-1 Assay zur Abschätzung der Apoptose-Induktion in Zelllinien nach Behandlung mit Knoblauchsaff bzw. synthetischem Allicin 30 Minuten (A + B) bzw. 60 Minuten (C+D) nach Behandlung

Für die Zelllinien A549, HUVEC und HT29 war bei Behandlung mit beiden Formen des Allicins und zu beiden Zeitpunkten eine nur sehr marginale Zunahme der YOPRO-Fluoreszenz im getesteten Konzentrationsbereich zu beobachten, was nahelegt, dass Allicin in den getesteten Konzentrationen keine mit YOPRO-1 nachweisbare Apoptose induziert. Im Gegensatz dazu zeigten 3T3 und MCF-7 deutliche Antworten auf die Gabe von Allicin nach einer Behandlung mit 0,037 mM (37,5 µM) bei Knoblauchsaff bzw. 0,075 mM (75 µM) bei chemisch synthetisiertem Allicin. Diese Antwort war bereits nach 30 Minuten zu beobachten und erhöhte sich 60 Minuten nach Behandlung nochmals.

Deutlich sind bei diesem Assay zwei unterschiedliche Tendenzen zu beobachten (vgl. Abbildung 55), wobei sich Allicin und Knoblauchsaff weitestgehend analog verhalten (wenngleich Knoblauchsaff bereits bei geringeren Konzentrationen (0,0375 mM = 37,5 µM) als chemisch synthetisiertes Allicin (0,075 mM = 75 µM) eine vergleichbare Aktivität zeigen):

Eine Zunahme der YOPRO-bedingten Fluoreszenz war nur marginal bei den Zelllinien A549, HUVEC und HT29 zu beobachten für beide Darreichungsformen des Allicins und zu beiden gemessenen Zeitpunkten (30 und 60 Minuten nach Behandlung). Im Gegensatz dazu zeigten 3T3 und MCF7 eine deutliche Zunahme der Fluoreszenz als Indikator für die Induktion der Apoptose nach Allicinbehandlung zu beiden Zeitpunkten. Die Schwellenkonzentrationen sind die bereits genannten 37,5 µM für Knoblauchsaff und 75 µM für synthetisches Allicin. Dieser Effekt war bereits nach 30 Minuten zu beobachten und verstärkte sich nach 60 Minuten.

Diese Ergebnisse legen also einen Unterschied hinsichtlich der Induktion von Apoptose nach Behandlung mit Allicin zwischen verschiedenen Zelllinien nahe.

3.4 Untersuchungen zur Phytotoxizität des Allicins am Beispiel von *Arabidopsis thaliana*

3.4.1 Allicin beeinflusst die Keimungsrate von *Arabidopsis*-Pflanzen

Allicin beeinflusst verschiedene physiologische Vorgänge in der Zelle, beispielsweise Prozesse, die in Verbindung zu oxidativem Stress stehen. Ziel dieses Ansatzes war es, Mutanten zu identifizieren, die unterschiedlich stark auf die Behandlung mit Allicin reagierten. In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob Allicin die Keimung von *Arabidopsis* inhibiert und ob Mutanten, die im zellulären Redoxhaushalt bzw. im Salicylsäure- oder Jasmonatstoffwechsel verändert sind, unterschiedlich zum Wildtyp reagieren. Salicylsäure und Jasmonat sind bedeutende Signalmoleküle der Stressabwehr.

Es wurde die Zahl der gekeimten bzw. ungekeimten Samen gezählt und der prozentuelle Ansatz von gekeimten Samen daraus berechnet.

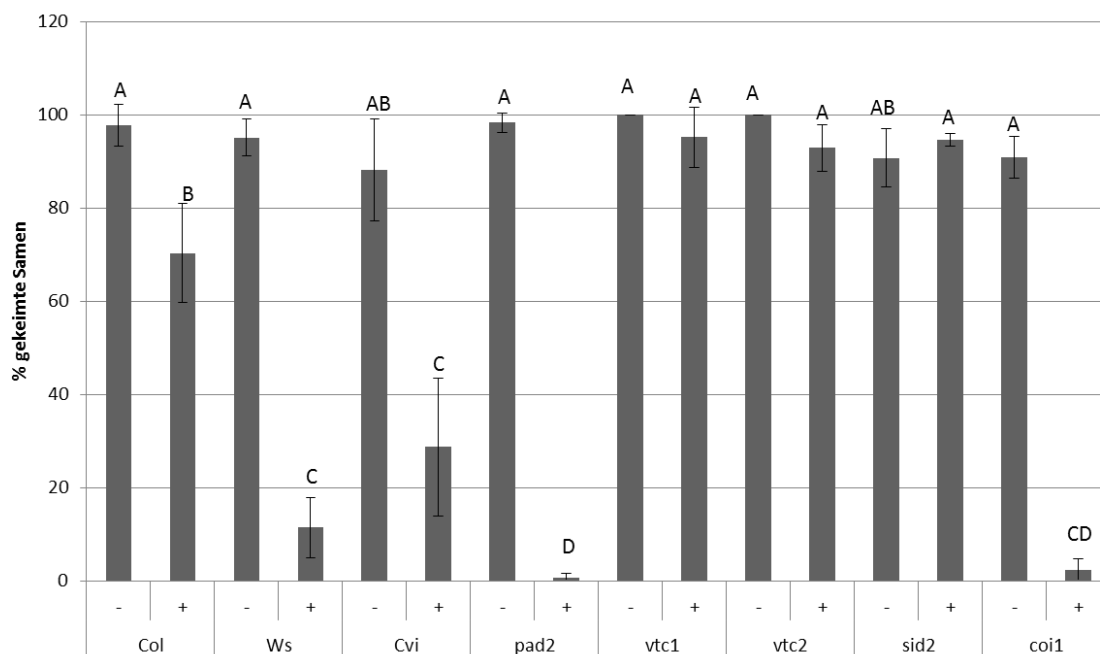


Abbildung 56: Keimung nach 3 Tagen, 2 mg mL^{-1} Allicin ($12,4 \text{ mM}$). Sterne repräsentieren einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen unbehandelter Kontrolle und behandelten Pflanzen.

Verglichen wurde der Wildtyp Col-0 mit den Wildtypen Ws-0 und Cvi. Die Mutanten (*pad2*, *vtc1*, *vtc2*, *sid2*, *coi1*) sind im Col-0 Hintergrund. Pro Behandlung und Genotyp wurden mindestens 200 Samen ausgezählt. Es zeigt sich, dass Allicin die Keimungsrate von Col-0 statistisch signifikant reduziert (etwa um 30 %). Cvi und Ws-0 sind jedoch noch sensitiver, so dass sich festhalten lässt, dass bereits zwischen den unterschiedlichen Wildtypen ein erheblicher Unterschied besteht bezüglich der Resistenz gegenüber Allicin. Bei den Mutanten fällt besonders auf, dass die *pad2* (Glutathion-Biosynthese) Mutante beinahe vollständig in ihrer Keimung bei Behandlung mit Allicin inhibiert wird. Im Gegensatz dazu ist die Keimungsrate unter Allicinexposition bei *vtc1*, *vtc2* (Ascorbatbiosynthese) und *sid2* (Salicylsäurebiosynthese) deutlich höher, während eine Jasmonat-Perzeptionsmutante (*coi1*) wiederum sensitiver ist als der zugrunde liegende Wildtyp Col-0.

Detaillierte Angaben zur Methode sind unter Punkt 2.10.3 gegeben. Ein Test auf statistische Signifikanz erfolgte mittels ANOVA (Holm-Šidák-Methode; $p < 0,05$). Die angegebenen Werte entsprechen dem Mittelwert aus drei unabhängigen Ansätzen innerhalb eines Versuchs, wobei jeweils 100 Samen ausgerechnet wurden. Der Versuch wurde zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

Es zeigt sich, dass im Referenzgenotyp Col-0 die Rate von gekeimten Samen in der unbehandelten Kontrolle bei ~ 95 % liegt. Werden die Samen in Anwesenheit von 12,4 mM chemisch synthetisiertem Allicin inkubiert, so sinkt die Keimrate signifikant auf ~70 %.

Die Samen stammten allesamt aus einer Nachzucht, die etwa zeitgleich geerntet wurde und hatten somit das gleiche Alter, so dass Unterschiede in der Keimung nicht auf das Alter des jeweiligen Saatguts zurückgeführt werden kann. Bei den unbehandelten Kontrollen der jeweiligen Genotypen zeigen sich keine deutlichen Unterschiede in der Keimungsrate der jeweiligen Genotypen.

Um zu testen, ob es auch zwischen verschiedenen Ökotypen Unterschiede hinsichtlich der Resistenz gegenüber Allicin gibt, wurde der Wildtyp Wassilewskija (Ws-0) herangezogen. Auch hier hat die unbehandelte Kontrolle eine Rate von ungekeimten Samen von ~5 %; bei Allicinexposition ist die Rate von gekeimten Samen bei Ws-0 signifikant geringer im Vergleich zu Col-0, was einen Unterschied hinsichtlich der Allicin-Resistenz zwischen verschiedenen Wildtyp-Akzessionen von *Arabidopsis* nahelegt. Der Wildtyp Cvi zeigt einen intermediären Phänotyp: Zwar weist diese Akzession eine geringere Keimrate bei Behandlung mit Allicin als Col-0 auf, jedoch eine höhere als Ws-0.

Neben diesen drei Wildtyp-Akzessionen wurden verschiedene Mutanten getestet, die in Genen mutiert sind, die für an der allgemeinen Stressresistenz beteiligte Proteine codieren. Den deutlichen Effekt zeigt Allicin bei der *pad2* Mutante, die für eine am Glutathionstoffwechsel beteiligte γ -Glutamylcysteinylase codiert. Eine Behandlung mit 12,4 mM Allicin führt zu einer nahezu vollständigen Keimungsinhibition, was eine Beteiligung von Glutathion an der Resistenz gegenüber Allicin nahelegt. Im Gegensatz dazu werden Mutanten, die im Vitamin C-Metabolismus (*vtc1* und *vtc2*) beteiligt sind, von dieser Konzentration Allicin hinsichtlich ihrer Keimung weniger beeinflusst als der Col-0 Wildtyp, auf dessen Hintergrund die Mutanten sind. Ähnliches zeigt sich für die *sid2*-Mutante, die an der Signalweiterleitung von Salicylsäuresignalen beteiligt ist. Auch diese Mutante ist hinsichtlich ihrer Keimung resistenter gegen Allicin als der Wildtyp.

Eine Coronatin-insensitive Mutante (*coi1*), die bedeutsam ist für die Signalweiterleitung im Jasmonat-Signalweg ist hypersensitiv verglichen zum Wildtyp nach Allicinbehandlung. Dies zeigt eine Beteiligung von Jasmonat an der Resistenz gegen Allicin.

3.4.2 Allicin führt zu einer starken Veränderung der Wurzelmorphologie durch Veränderung der Auxin-Verteilung

Wenngleich die Keimungsinhibition deutlich macht, dass Allicin toxische Effekte auf Pflanzen hat, wurden weitere Tests durchgeführt, um die Wirkung von Allicin auf Pflanzen besser zu verstehen. So wurden Samen auf ein Filterpapier ausgebracht, das auf Hoagland-medium gelegt wurde, so dass die Samen auskeimen konnten. Nach Stratifikation und zwei Tagen unter Kurztagbedingungen wurde das Filterpapier abgenommen und ein weiteres Filterpapier daruntergelegt, das mit einer Allicin-Lösung (12,4 mM) getränkt war. Auf diese Weise konnte das weitere Wachstum der Pflanzen beobachtet werden.

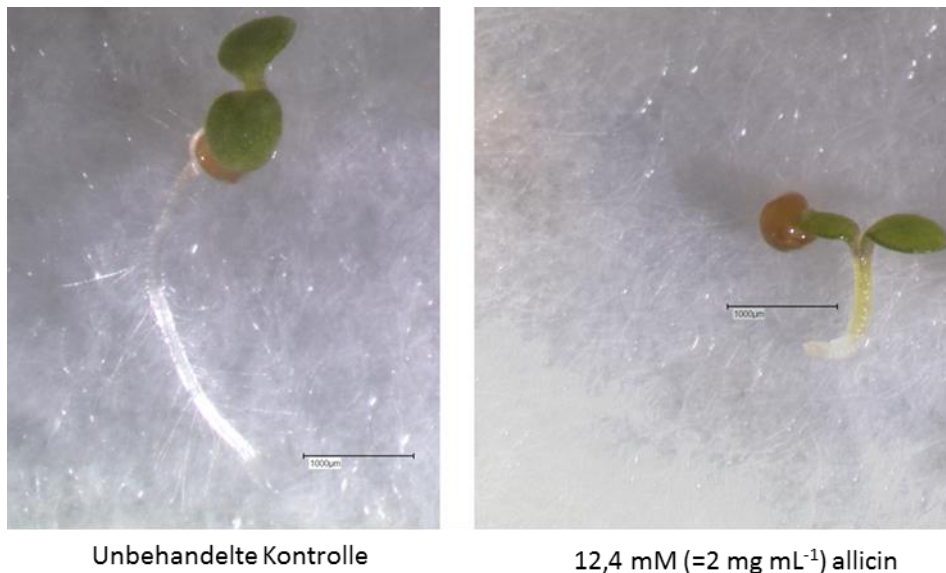


Abbildung 57: Einfluss von chemisch synthetisiertem Allicin auf die Entwicklung von Arabidopsis-Keimlingen

Arabidopsis-Keimlinge wurden für 2 Tage stratifiziert und zwei weitere Tage unter Kurztagbedingungen auf einem Filterpapier kultiviert, das auf einer Hoaglandagar-Platte lag. Anschließend wurde das Filterpapier abgenommen, damit darunter ein mit 700 µL Allicinlösung (12,4 mM) getränktes Filterpapier gelegt werden konnte. Nach weiteren 2 Tagen erfolgte die Auswertung der morphologischen Änderungen. Es zeigt sich deutlich, dass Allicin die Wurzelbildung inhibiert, während die Sprossentwicklung nicht beeinflusst wird. Die Wurzeln der allicinbehandelten Pflanzen sind kürzer und bilden keine Wurzelhaare aus, die in Kontrollpflanzen deutlich zu erkennen sind.

Es zeigen sich bei Behandlung mit Allicin deutliche Effekte auf die Morphologie der Pflanze. Während die Entwicklung des Sprosses weitgehend nicht beeinflusst wird, bewirkt Allicin eine deutliche

Verkürzung der Wurzel sowie eine Unterdrückung der Ausbildung von Wurzelhaaren, die in der Kontrollbehandlung deutlich zu erkennen sind.

Um zu überprüfen, was die Ursache für diese Beobachtung ist, wurden weitergehende Versuche gemacht, in denen

- in einem genetischen Ansatz getestet wurde, ob klassische Redox- bzw. Stresssignalwegmutanten Unterschiede hinsichtlich der Beeinflussung des Wurzelphänotypen aufweisen,
- in zellbiologischen Ansätzen mögliche Mechanismen der Allicinwirkung (Cytoskelett und Auxinverteilung) beleuchtet wurden.

Zunächst wurden Wurzellängen bei verschiedenen Arabidopsis-Mutanten bestimmt, die nach Stratifikation für 24 Stunden unter Kurztagbedingungen kultiviert wurden. Sofort anschließend wurde Allicin appliziert. Nach weiteren 48 Stunden wurden die Platten fotografiert und anschließend die Wurzellängen unter Zuhilfenahme des Computerprogrammes ImageJ bestimmt.

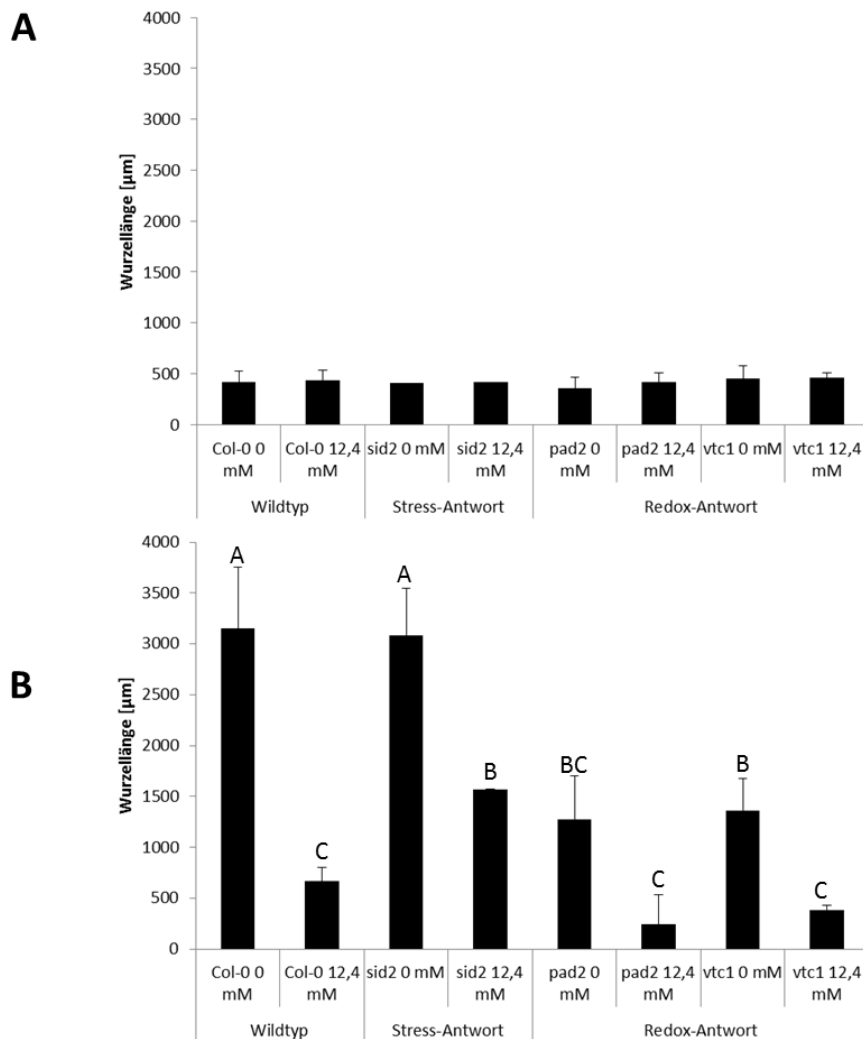


Abbildung 58: Einfluss von Allicin auf die Wurzelentwicklung verschiedener Arabidopsis-Mutanten

Arabidopsis-Keimlinge wurden für 2 Tage stratifiziert und einen Tag unter Kurztagbedingungen auf einem Filterpapier kultiviert, das auf einer Hoaglandagar-Platte lag. Anschließend wurde das Filterpapier abgenommen, damit darunter ein mit 700 µL Allicinlösung (12,4 mM) getränktes Filterpapier gelegt werden konnte. Die Auswertung erfolgte direkt nach Behandlung (A) und nach 48 Stunden (B). Dazu wurden die Platten fotografiert und die Wurzellängen mit Hilfe des Programmes ImageJ und eines mitfotografierten Referenzmaßstabs bestimmt. Statistische Unterschiede zwischen der Wildtyp-Behandlung und den Mutanten wurde mittels t-Test ($p < 0,05$) bestimmt. Der Versuch wurde zweimal wiederholt mit vergleichbaren Ergebnissen.

Zunächst wurden die Wurzellängen von behandelten und unbehandelten Keimlingen bestimmt, wobei zwischen allen Genotypen und Behandlungen kein Unterschied besteht. Eventuell zum Zeitpunkt $t=48$ Stunden beobachtete Unterschiede innerhalb der Mutanten sind also nicht auf initiale Wachstumsunterschiede zurückzuführen.

Es zeigt sich in Übereinstimmung mit den vorangegangenen Experimenten, dass eine Behandlung von Col-0 mit 12,4 mM Allicin zu einer deutlichen Unterdrückung der Wurzellängen führt. Die unbehandelten Kontrollen von Col-0 und *sid2* unterscheiden sich nicht signifikant, im Gegensatz zu *pad2*, die eine signifikant geringere Wurzellänge als Col-0 bei der unbehandelten Kontrolle aufweist.

Im Gegensatz dazu ist die durchschnittliche Wurzellänge nach Allicinbehandlung bei *sid2* statistisch signifikant größer im Vergleich zum Col-0 Wildtyp. Die Glutathionmangelmutante *pad2* wie auch die Vitamin-C-defiziente *vtc1* Mutante zeigen nach 48 Stunden signifikant kürzere Wurzeln als der Wildtyp bei entsprechender Behandlung.

Die Beeinflussung des Wurzelwachstums durch Allicin ist also beeinflusst sowohl durch Redoxfaktoren wie Glutathion als auch durch Salicylsäure.

Bedeutsam für die Entwicklung von Wurzeln ist ferner das Phytohormon Auxin, das mit genetisch codierten Sensoren *in vivo* nachgewiesen werden kann. Die Verteilung des Auxins ist entscheidend für die Wurzelentwicklung und andererseits eng korreliert mit der Redoxumgebung der Zelle.

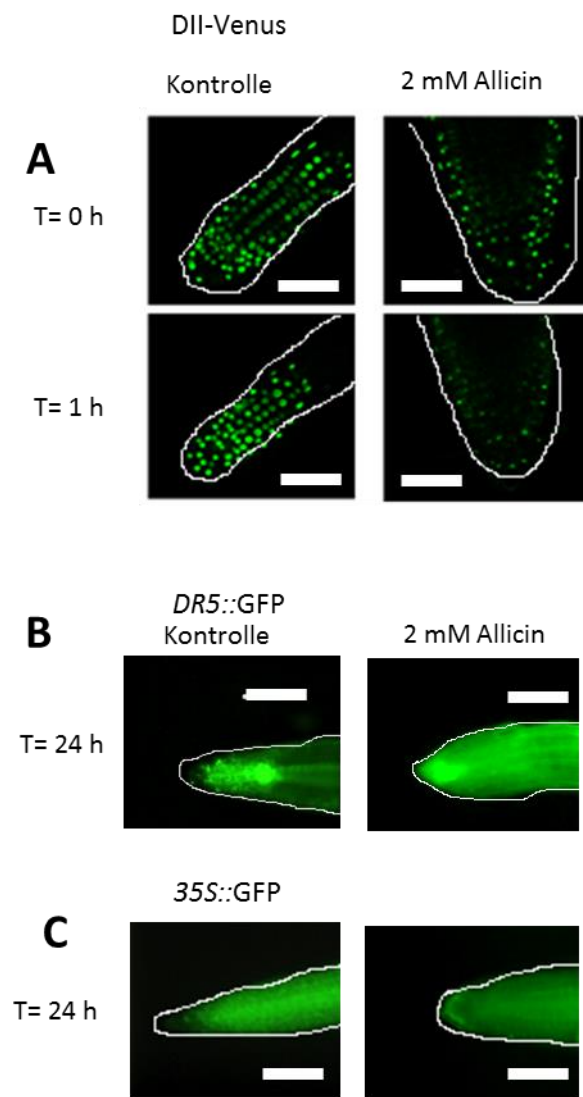


Abbildung 59: Wirkung von Allicin auf die Auxinverteilung und Auxinakkumulation in Arabidopsis-Wurzeln, gezeigt mit DII-Venus und DR5:GFP Konstrukten (600x; Wasserimmersion)

- (A) Das DII-Venus-Konstrukt ist ein Proteinkonstrukt mit geringer Halbwertszeit, so dass eine hohe Zeitauflösung erreicht werden kann. Änderungen der Auxinkonzentration spiegeln sich in veränderter Fluoreszenzintensität wider. Mit höherer Auxinkonzentration nimmt die Fluoreszenz ab. Es zeigt sich, dass bereits nach einer Stunde Inkubation in Anwesenheit von Allicin die Fluoreszenz des YFP in den Allicin-behandelten Kontrollen abnimmt, während in der Kontrolle die Fluoreszenzintensität vergleichbar bleibt. Die Größenmarkierung entspricht 100 μm . Zur besseren Erkennbarkeit sind die Wurzeln mit einer weißen Linie umzeichnet.
- (B) In DR5:GFP Pflanzen zeigt sich eine deutliche Akkumulation von Auxin um die quieszente Zone und die Wurzelspitze sowie eine Verteilung im Zentralzylinder der Wurzel und den äußeren Zellen der Wurzel. Bei einer Inkubation in Anwesenheit von Allicin wird diese klare Lokalisation des Auxins aufgehoben und Auxin ist in der gesamten Wurzelspitze weitgehend diffus verteilt. Weil Auxin auf die Regulation der Wurzelentwicklung einen starken Einfluss nimmt, könnte man annehmen, dass Auxin durch die Behandlung mit Allicin verändert lokalisiert ist. Die strikte Lokalisation des Auxins ist bei Behandlung mit Allicin aufgehoben. Die Größenmarkierung entspricht 100 μm . Zur besseren Erkennbarkeit sind die Wurzeln mit einer weißen Linie umzeichnet.

3.4.3 Allicin bewirkt ein Ausbleichen von Blattorganen

Neben der Wirkung auf die Wurzeln wurde darüber hinaus beobachtet, dass Allicin zu einem Ausbleichen chlorophyllhaltiger Organe führt.



Abbildung 60: Ausbleichen von Col-0 Keimlingen, die auf Hoagland-medium kultiviert wurden, in das 0,5 mM Allicin inkorporiert wurde

Keimlinge werden für 2 Tage stratifiziert und für weitere 2 Tage unter Kurztagbedingungen auf Hoaglandagar (25 mL) kultiviert, bevor sie für 48 h auf eine andere Hoaglandplatte übertragen werden (Kontrolle) bzw. auf eine Platte, in deren Hoaglandmedium 0,5 mM Allicin als finale Konzentration inkorporiert wurde. Während nach 24 Stunden Keimlinge in der unbehandelten Kontrolle normale Entwicklung zeigen mit deutlichem Wurzelwachstum und grüner Färbung der Kotyledonen, ist die Wurzelentwicklung von Pflanzen, die auf allicinhaltigem Medium kultiviert wurden, deutlich reduziert; zudem ist die Mehrzahl der Pflanzen ausgebleicht.

Da das Ausbleichen von Pflanzen ein typisches Symptom oxidativen Stresses darstellt, sollte diese Beobachtung detaillierter untersucht werden, indem photosynthetisch aktives Gewebe der Pflanze definiert mit Allicin behandelt wird. Zuvor war festgestellt worden, dass Blattorgane nur ausbleichen, wenn sie mit Allicin direkt in Kontakt kommen.

Dazu wurde der s.g. „Floating-Leaf Assay“ verwendet, bei dem mit einem Korkbohrer Explantate aus Blättern ausgestanzt werden und auf flüssiges Medium gesetzt werden, dem eine Testsubstanz

zugegeben wurde. Vorteil der Methode ist, dass eine gleiche Menge an Blattmaterial in den Test eingeht.

Nachfolgend kann durch einfache ethanolische Extraktion photometrisch der Gehalt an Chlorophyll bestimmt werden.

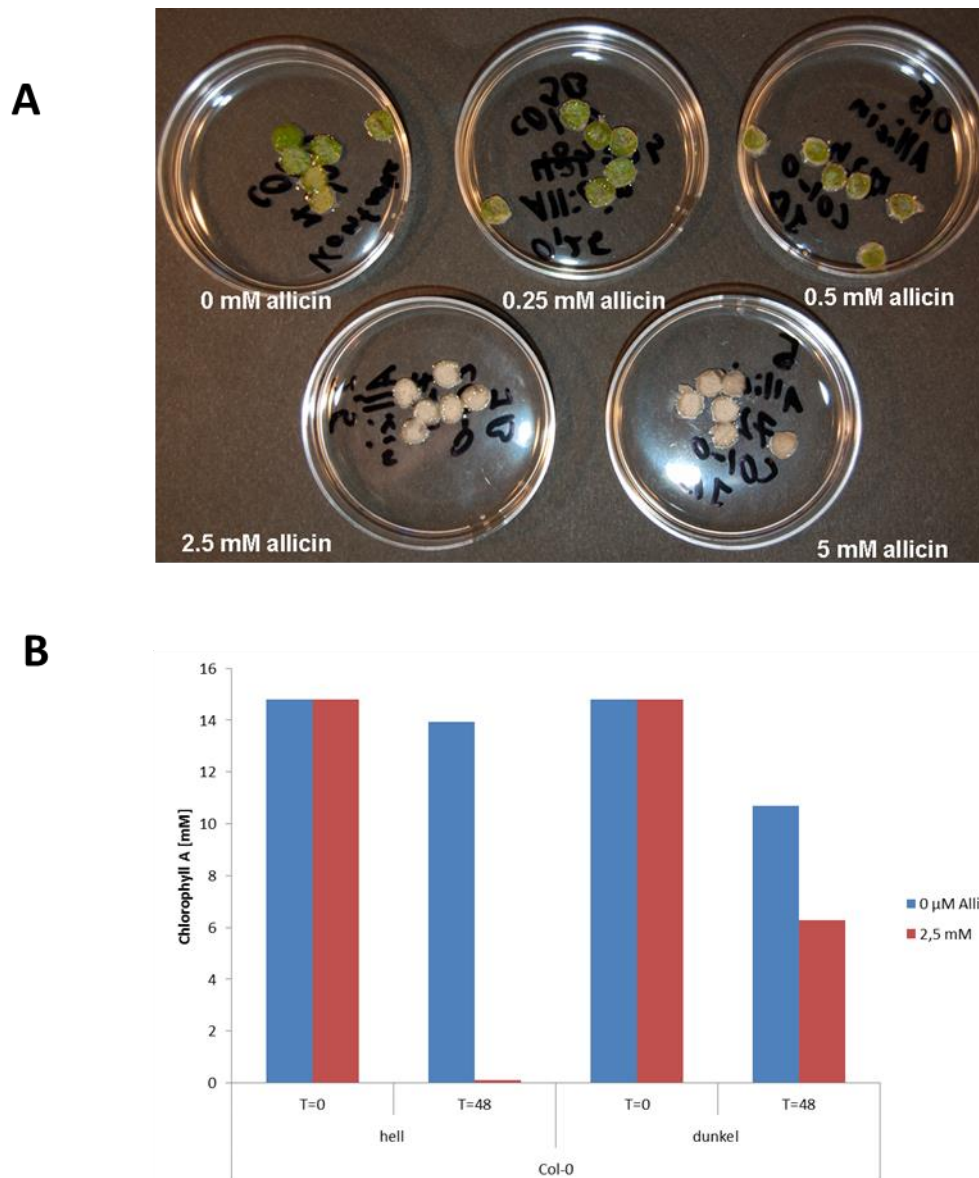


Abbildung 61: Allicin führt zu einem lichtabhängigen Ausbleichen von Blattexplantaten im „Floating-Leaf Assay“

- (A) Der Chlorophyllgehalt von Blattexplantaten im Floating-Leaf Assay nimmt abhängig von der Konzentration an eingesetztem Allicin ab. Die hier gezeigten Blattexplantate stammen vom Wildtyp Col-0 und sind 48 h nach Versuchsbeginn fotografiert.
- (B) Chlorophyll wurde aus Blattexplantaten extrahiert, die entweder vom Wildtyp Col-0 oder der davon abgeleiteten Glutathionmangelmutante *pad2* stammen. Ferner wurden die Ansätze entweder für 48 h im Dauerlicht bzw. bei gleicher Temperatur im Dunkeln inkubiert. Allicin führt lichtabhängig zu einer deutlichen Abnahme des Chlorophyllgehalts in Blättern, während die Kontrolle im Hellen nur eine minimale Abnahme des Chlorophyllgehaltes, im Dunkeln eine geringfügig stärkere Abnahme aufweist. Die gezeigten Daten wurden gewonnen aus je fünf Blattexplantaten, deren Chlorophyllgehalt in einem Ansatz gemessen wurde (Versuchsteil B wurde durchgeführt von Jan Behr im Rahmen seiner Bachelorarbeit).

Es zeigt sich, dass Allicin konzentrationsabhängig auch in diesem Assay ein Bleichen der Blattscheiben im Floating-Leaf Assay hervorruft. Die beispielhaft gezeigten Daten für eine Exposition gegenüber 2,5 mM führen zu einem vollständigen Verlust an Chlorophyll A bei Inkubation im Licht; werden die Blattexplantate im Dunkeln inkubiert, ist bei der unbehandelten Kontrolle ein Verlust an Chlorophyll zu beobachten. Interessanterweise jedoch ist die Abnahme bei Behandlung mit Allicin weniger stark als bei Blattexplantaten, die im Hellen inkubiert wurden, woraus geschlossen wurde, dass die

4 Diskussion

4.1 Etablierung einer Allicinsynthese als Voraussetzung für die Arbeit

Um die physiologischen Effekte von Allicin als bioaktive Komponente von Knoblauch eingehend studieren zu können, ist es notwendig, neben der natürlichen Präparation in Form von Knoblauchsaff oder einem Etherextrakt aus Knoblauch (vgl. (Bat-Chen et al., 2009)) auch die chemisch reine Verbindung als Referenzsubstanz für Versuche zur Verfügung zu haben. Knoblauchsaff ist ein komplexes Gemisch verschiedenster Primär- und Sekundärmetaboliten sowie Zellbestandteilen (Proteinen, Zuckerpolymere etc.), so dass ein beobachtbarer physiologischer Effekt nicht notwendigerweise auf eine einzelne Komponente zurückzuführen ist, sondern auf der Summe verschiedener Substanzen bzw. synergistischen Effekten beruhen kann. Bei den Proteinen, die in Knoblauchsaff enthalten sind, ist neben der Alliinase besonders eine Klasse aus Mannose-bindenden Lektinen (Dam et al., 1998) erwähnenswert, die quantitativ bedeutsam sind und möglicherweise an den physiologischen Effekten des Knoblauchsaffs beteiligt sein könnten. Deshalb ist es, wie für alle Naturstoffe, notwendig, die Effekte auf entweder hoch aufgereinigte bzw. synthetisch hergestellte Einzelkomponenten zurückzuführen (Newman und Cragg, 2007). Damit das möglich ist, wurde in unserem Labor eine Synthesestrategie etabliert, die es ermöglicht, die biologischen Eigenschaften der Reinsubstanz Allicin zu studieren.

Im Gegensatz zur Biosynthese von Allicin in der Zelle, die Alliin in einem enzymatisch katalysierten Schritt zu Allylsulfensäure umsetzt, die anschließend spontan zu Allicin kondensiert, wird die chemische Synthese durch Oxidation von Diallyldisulfid durchgeführt (Lawson und Wang, 2001). Die Syntheseprozedur ist als Einscritt-Reaktion einfach durchzuführen und bedarf nur weniger, unproblematischer Aufreinigungsschritte in Form von Zweiphasenextraktionen (Gruhlke et al., 2010b).

Ein Problem für die Durchführung der Reaktion ist, dass das Edukt Diallyldisulfid aufgrund seiner Syntheseprozedur vom Hersteller nur mit einer garantierten Reinheit von ca. 80% geliefert wird. Diallyldisulfid wird großtechnisch hergestellt durch die Reaktion unter Inertgasbedingungen bei 40-60°C von Allylchlorid mit Natriumdisulfid (NaS_2 , das *in situ* durch Reaktion von Natriumsulfid mit Schwefel bereitgestellt wird (Maloney et al., 2006; Yuan et al., 2006)). Diese Syntheseprozedur bedingt jedoch Kontamination mit anderen Polysulfanen wie Diallylsulfid (DAS) oder Diallyltrisulfid (DATS). Diese Beiprodukte sind – zumal sie selbst eine hohe biologische Aktivität besitzen – für die Synthese des Allicins problematisch und müssen entfernt werden.

Deshalb musste das Edukt vor dem Einsatz in der Synthese aufgereinigt werden. Dies geschah durch Destillation im Hochvakuum mit Unterstützung des Institutes für Makromolekulare Chemie der RWTH Aachen (vgl. Anhang, 7.4) Diallyldisulfid ist im Vergleich zu Allicin wenig reaktiv und lässt sich

daher für einige Zeit im Kühlschrank lagern; erste signifikante Abnahmen an Reinheit des destillierten DADS-Vorrates waren erst nach ca. 2 Jahren zu beobachten.

Mit Unterstützung von Dr. Awais Anwar (EcoSpray Ltd., Norwich) wurde im Labor eine Syntheseprozedur etabliert und routinemäßig durchgeführt, die es erlaubt, Allicin von hoher Reinheit mit akzeptablen Ausbeuten zu erhalten.

Die Aufreinigung erfolgte, indem das Allicin mittels Zweiphasenextraktion mit Dichlormethan aus dem wässrigen Reaktionsansatz ausgeschüttelt wurde. In diese organische Phase geht Peroxyessigsäure über, die sowohl mit Wasser als auch organischen Lösungsmitteln (im Gegensatz zu Essigsäure) mischbar ist. Deshalb ist es nötig, die organische Phase zu neutralisieren. Dies geschieht durch Ausschütteln mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung, wobei Natriumacetat entsteht und CO₂ entweicht. Das Natriumacetat ist nicht in DCM löslich. Anschließend wurde die organische Phase im Rotationsverdampfer eingeeengt.

An dieser Stelle erfolgte eine Testung mittels HPLC, ob noch DADS als ebenfalls hydrophobes Edukt im Reaktionsansatz vorhanden ist. In den meisten durchgeführten Reaktionen war nach der Synthese und einer ersten Zweiphasenextraktion in der HPLC kein Peak für nicht reagiertes Diallyldisulfid mehr nachweisbar. Wurde noch DADS nachgewiesen, wurde dieses entfernt, indem der eingeeengte Reaktionsansatz in ein großes Volumen Wasser aufgenommen und gegen ein kleines Volumen n-Hexan (0,1 Vol-%) ausgeschüttelt wurde. DADS wird sich in der Hexan-Phase wiederfinden und so aus der wässrigen Allicin-Lösung entfernt. Aufgrund der Löslichkeit von Allicin sowohl in wässrigen wie organischen Bedingungen (logP-Wert von Allicin von $1,52 \pm 0,8$ (Slusarenko et al., 2008)), geht jedoch auch ein nicht zu vernachlässigender Teil des Allicins in die Hexan-phase über, so dass dieser Schritt mit erheblichen Verlusten verbunden ist. Dies erklärt die großen Verluste bei manchen Reaktionsansätzen. Konnte in den Reaktionsansätzen kein DADS nachgewiesen werden, wurde deshalb auf den Hexan-Aufreinigungsschritt verzichtet.

Der Nachweis der Reinheit mittels HPLC ist in diesem Falle sehr gut möglich, weil Polysulfane wie DADS als denkbare Verunreinigungen oder Abbauprodukte des Allicins Allylgruppen enthalten und somit bei 254 nm nachgewiesen werden können (vgl. Abbildung 19). Mit dieser Methode nicht nachweisbar sind jedoch Rückstände der Peroxyessigsäure, dem organischen Lösungsmittel oder Wasser. Wasser wird aus dem Reaktionsansatz durch Trocknung über wasserfreiem MgSO₄ entfernt. Um das Vorhandensein der übrigen möglichen Verunreinigungen auszuschließen, wurde ein ¹H NMR durchgeführt. Diese Methode erlaubt es, auf die genannten zusätzlichen Verunreinigungen in der Allicin-Präparation zu schließen (Anhang, 7.3).

Alternativen zum hier angewandten Syntheseverfahren mittels Oxidation von DADS mit Peroxyessigsäure werden verschiedentlich in der Literatur diskutiert, bei der Allicin mittels immobilisierter Alliinase umgesetzt wird (Rabinkov et al., 1998).

Es ist somit in diesem ersten Schritt gelungen, ein Syntheseprotokoll zu entwerfen, das es ermöglicht, mit der Ausstattung eines biologischen Laboratoriums Allicin in ausreichender Menge und Reinheit (>95 % Reinheit in der HPLC) zu erhalten.

Ein weiterer, wichtiger Faktor bei der Verwendung von reinem Allicin ist seine Lagerung. Weil Allicin mit sich selbst in einer Kinetik erster Ordnung reagiert, ist Allicin in unverdünnter Lösung instabil. Nach 16 Stunden reagiert Allicin bei Raumtemperatur als Reinsubstanz zu Folgeprodukten, bei -70°C nach 25 Tagen (Koch und Lawson, 1996). In verdünnter wässriger Lösung (0,1 -2 mg mL⁻¹ Allicin) beträgt der Zeitraum, indem die Hälfte des Allicins umgesetzt wird, 30-40 Tage bei Raumtemperatur, mehr als ein Jahr bei Lagerung bei -20°C und bei Lagerung bei -70°C ist kein Abbau über einen Zeitraum von zwei Jahren zu beobachten. In organischen Lösungsmitteln ist Allicin deutlich instabiler: In Diethylether reagieren 50 % des Allicins nach 3 Stunden ab, in Dichlormethan nach 30 Stunden (*ibid.*). Aufgrund dessen wurde Allicin stets als verdünnte (50 mM) wässrige Lösung bei -80°C gelagert.

4.2 Hefe als experimentelles System, um auf genetischem Wege die Frage nach der Wirkweise von Allicin auf Pilze zu klären

Die dieser Arbeit zugrundeliegende Fragestellung ist, auf welche Weise Allicin in der Lage ist, eukaryote Zellen abzutöten. Die Behandlung prokaryoter Systeme war nicht Bestandteil dieser Arbeit. Basierend auf einer denkbaren Anwendung von Allicin als Fungizid in landwirtschaftlichen Anwendungen (Curtis et al., 2004; Perelló et al., 2013; Slusarenko et al., 2008) war die Aufklärung der Wirkung von Allicin auf Pilze von besonderer Bedeutung. Die Anwendung im Bereich des Pflanzenschutzes macht es notwendig, phytotoxische Effekte von Allicin zu untersuchen. Dass Allicin phytotoxisch wirken kann, wurde an Tomaten (*Lycopersicon esculentum*) gezeigt (Portz et al., 2008). Dass die Phytotoxizität von Allicin bei Sprühapplikation gering ist, lässt sich damit erklären, dass Allicin die Cuticula nicht zu durchdringen in der Lage ist.

Darüber hinaus ergaben sich Berührungspunkte zu tierischen Zellsystemen, wobei insbesondere Zell-Signalwege des Zelltods zwischen Hefe und tierischen Zellen zum Teil konserviert sind (Madeo et al., 2002a) und deshalb die Möglichkeit einer Übertragbarkeit besteht. Zum Studium der Wirkung von Allicin auf pilzliche Zellen bietet sich das Modellsystem *Saccharomyces cerevisiae* in besonderer Weise an, weil es neben seiner einfachen Kultivierung auch gut geeignet ist, die genetische Basis von Wirkmechanismen durch den Einbezug von Mutanten zu untersuchen. Die Wirkung von Allicin auf eine Vielzahl von (phyto)pathogenen Pilzen ist verschiedentlich gezeigt worden (Curtis et al., 2004; Perelló et al., 2013; Yamada und Azuma, 1977). In *Saccharomyces* ist es – im Gegensatz zu vielen der getesteten filamentösen pathogenen Pilzen - beispielsweise möglich, anhand von Mutanten, die in einzelnen Signalwegkomponenten beeinflusst sind, eine veränderte Resistenz der Hefelinie gegenüber der zu testenden Substanz (*resp.* des zu testenden Stresses) festzustellen. Damit kann auf eine Rolle von Signalwegen oder metabolischen aktiven Proteinen (z.B. Oxidoreduktasen) geschlossen werden.

Es ist dabei möglich, auf Hefestämme aus der EUROSCARF Mutantensammlung zurückzugreifen, die Deletionsstämme von rund 5000 nicht-essentiellen Genen in haploiden Zelllinien bzw. rund 6000 Genen (einschließlich einiger essentieller Gene für diploid-heterozygote Zellen) bereitstellt

(<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/complete.html>), die im Rahmen eines Hefe-Genomprojektes entstanden ist (Entian et al., 1999).

Aufgrund dieser Vielzahl an zur Verfügung stehenden und verifizierten Mutanten kann mittels chemogenetischer Screeningprozeduren (siehe z.B. (Warringer et al., 2008)) auf die Beteiligung von Proteinen an Anfälligkeit und Resistenz geschlossen werden.

Aufgrund der Möglichkeit, mittels Mutantenstudien Wirkmechanismen einer Substanz aufzuklären und aufgrund der einfachen Kultivierbarkeit von Hefe gewinnt *Saccharomyces* für Screeningverfahren und die Aufklärung der Wirkmechanismen von Naturstoffen zunehmend an Bedeutung (Qaddouri et al., 2011). In dieser Studie wurden Mutanten aufgrund von Überlegungen zur Physiologie und Beantwortung spezifischer Fragestellungen ausgewertet. Eine Gesamtanalyse aller verfügbaren Mutanten hinsichtlich ihrer Resistenz gegen Allicin steht jedoch noch aus.

Somit kann leicht auf genetischem Wege auf Vorgänge in Hefe als Modell für Pilzzellen geschlossen werden. Darüber hinaus sind viele Erkenntnisse, die an Hefezellen gewonnen werden, hinsichtlich biochemisch-physiologischer Wirkungen, auf andere Systeme, insbesondere humane und tierische Zellen übertragbar (Rockenfeller und Madeo, 2010). Die genetische Zugänglichkeit des Hefesystems im Vergleich zu tierischen Zellen erlaubt somit erste Erkenntnisse, die in einem zweiten Schritt auf ihre Übertragbarkeit in andere Zellsysteme getestet werden müssen.

4.3 Glutathion ist ein Resistenzfaktor von Zellen gegenüber Allicin und ein Regulator des zellulären physiologischen Status

Dass Allicin mit Thiolgruppen zu reagieren in der Lage ist, ist bereits seit der Entdeckung des Moleküls im Jahre 1944 bekannt (Cavallito und Bailey, 1944). Glutathion ist ein niedermolekulares thiolhaltiges Tripeptid, das höchst abundante Nichtprotein-Thiol sowohl in Pflanzen am Beispiel von Arabidopsis (Noctor et al., 2011), Hefe (Grant et al., 1996a) als auch menschlichen Zellen (Townsend et al., 2003) aufweist (Grant, 2001; Newton et al., 2009) darstellt (vgl. 1.2.4.).

Die generelle Reaktivität von Allicin mit Thiolen ist am Beispiel des Glutathions konkret gezeigt worden: Glutathion reagiert mit Allicin zu S-Allylmercaptoglutathion (GSSA) (Rabinkov et al., 2000). Diese Substanz ist ebenfalls physiologisch aktiv: Es konnte gezeigt werden, dass GSSA *in vitro* Papain inhibiert und die Fähigkeit besitzt, verschiedene Sauerstoffradikale abzufangen (*ibid.*). Neben der Reaktion mit Glutathion ist die Reaktion mit Thiolen in Cysteinresten von Proteinen möglich, die aber ihrerseits durch redoxprotektive Systeme wie das Thioredoxin- oder Glutaredoxinsystem vor Oxidation geschützt werden (Grant, 2001). Eine entsprechende Thioallylierung ist für Hämoglobin in Erythrocyten durch rohen Knoblauchextrakt *in vivo* gezeigt worden (Bonaventura et al., 2010).

Vorangegangene Experimente gaben Hinweise darauf, dass eine Behandlung mit Knoblauchsafte eine Oxidation des Glutathion bewirkt (Portz, 2008). Für das Modellsystem Hefe wurde deshalb von der Hypothese ausgegangen, dass die Reinsubstanz Allicin in der Lage ist, Glutathion zu GSSG zu oxidieren und auf diese Weise (durch Verschiebung des „Thiolstat“) den physiologischen Zustand der Zelle zu beeinflussen. Bislang war nur gezeigt worden, dass Glutathion mit Allicin zu GSSA reagiert.

Eine Reaktion zu GSSG würde entweder darauf beruhen, dass Allicin ROS induziert, die diese Reaktion bewirken oder GSSA mit weiteren Molekülen GSH in einer Thiol-Disulfid-Austauschreaktion zu GSSG reagiert (vgl. 1.2.7.2). Eine derartige Reaktion würde eine Verschiebung des zellulären Thiolstat (bestimmt über das elektrochemische Redoxpotential) bewirken, der mit einer Veränderung des physiologischen Zustandes zu korrelieren sein sollte.

Unter Verwendung des Glutathion-Reduktase-Assays wurden absolute Mengen von GSH und GSSG bestimmt. Diese sind notwendig, weil zur Berechnung des zellulären Redoxpotentials unter Verwendung der Nernst-Gleichung diese Werte in den Massenwirkungsgesetz-Term eingesetzt werden müssen. Weil zwei Moleküle bei der Oxidation von GSH zu einem Molekül GSSG dimerisieren, geht in den Massenwirkungsgesetz-Ausdruck der Nernst'schen Gleichung ein Quadratterm ein, so dass eine Berechnung mit einem einfachen Verhältnis von GSH/GSSG nicht möglich ist, sondern die Kenntnis der absoluten Konzentrationen von GSH und GSSG unumgänglich ist (Gruhlke und Slusarenko, im Druck). Eine Normierung hinsichtlich Quantität des Glutathion-Reduktase Assays erfolgte mit GSH bzw. GSSG als Reinsubstanz.

Richtwerte für die Korrelation des Redoxpotentials und des physiologischen Zustandes wurden entsprechend der für viele tierische Zellsysteme als gültig gefundenen Korrelationen verwendet, die von Schafer & Buettner gezeigt worden sind (Schafer und Buettner, 2001). Ausgehend von der Vermutung, dass diese Verbindung zwischen Redoxzustand und physiologischem Zustand auf biochemischen Zusammenhängen basiert, die unabhängig von der Zelllinie sind, war die Hypothese, dass entsprechende Verschiebung des Redoxpotentials sich in analoger Weise auf den physiologischen Zustand der Hefe auswirkt. Für die Toxizität von Allicin wurde das Modell aufgestellt, dass das zelluläre Redoxpotential in einen mehr oxidierten Bereich verschoben wird und diese Änderung mit der Induktion von Apoptose korreliert. Bei dieser Hypothese darf nicht vernachlässigt werden, dass Allicin auch mit Protein-Thiolen zu Thioallyladdukten reagiert. Bereits eine Studie aus dem Jahr 1956 zeigt, dass Allicin durch Reaktion mit Protein-Thiolen die Katalysefähigkeit von Enzymen zu inhibieren in der Lage ist (Wills, 1956). Das bedeutet, dass die Toxizität von Allicin möglicherweise nicht ausschließlich durch einen „Redox-Shift“ zu erklären ist, sondern auch zusätzlich eine direkte Wirkung auf Proteine möglich ist. Diese kann darin bestehen, dass Proteine des Stoffwechsels inhibiert werden bzw. Signalwegkomponenten in ihrer Aktivität modifiziert werden. Dass Allicin auf Proteine des Signalweges wirkt, ist in dieser Arbeit am Beispiel des YAP1 Proteins gezeigt worden.

In der aktuellen Literatur jedoch wird das vereinfachte Modell, dass Glutathion in Hefe das Redoxgleichgewicht der Zelle puffert, kritisch betrachtet; aktuelle Resultate scheinen vielmehr nahelegen, dass die Redoxregulation in Hefezellen eher von Thioredoxinen bzw. Wechselwirkungen des Thioredoxin-Glutathion-Systems bewerkstelligt werden. So wird derzeit angenommen, dass ein völliger Mangel an Glutathion zu einer Inhibition der Eisenaufnahme führt und dadurch bedingt die Funktion von Eisen-Schwefel -Clustern, wie sie in vielen metabolischen Prozessen von zentraler Bedeutung sind, nicht aufrecht erhalten werden können (Kumar et al., 2011; Toledano et al., 2013). Nichtsdestotrotz ist Glutathion der Elektronendonator des Glutaredoxin-

Systems, das für die Resistenz gegen verschiedene (oxidative) Stressoren von Bedeutung ist (Grant, 2001). Insgesamt ist die Rolle des Glutathions für die Redoxregulation nicht gänzlich klar.

Allicin zeigt auf den Glutathionpool zwei unterschiedliche Wirkungen: Zum einen reduziert Allicin die absolute Konzentration an Gesamt-Glutathion und zum anderen erhöht es die Konzentration an oxidiertem Glutathion (GSSG) (Siehe Tabelle 5). Somit ist der Anteil von GSSG an einem verringerten Glutathionpool erhöht. Aufgrund der oben gezeigten Abhängigkeit des elektrochemischen Redoxpotentials von der Gesamtglutathionkonzentration hat die Erhöhung des GSSG-Anteils einen dramatischen Einfluss auf das Redoxpotential (gezeigt in Tabelle 6), so dass es in Bereiche verschoben wird, die in tierischen und humanen Zelllinien mit der Induktion von Apoptose korrelieren.

Die Konzentrationen des Glutathions werden mit einigen Näherungswerten berechnet, die einen Konzentrationsbereich beschreiben. Weil die Konzentration abhängig ist vom Volumen, in dem das Glutathion vorliegt, wird in einem ersten Schritt das Volumen der Zellen bestimmt, die in die Messung eingehen. Aufgrund dieses *packed-cell-volume* des Zell-Pellets wird die ermittelte Glutathionkonzentration auf das Zellvolumen umgerechnet. Darüber hinaus wird angenommen, dass von diesem ermittelten Pellet-volumen das Volumen der Zellwandbestandteile abgezogen wird, weil in der Zellwand kein Glutathion vorliegt. Als Volumenanteil der Zellwand am Gesamtpellet werden 15 % angenommen (vgl. Portz, 2008). Ferner wird vereinfachend angenommen, dass die Vakuole als Kompartiment mit niedriger Glutathionkonzentration, eine Glutathionkonzentration nahe Null hat. Das Volumen der Vakuole wird auf 20 % geschätzt. Dabei wird einbezogen, dass junge Zellen nur eine sehr kleine Vakuole aufweisen, die bei älteren Zellen jedoch deutlich größer wird (Feldmann, 2012). Deshalb sind bei den Berechnungen einmal ein Wert unter Einbezug der Vakuole und ein Wert unabhängig von der Vakuole angegeben. Diese Werte geben also eine Bandbreite an Glutathionkonzentrationen an, die in der inhomogenen Kultur von unterschiedlich alten Hefezellen zu erwarten sind. Dabei ist nicht davon auszugehen, dass die Vakuole ein gänzlich glutathionfreies Kompartiment darstellt. Vielmehr ist gezeigt worden, dass Glutathionaddukte, wie sie bei der Detoxifizierung entstehen und deren Entstehung häufig von Glutathion-S-transferasen katalysiert wird (Sharma et al., 2003), durch ABC-Transporter, die in der Vakuolenmembran lokalisiert sind, in das Innere der Vakuole transportiert werden. Von besonderer Bedeutung ist hierbei der ABC-Transporter YCF1 („*yeast-cadmium factor 1*“) (Li et al., 1996), der offenbar auch an der Redoxregulation von Hefezellen entscheidend beteiligt ist (Morgan et al., 2013).

Wie bereits erwähnt bewirkt die Behandlung mit Allicin auf den Glutathionhaushalt von Hefe zwei unterschiedliche Effekte: Zum einen die Oxidation von Glutathion zu GSSG, zum anderen die Abnahme der totalen Glutathionkonzentration. Der Glutathion-Reductase Assay beruht auf einem „Recycling“-Schritt, der durch rekombinante Glutathionreduktase aus Hefe katalysiert wird. Es ist möglich, dass durch die Reaktion von Allicin mit Glutathion Glutathionaddukte wie GSSA entstehen, die kein Substrat der Glutathionreduktase darstellen und durch die GR nicht reduzierbar sind. Um diese Hypothese zu testen, wäre es notwendig, Glutathion mit einem Überschuss Allicin *in vitro* reagieren zu lassen, um so GSSA herzustellen und GSSA im GR-Assay als Substrat einzusetzen. Findet keine Umsetzung statt, wäre das ein starkes Indiz dafür, dass die Bildung von GSSA für den

geringeren gemessenen Gesamtglutathionwert verantwortlich wäre. Zwar wird angenommen, dass GSSA ein Intermediat für die Bildung von GSSG darstellt, jedoch kann man annehmen, dass die Reaktion von Allicin mit Glutathion eine sehr schnelle Reaktion (Rabinkov et al., 2000) darstellt im Gegensatz zur (pH-Wert abhängigen!) Thiol-Disulfid-Austauschreaktion des GSSA mit GSH zu GSSG und Allylmercaptan. Aufgrund des Vorhandenseins der Allylgruppe im GSSA sollten beide Reaktionen in der HPLC bei 254 nm zu verfolgen sein. Es ist denkbar, dass GSSA (weil ebenfalls biologisch wirksam!) einen Beitrag zur Toxizität des Allicins liefert, ebenso wie das bei der Reaktion von GSSA mit GSH neben GSSG entstehende Allylmercaptan (2-Propene-1 thiol). Deshalb wäre es sinnvoll, beide Produkte neben Allicin auf ihre Toxizität hin zu untersuchen.

Als alternative Erklärung kann die kovalente Bindung von Glutathion an ein Proteinthiol („Glutathiolierung“) genannt werden. Unter der Annahme, dass die Reaktion von Allicin und Glutathion unter der Bildung von GSSA als Intermediat zu GSSG weiterreagiert, stellt sich zwischen oxidiertem Glutathion und Proteinthiolen ein Gleichgewicht ein, so dass die Disulfidbrücke des GSSG durch ein Thiol in einer Thiol-Disulfid-austauschreaktion gespalten wird und ein neues Disulfid zwischen einem Glutathionmonomer und Proteinthiol kommt (Hill und Bhatnagar, 2012). Auch hier ist davon auszugehen, dass das Glutathion durch die Glutathionreduktase nicht reduzierbar ist und somit dem Assay-Zyklus zuzuführen ist.

Ausgehend von diesen Ergebnissen ist die Frage, inwieweit die Glutathiolierung eine Rolle für die Wirkung von Allicin spielt, aktuell Gegenstand weitergehender Untersuchungen in der Arbeitsgruppe.

Es ist gezeigt worden, dass Allicin sowohl das Gleichgewicht von GSH und GSSG sowie seine absoluten Konzentrationen verändert. Um zu überprüfen, inwiefern dies physiologisch von Bedeutung ist, wurden verschiedene Mutanten, die entweder in der Biosynthese von Glutathion ($\Delta gsh1$, $\Delta gsh2$) oder der Reduktion von oxidiertem Glutathion ($\Delta glr1$) beeinflusst sind, mit Allicin behandelt und ein Unterschied in der Empfindlichkeit gegen Allicin im Vergleich zum Wildtyp getestet. Diese Testung erfolgte im Hemmhoftest (siehe 2.8.4.2). Dabei wurden zwei verschiedene Medien verglichen: YPD, das als komplexes Vollmedium aus Pepton, Hefeextrakt und Glucose auch Glutathion enthält und CSM, ein synthetisches Medium, das zwar in geringen Mengen Cystein, aber kein Glutathion enthält. Wenn die Verschiebung des GSH/GSSG Äquilibriums für die physiologische Antwort der Hefezellen auf die Behandlung mit Allicin verantwortlich ist, dürften Glutathion-Biosynthesemutanten, die weniger GSH ($\Delta gsh2$) bzw. kein GSH ($\Delta gsh1$) enthalten als der Wildtyp oder oxidiertes Glutathion nicht regenerieren können ($\Delta glr1$), empfindlicher gegen Allicin sein.

Für die $\Delta gsh1$ Mutante wurde verschiedentlich eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber verschiedenen chemischen Verbindungen gezeigt (z. B. (Botet et al., 2007; Serero et al., 2008). Auch die $\Delta gsh2$ Mutante ist gegen eine Vielzahl von Substanzen erhöht anfällig, insbesondere gegenüber denjenigen, die oxidativen Stress auslösen (Gales et al., 2008). Es zeigte sich, dass die Anfälligkeit von $\Delta gsh1$ und $\Delta gsh2$ Zellen in YPD gegenüber Allicin kleiner war als in CSM-Medium (Abbildung 21). Das Komplexmedium YPD enthält Glutathion (weil YPD Hefeextrakt enthält und in Hefezellen Glutathion enthalten ist), das die Zellen offenbar aufzunehmen in der Lage sind, um damit das Glutathion-

defizit, das durch die Mutation bedingt ist, zu komplementieren. Aus diesem Grunde wurde für alle folgenden Tests CSM-Medium verwendet.

Es zeigt sich deutlich, dass Glutathion als Redoxpuffer bzw. Elektronendonator für das Glutaredoxin-System für die Resistenz gegenüber Allicin von entscheidender Bedeutung ist; dabei ist neben dem Glutathionpool (der durch GSH1 und GSH2 determiniert wird) auch der Redoxzustand des Glutathions (der durch GLR1 bedingt wird) bedeutsam. Eine $\Delta glr1$ Mutante zeigt ebenfalls eine verringerte Resistenz gegen eine Behandlung mit Allicin, wie in Abbildung 21 gezeigt ist. Eine direkte funktionelle Prüfung, dass die Resistenz von Zellen gegen Allicin von Glutathion abhängig ist, ist nach meinem Kenntnisstand bislang nicht erfolgt, obwohl eine Reaktion von Allicin mit Glutathion bekannt ist (Miron et al., 2010; Rabinkov et al., 2000). Die Rolle von Glutathion für die Aufrechterhaltung des Redoxstatus in Hefe ist nicht vollständig verstanden (s.o.). Seine Bedeutung wird u.a. für die Synthese und Aufrechterhaltung von Eisen-Schwefel-Clustern gesehen (Toledano et al., 2013), während Thioredoxine für die bedeutenden Regulatoren des zellulären Redoxstatus gehalten werden (*ibid.*). Dennoch wurde für das spezifische Thioloxidans 4,4'-Dipyridyl-disulfid gezeigt, dass Glutathion wichtig ist für die Resistenz gegen dieses Toxin (López-Mirabal et al., 2007), wie es auch bei Allicin der Fall ist. Die hier gezeigten Ergebnisse zeigen deutlich, dass Glutathion für die Resistenz gegenüber Allicin von entscheidender Bedeutung ist. Bereits an dieser Stelle sei kurz darauf verwiesen, dass auch Mutanten des Thioredoxin-Systems auf ihre veränderte Resistenz gegenüber Allicin getestet wurden (siehe 3.2.4.). Diese waren nur geringfügig susceptibler gegen Allicin im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 50), was darauf hindeutet, dass das Thioredoxin-System im Vergleich zum Glutathion-System von untergeordneter Bedeutung ist bei der Resistenz gegen Allicin. Thioredoxine sind Oxidoreduktasen, die vornehmlich den Redoxzustand von Protein-Cystein-resten regulieren. Es sind verschiedene Erklärungsmöglichkeiten denkbar, weshalb Thioredoxine von nachrangiger Bedeutung im Vergleich zu Glutathion sind: Möglicherweise können thioallylierte Proteine (also Proteine, bei denen ein Cystein-Rest durch Reaktion mit Allicin durch einen Allylmercaptan-Rest modifiziert ist) nicht reduziert werden bzw. die schnelle Reaktion mit GSH titriert Allicin aus und verhindert so die Reaktion mit Proteinthiolen.

Weil Thioallylierung einen Massenunterschied von 72 Da bewirkt, ließe sich mittels Massenspektrometrie die Proteinmodifikation nachweisen. Es könnte verglichen werden, ob in der $\Delta gsh1$ Mutante eine höhere Zahl von Proteinen allyliert ist als im Wildtyp; damit kann zurückgeschlossen werden, dass Glutathion entweder an der Reduktion thioallylierter Proteine beteiligt ist oder einer Thioallylierung durch das Austitrieren des Allicins vorbeugt.

4.3.1 Apoptose-Induktion durch Allicin in *Saccharomyces cerevisiae*

Aufgrund der Messungen des Redoxpotentials nach Allicinbehandlung in Hefezellen wurde, unter der Annahme, dass es möglich ist, die physiologische Abhängigkeit der Zelle in Abhängigkeit vom Redoxpotential abzuleiten, angenommen, dass Allicin in Hefe Apoptose induziert. Allicin verschiebt das zelluläre Redoxpotential von <-215 mV bei Behandlung mit Allicin (1,3 mM) zu einem Potential

von -181 mV (Tabelle 6), das in tierischen Zellen mit der Induktion von Apoptose korreliert (Schafer und Buettner, 2001).

Um diese Hypothese zu testen, wurden verschiedene zellbiologische und genetische Ansätze angewandt. So wurde die Aktivierung der Hefe-Caspase mit einem künstlichen Caspase-substrat (Gruhlke et al., 2010) getestet. Eine weitere Möglichkeit, die Apoptose-Induktion in Hefe zu testen, ist es, auf genetischem Wege in diesen Prozess einzugreifen, indem pro-apoptotische Faktoren deletiert werden oder anti-apoptotische Faktoren eingebracht bzw. verstärkt exprimiert werden. Diese genetische Strategie wurde verfolgt und in zwei unterschiedlichen Ansätzen umgesetzt: Eine Deletion des hefeeigenen Apoptose-Induzierenden Faktors (AIF1) bzw. eine Hefelinie, in die das humane Bcl_xL Gen eingebracht wurde, das auch in Hefe auf die Ausbildung der Apoptose einwirkt (Chen et al., 2003), wurde auf Resistenz gegen Allicin getestet.

Dabei wurde die Wirkung von chemisch-synthetisiertem Allicin mit der von Knoblauchsaff verglichen, wobei der Allicin Gehalt des Knoblauchsaffes mittels HPLC bestimmt wurde und die Menge an zugeführtem Allicin in beiden Ansätzen gleich war. Als Kontrolle diente der Wildtyp BY4742, dem die Hefemutante *Δaif1* zugrunde liegt.

Es ist bereits gezeigt worden, dass die *Δaif1* Mutante eine erhöhte Überlebensrate bei Behandlung mit Wasserstoffperoxid zeigt (Wissing et al., 2004). Entsprechend dient H₂O₂ als Positivkontrolle für die Versuche mit Allicin. Weil spezifisch die Überlebensrate nach Behandlung mit Allicin untersucht werden soll und nicht generell Resistenz festgestellt werden soll, die mit dem Hemmhoftest bestimmt wird (und sowohl Wachstumsinhibition als auch Zelltod nehmen auf das Resultat des Hemmhoftests Einfluss, siehe 1.4), wurde die Wirkung von Allicin auf die *Δaif1* Mutante mittels Droptest bestimmt (vgl. 2.8.5).

Wie aufgrund der Literaturlage zu erwarten (Wissing et al., 2004), zeigt die *Δaif1*- Mutante bei der H₂O₂-Positivkontrolle eine höhere Überlebensrate als der korrespondierende Wildtyp BY4742. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant. *Δaif1* ist also bedeutsam für redoxabhängige Zelltodinduktion, so dass zu erwarten ist (*ibid.*), dass, wenn die Wirkung von Allicin redoxabhängig ist, auch bei dieser Behandlung *Δaif1* resistenter ist. In der Tat zeigt sich, dass in allen getesteten Konzentrationen die *Δaif1* Mutante sowohl bei Behandlung mit Allicin in Form von Knoblauchsaff als auch bei chemisch synthetisiertem Allicin eine erhöhte Überlebensrate aufweist (Abbildung 22). Zwischen der Behandlung mit Knoblauchsaff und Allicin besteht kein signifikanter Unterschied, so dass sich schließen lässt, dass Allicin der aktive Bestandteil des Knoblauchsaffs ist.

Δaif1 ist also bedeutsam für die Induktion des Zelltodes durch Allicin und somit auch durch Knoblauchsaff. Der mitochondriale, Cytochrom C unabhängige Weg der Apoptose-Induktion (Eisenberg et al., 2007) ist also an der Antwort der Hefezellen auf Allicin beteiligt.

Das humane Bcl-xL-Protein zeigt antiapoptotische Wirkung auch in Hefezellen (Chen et al., 2003). Als Kontrolle wird ein nicht funktionales Bcl_xL Konstrukt verwendet, das C-terminal deletiert ist (Arokium et al., 2004). Bei Behandlung mit Wasserstoffperoxid als Positivkontrolle für ein oxidatives Agens zeigt das Bcl_xL-Konstrukt eine signifikant höhere Überlebensrate als das C-terminal deletierte

Konstrukt. Wie schon bei $\Delta aif1$ besteht kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Knoblauchsaff und Allicin gleicher Konzentration beim Kontroll-Stamm, hier dem mit einem Bcl_xL Δ C-transformierten BY4742 Wildtypstamm.

In allen Behandlungen zeigen Hefezellen, die mit dem funktionalen Bcl_xL Konstrukt transformiert worden sind, eine deutlich höhere Überlebensrate als die, die das nichtfunktionale Δ C-Konstrukt exprimieren (Abbildung 23). Bcl-xL ist in Säugetieren an der Regulation der Freisetzung des Cytochrom C aus den Mitochondrien beteiligt (Yang et al., 1997), während AIF1 weitestgehend Cytochrom C-unabhängig agiert (Candé et al., 2002). Es ist gegenwärtig noch fraglich, ob die zentrale Rolle von Cytochrom C in der Apoptose gänzlich auf das Hefesystem übertragen werden kann (Ludovico et al., 2002; Roucou et al., 2000). Diese Befunde deuten darauf hin, dass Allicin in verschiedener Weise Apoptose in Hefe zu induzieren in der Lage ist. Im Gegensatz zu tierischen Systemen ist eine Vielzahl von Mutanten verfügbar bzw. Transformationen sind einfach durchführbar, so dass Veränderungen auf genetischer Basis genutzt werden können und eine Veränderung hinsichtlich Überleben bzw. allgemeiner Resistenz gegen ein Agens als Größenordnung genutzt werden können. Dies erlaubt neben einer Aussage, dass ein Effekt stattfindet zugleich eine funktionelle Prüfung. Die Durchführung dieser Assays ist einfach, so dass sie geeignet erscheinen, in großem Maßstab Signal- und Reaktionswege zu studieren, die chemische Substanzen induzieren. Das Hefesystem scheint für Screeningverfahren gut geeignet zu sein.

Inwieweit weitere zentrale Effektoren der Hefeapoptose, so z. B. die Hefecaspase YCA1 oder die Nuclease am Vollzug der Allicin-induzierten Apoptose beteiligt sind, ist in dieser Arbeit nicht untersucht worden, würde aber weitere Details über die Vollzugswege des Allicin-induzierten Zelltods offenlegen. Insbesondere die Unterscheidung zwischen Caspase-abhängigkeit und Caspase-unabhängigkeit (wenngleich diese Unterscheidung nicht so scharf gezogen wird wie in Säugetiersystemen, vgl. (Wissing et al., 2004), weil AIF1-abhängiger Zelltod nicht gänzlich Caspase-unabhängig ist) würde die Wege, auf denen Allicin in Hefe Zelltod induzieren kann, näher beleuchten.

Für verschiedene Krebs-zelllinien ist gezeigt worden, dass Allicin sowohl Caspase-abhängig als auch Caspase-unabhängig induzieren kann (Oommen et al., 2004; Park et al., 2005). Entsprechendes legen auch die Ergebnisse, dass sowohl AIF1 als auch die Expression von Bcl-xL einen Einfluss auf die Resistenz von Hefezellen gegenüber Allicin haben, für die Situation in *Saccharomyces* nahe.

Der Umstand, dass Allicin Apoptose in Hefe induziert, bedingt zwangsläufig weitergehende Fragestellungen, denen im Folgenden nachgegangen wurde. So wurden folgende Fragen gestellt:

- Welche Signalwege sind an der Induktion der Apoptose beteiligt?
- Welche Faktoren in der Zelle werden durch Allicin in der Weise verändert, dass sie das Allicin-bedingte Redoxsignal perzipieren können?

Diese Fragestellungen wurden im Folgenden weitergehend bearbeitet.

4.3.2 Wirkungen von Allicin auf das Actin-Cytoskelett

Dass Allicin auf Thiolgruppen oxidierend wirkt, ist ein zentraler Grundbestandteil dieser Arbeit, wenngleich es nicht der einzige Mechanismus der Allicintoxizität ist. In einer im Jahr 2007 veröffentlichten Studie wurde an Mäuse-Fibroblasten (NIH 3T3) Zellen gezeigt, dass Allicin eine Tubulin-depolymerisierende Wirkung hat, die mit der von Nocodazol vergleichbar ist, während mit den verwendeten Allicin-Konzentrationen das Actin-Zytoskelett nicht von Allicin beeinflusst war (Prager-Khoutorsky et al., 2007). In sterilen Filamenten der *Tradescantia*-Blüte konnte in unserem Labor gezeigt werden, dass Allicin dazu führt, dass die protoplasmatische Strömung zum Erliegen kommt (unveröffentlicht). Für diesen Vorgang intrazellulären Transportes ist das Actinzytoskelett von zentraler Bedeutung (Shimmen und Yokota, 2004). Es ist bereits verschiedentlich gezeigt worden, dass thiolreaktive Substanzen einen Einfluss auf die Funktion der protoplasmischen Strömung haben (Abe, 1964; Allen und Allen, 1978; Shimmen und Yokota, 1994).

Ausgehend von dieser Beobachtung haben wir die Frage gestellt, ob eine Wirkung von Allicin auf das Actin-Zytoskelett der Hefe zu erwarten ist. Eine Beeinflussung des Actin-Zytoskeletts ist von großer Bedeutung für die Induktion von Apoptose in Hefe (Gourlay und Ayscough, 2005b, 2006). Aufgrund der Befunde im Mauszellmodell sollte ferner untersucht werden, ob auch das Tubulin-Zytoskelett beeinflusst wird.

Zur Visualisierung des Tubulin-Cytoskeletts stand ein β -Tubulin-GFP Konstrukt zur Verfügung, das in Wildtypzellen des Stammes BY4742 transformiert worden war. Es war eine schwache punktuelle GFP-Fluoreszenz in den Hefezellen zu beobachten, die es aber nicht erlaubt, Strukturen zu erkennen und somit den Einfluss von Allicin auf das Tubulin mikroskopisch zu untersuchen. Diese Erkenntnisse decken sich mit den aus der Literatur zu gewinnenden Eindrücken (Straight et al., 1997).

Alternative Methoden, das Tubulin-Cytoskelett (mit allen Bestandteilen) zu visualisieren, ist die Immunofluoreszenzfärbung, bei der ein spezifischer Antikörper gegen Tubulin mit einem Fluorophor konjugiert wird oder die histologische Färbung mittels fluoreszenzmarkierten Substanzen, die mit Tubulin interagieren. Hier wären vor allem Paclitaxel oder Vinblastin zu nennen, die an Fluorophore gekoppelt, kommerziell erhältlich sind. Diese Strategie würde es erlauben, neben β -Tubulin andere Tubulinbestandteile zu visualisieren. Um die Wirkung von Allicin auf das Tubulin-Cytoskelett zu untersuchen, erscheint diese Strategie erfolgversprechend. Weil eine Beeinflussung des Tubulins aber nach gegenwärtigem Kenntnisstand nicht in der Weise wie Actin an der Apoptose-Induktion in Hefe beteiligt zu sein scheint, wurde zunächst auf eine weitere Nachverfolgung der Tubulin-Beeinflussung durch Allicin verzichtet.

Analog zum Tubulin wurde auch für Actin zunächst eine GFP-basierte Visualisierung versucht. Dazu wurde ein Fusionsprotein des Actin-Bindeproteins ABP140 (YOR239W) und GFP erstellt. Auch bei diesem Ansatz konnten die erwarteten filamentösen Strukturen nicht beobachtet werden, weshalb hier eine histologische Färbemethode zum Einsatz kam, die darauf basiert, dass die Actin-stabilisierende Substanz Phalloidin an das Fluorophor Alexa 488 gekoppelt ist.

In Kontrollzellen sind bei diesem Assay klar filamentöse Strukturen zu erkennen (Abbildung 24, A), während bei der Behandlung mit H_2O_2 und Allicin diese Strukturen weitgehend aufgelöst sind

zugunsten von fluoreszierenden, punktartigen Aggregaten (Abbildung 24, B-D). Ein Auflösen filamentöser Strukturen nach oxidativem Stress, insbesondere H_2O_2 , des Actincytoskeletts ist beschrieben (Farah et al., 2011; Pujol et al., 2009) und actinspezifische Oxidoreduktasen gelten als Vermittler von Resistenz gegen oxidativen Stress (Odat et al., 2007), während der Austausch spezifischer Cysteinreste im Hefeactin die Induktion von redoxabhängigem Zelltod unterdrückt (Farah und Amberg, 2007).

In diesem Assay verhält sich Allicin ähnlich zu H_2O_2 , was erneut die besondere Rolle der Redoxaktivität des Allicins für seine Wirkung hervorhebt. Es stellt sich nachfolgend die Frage, wie das Signal der Actinbeeinflussung in der Zelle transduziert wird. Dafür wurde nachfolgend der RAS2/PKA-Signalweg näher untersucht.

4.3.3 Zur Bedeutung von RAS2 und PDE2 für die Resistenz gegen Allicin

Ausgehend von der Beobachtung, dass das Actin-Cytoskelett von Allicin betroffen wird, stellt sich die Frage, ob sich dieser Effekt für die Signalweiterleitung auswirkt. Es ist gezeigt worden, dass RAS2 ein bedeutender Regulationsfaktor in Bezug auf die Cytoskelett-Anordnung darstellt, wobei es sowohl die Polarität des Actin-Cytoskeletts selbst reguliert (Ho und Bretscher, 2001) als auch an der Antwort auf eine Zerstörung der Integrität des Cytoskeletts beteiligt ist (Leadsham et al., 2009).

Wenn also die Beeinflussung des Actin-Cytoskeletts für die Induktion des Zelltods von Allicin bedeutsam ist, ist zu erwarten, dass RAS2 an der Weiterleitung dieses Signals beteiligt ist. Umgekehrt kann also angenommen werden, dass eine $\Delta ras2$ Mutante eine erhöhte Resistenz gegenüber Allicin aufweisen sollte.

Im Hemmhoftest konnte gezeigt werden, dass dies der Fall ist: die $\Delta ras2$ Mutante ist resistenter gegen die Behandlung mit Allicin als der Wildtyp (Abbildung 25). Diese Beobachtung ist zwar statistisch belegbar, allerdings ist der Unterschied nicht so deutlich, wie es zu erwarten wäre, wenn man davon ausgeht, dass RAS2 einen „Flaschenhals“ für die Signalweiterleitung darstellt. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass das Fehlen des RAS2-Proteins teilweise durch RAS1, einem Paralog von RAS2, komplementiert werden kann. Wenngleich beide RAS-Proteine auf die Bildung von cAMP einwirken, zeigen sich markante Unterschiede in der Funktion des cAMP-Signalweges unterhalb der RAS-Proteine (Hurwitz et al., 1995). Daraus ergibt sich, dass, um diese Hypothese zu testen, zum einen die $\Delta ras1$ Mutante zu testen wäre, inwieweit die Einzelmutante einen vergleichbaren Phänotyp zu $\Delta ras2$ zeigt; ferner wäre eine $\Delta ras1\Delta ras2$ Doppelmutante interessant, weil in dieser Mutante keine Komplementation erfolgen sollte.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine erhöhte Resistenz der $\Delta ras2$ Mutante gezeigt werden, die auf eine Beteiligung dieses Proteins an der Antwort auf Allicin hindeutet. Nichtsdestotrotz wäre eine detailliertere Untersuchung zur Rolle der RAS-Proteine (insbesondere im Licht, dass RAS-Proteine in Humanzellen als Protoonkogene fungieren (Bos, 1989)), von Interesse.

RAS reguliert die Bildung von cAMP in Hefe, indem RAS2 mit der Adenylat-Cyclase CYR1 interagiert und deren Funktion beeinflusst (Colombo et al., 2014; Toda et al., 1985). Als nächster logischer

Schritt ergab sich somit die Frage, wie sich die Allicinresistenz ändert, wenn die intrazelluläre cAMP-Konzentration verändert wird. Diese Frage könnte entweder pharmakologisch untersucht werden, indem cAMP dem Medium zugefügt wird oder auf genetischem Wege, indem Gene, die für Proteine codieren, die die intrazelluläre Konzentration von cAMP regulieren, mutiert werden. Dabei wiederum könnte man verschiedene Wege postulieren: Zum einen, indem die Synthese des cAMPs unterdrückt wird, zum anderen, indem der Abbau des cAMPs moduliert wird. Eine genetische Strategie besitzt einer pharmakologischen gegenüber den Vorteil, dass der vollständige Knockout eines Gens (sofern möglich) limitierende Faktoren (z. B. Aufnahme der jeweilig applizierten Substanz), die auf die Effizienz der pharmakologischen Strategie einwirken, reduziert. Deshalb wurde die genetische Strategie gewählt.

Die cAMP-Synthese ist durch eine Mutation in der Adenylat-Cyclase zu hemmen. Hefe besitzt nur ein einzelnes Gen für die Adenylat-Cyclase (*CYR1*, *YJL005W*), dessen Knockout jedoch aufgrund der großen Bedeutung des Gens letal ist (Giaever et al., 2002). Eine Untersuchung wäre nur an einem heterozygoten, diploiden Stamm möglich. Als Alternative besteht die Möglichkeit einer Beeinflussung des cAMP-Katabolismus, der durch Phosphodiesterasen katalysiert wird. Hefe hat zwei Gene, die für PDE codieren – während das PDE1-Protein nur eine geringe Affinität zum Substrat cAMP aufweist (Nikawa et al., 1987), ist PDE2 hochaffin zu cAMP (Sass et al., 1986). Deshalb ist ein $\Delta pde2$ Knockout ausreichend, um einen Effekt auf das cAMP-Level zu untersuchen, weil, obwohl PDE1 das Fehlen von PDE2 komplementieren könnte, diese Komplementation aufgrund der niedrigen Substrataffinität das Ergebnis nur geringfügig beeinflusst.

Die $\Delta pde2$ Mutante weist eine allgemein geringere Stressresistenz auf im Vergleich zum Wildtyp (North et al., 2012; Wilson et al., 2010). Deshalb ist zu erwarten, dass diese Mutante auch eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Allicin aufweist. Tatsächlich erweist sich $\Delta pde2$ als signifikant erhöht anfällig gegenüber Allicin-Exposition (Abbildung 26), was darauf hindeutet, dass eine erhöhte cAMP-Konzentration mit der Empfindlichkeit gegenüber Allicin korreliert. cAMP wiederum ist Voraussetzung für die Aktivierung der Protein-Kinase A, einem zentralen Signalweg für Apoptose und Stressresistenz.

Für weitergehende Untersuchungen wäre eine Quantifizierung des intrazellulären cAMP-Levels in Kontrollzellen sowie allicinbehandelten Zellen bedeutsam, ebenso wie eine vergleichende Messung der cAMP-Konzentration in Wildtyp- und $\Delta pde2$ -Zellen. Eine solche Quantifizierung ist möglich mittels HPLC (Spoto et al., 1991) oder mit verschiedenen kommerziell erhältlichen ELISA-basierten Quantifizierungsskits.

Der RAS2/cAMP/PKA Weg ist – neben seiner Regulation in der Stressantwort – daran beteiligt, die Antwort auf Glucose zu vermitteln. Neben einer direkten, rezeptorvermittelten Detektion des Glucosestatus (Colombo et al., 2004) ist auch offenbar eine zelluläre Detektion der Nährstoffsituation möglich und die Bildung von cAMP reguliert. So akkumulieren p^0 Zellen, die keine mitochondriale Respiration durchführen können, mehr cAMP im Vergleich zum WT (Jaynes et al., 1982). Deshalb wäre es auch denkbar, dass Allicin Einfluss auf den Energiestoffwechsel nimmt und auf diese Weise

den RAS/cAMP/PKA-Weg aktiviert. So zeigte Wills, dass zwei Enzyme der Glycolyse (Hexokinase und Glyceraldehyd 3-phosphat dehydrogenase) *in vitro* durch Allicin gehemmt werden (Wills, 1956).

4.3.4 Proteinkinase A ist bedeutsam für die Resistenz gegenüber Allicin

Die im vorherigen Abschnitt diskutierten Ergebnisse ergeben das in sich konsistente Bild, dass die RAS und cAMP für die Resistenz bedeutsam sind. Nachfolgend ist zu erwarten, dass auch nachfolgend die Proteinkinase A wichtig ist für diesen Prozess.

Neben dieser Hypothese zeigt ein in humanen Epithelkarzinomzellen gemachter Befund, dass die Co-Inkubation mit einem Inhibitor der Proteinkinase A (N-[2-(p-Bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamid dihydrochlorid; H-89) die Rate apoptotischer Zellen bei Allicinbehandlung deutlich abnimmt, was für eine pro-apoptotische Rolle der PKA in diesem System spricht (Park et al., 2005).

Wenngleich die Rolle der PKA zwischen Säugetiersystemen und Hefe nicht vollständig übertragbar ist, legt dieser Befund neben den Ergebnissen nahe, dass PKA ein pro-apoptotischer Faktor von Hefe gegenüber Allicin sein könnte.

Aus diesem Grunde wurden die Komponenten der Proteinkinase A hinsichtlich ihrer Resistenz gegenüber Allicin getestet. Die Hefe-PKA weist, wie in Kapitel 1.3.2. erwähnt, einen komplexeren Aufbau als ihre Entsprechung in tierischen Systemen. Die PKA der Hefe ist modular aus drei unterschiedlichen katalytischen und einer regulatorischen Untereinheit aufgebaut. Im Hemmhoftest (2.8.4.2) zeigten sowohl $\Delta tpk1$ als auch $\Delta tpk3$ signifikante Unterschiede zum Wildtyp – während die $\Delta tpk1$ Mutante anfälliger war (was bedeuten würde, dass das TPK1 Protein für die Resistenz gegen Allicin wichtig ist), erweist sich $\Delta tpk3$ als resistenter gegen Allicin, was eine Rolle von TPK3 in der Suszeptibilität gegenüber Allicin nahelegt (Abbildung 27).

Für $\Delta tpk1$ wird eine erhöhte Anfälligkeit gegen eine Vielzahl anderer Toxine berichtet, z.B. Cycloheximide oder Benzopyren (Alamgir et al., 2010a; O'Connor et al., 2012). TPK1 scheint somit an der Antwort von Hefezellen auf Toxine beteiligt zu sein. In diesem Test zeigt $\Delta tpk1$ einen entgegengesetzten Phänotyp, indem die Mutante eine erhöhte Empfindlichkeit gegen Allicin zeigt. Wie allerdings TPK1 an der Vermittlung der Resistenz gegen Stressoren und Toxine beteiligt ist, ist m.K.n. nicht gezeigt.

Die zweite getestete Untereinheit, $\Delta tpk2$, zeigte im Hemmhoftest keinen Unterschied zum Wildtyp (Abbildung 27).

Für $\Delta tpk3$ ist gezeigt worden, dass es in der Signalweiterleitung einer Disruption des Actin-cytoskeletts unterhalb von RAS2 bedeutsam ist (Gourlay und Ayscough, 2006). Es wird vermutet, dass die Regulation der Apoptoseinduktion durch TPK3 auf Ebene einer veränderten Genexpression erfolgt (Leadsham und Gourlay, 2010). Aufgrund dessen wurde TPK3 als Kandidat für einen suszeptibilitätsvermittelnden Faktor angesehen. Bezüglich der Resistenz gegenüber Allicin und H_2O_2 als Positivkontrolle zeigt $\Delta tpk3$ eine erhöhte Resistenz.

Für die negativ regulatorische Untereinheit $\Delta bcy1$ wurde erwartet, dass die Mutante eine erhöhte Suszeptibilität aufweist, da für H_2O_2 eine besondere Anfälligkeit für diese Mutante gezeigt wurde (Hasan et al., 2002). Gegenüber H_2O_2 bestätigt sich diese Beobachtung im Hemmhoftest; die heterozygote $\Delta bcy1$ Mutante ist statistisch signifikant höher empfindlich gegenüber H_2O_2 , während bei Allicin zwar tendenziell eine erhöhte Empfindlichkeit zu beobachten ist, die aber nicht einer statistischen Prüfung auf Signifikanz standhält. Offenbar sind also die Befunde, die für H_2O_2 als redoxaktive Substanz gemacht wurden, nicht vollständig übertragbar auf die Wirkweise des Allicins (Abbildungen 27 und 28).

EUROSCARF hält nur eine heterozygote $\Delta bcy1$ Mutante bereit. *BCY1* ist semidominant und zeigt entsprechend auch als heterozygote Mutante einen Phänotyp aufgrund des „gene-dosage“-Effekts (Tabera et al., 2006). Diese Beobachtung konnte in unseren Versuchen – insbesondere in den noch zu diskutierenden Wachstumsversuchen – klar bestätigt werden. Um eine größtmögliche Vergleichbarkeit zwischen den unterschiedlichen Mutanten zu erhalten, wurde entschieden, für die weiteren Versuche die heterozygote $\Delta bcy1$ Mutante zu verwenden.

Um dennoch den Unterschied zwischen hetero- und homozygoter Mutante zu untersuchen, wurde der Hemmhoftest vergleichend mit der $\Delta bcy1$ von EUROSCARF, der LT21 (einer ebenfalls heterozygoten Mutante) und LT22 (einer homozygoten Mutante), die dankenswerterweise von Dr. Ramon Gonzalez, von der Abteilung für Mikrobiologie des Instituto de Fermentaciones Industriales in Madrid zur Verfügung gestellt wurde, durchgeführt.

Wie auch die EUROSCARF Mutante sind LT21 und LT22 im BY4743 Hintergrund. Für die homozygote Mutante war der Phänotyp hinsichtlich Suszeptibilität gegenüber Allicin und H_2O_2 deutlich stärker. Das Wachstum in den Platten war nicht vergleichbar mit dem Wildtyp. Die Platten waren nur schwach bewachsen aufgrund des deutlich langsameren Wachstums (das sich auch in den Wachstumskinetiken (siehe 3.2.3.4., Abbildung 31) bestätigte). Aufgrund dessen waren die Hemmhöfe nicht gleich stark zu erkennen im Vergleich zum Wildtyp. Weil aber die Zeit ein wichtiger Faktor für die Beurteilung des Hemmhoftests ist (eine genaue Erläuterung zur Zeitabhängigkeit ist in Kapitel 1.4. gegeben), war eine längere Inkubationsdauer nicht möglich. Eine geringere Zellzahl, die weniger Allicin austitriert, kann jedoch mit einer Erklärung für die drastisch größeren Hemmhöfe der homozygoten Mutante im Vergleich zur heterozygoten Mutante sein (Abbildung 28). Die Phänotypen, die in der Wachstumskinetik für $\Delta bcy1$ beobachtet worden sind, werden nachfolgend diskutiert.

Der Hemmhoftest misst die allgemeine Resistenz von Zellen gegenüber einem Toxin und bezieht dabei sowohl das Absterben von Zellen als auch die Inhibition der Zellproliferation mit in die Betrachtung ein. Deshalb mussten im Folgenden die unterschiedlichen Effekte – also Inhibition der Zellproliferation und Zelltod-induktion – voneinander getrennt betrachtet werden.

Deshalb wurde die Zelltodrate bestimmt, indem Flüssigkulturen einer $OD=1$ mit Allicin bzw. H_2O_2 behandelt wurden und nachfolgend auf YPD Agarmedium in unterschiedlichen Verdünnungen ausplattiert wurden, um so die Anzahl Kolonieformender Einheiten in der behandelten Probe und der

unbehandelten Kontrolle miteinander zu vergleichen. Dieser „Droptest“ ist eine experimentelle Standardmethode zur Feststellung der Überlebensrate von Hefezellen (siehe 2.8.5.).

Es ist bekannt, dass die Untereinheiten der PKA bedeutend sind für die Resistenz gegen eine Vielzahl von Stressoren (Thevelein und De Winde, 1999). In diesem Assay zeigte sich, dass eine Mutation des *TPK3* Gens eine erhöhte Resistenz gegenüber H_2O_2 und Allicin bedingt, während die übrigen Genotypen keine deutlichen Unterschiede zum Wildtyp aufweisen (Abbildung 29).

Bezüglich des Zelltods zeigen die heterozygoten $\Delta bcy1$ Stämme keine deutliche Erhöhung der Empfindlichkeit gegen Allicin (Abbildung 30); der homozygote LT22 Stamm erschien ebenfalls kaum verstärkt suszeptibel im Droptest, jedoch eine Hypersuszeptibilität gegenüber H_2O_2 (Abbildung 30). Wenngleich einer der zentralen Phänotypen der $\Delta bcy1$ Mutante eine deutlich erhöhte Zelltodrate in der stationären Phase ist (Peck et al., 1997) und für *Candida albicans* eine Beteiligung des BCY1-Homologs an der Induktion von Zelltod beschrieben ist (Phillips et al., 2006a), scheint BCY1 für die Induktion des Zelltods nach Allicinbehandlung nicht der zentrale Faktor zu sein, sondern der Mutantenphänotyp hängt, wie die gewonnenen Wachstumskurven zeigen, hauptsächlich von einer Wachstumsinhibition ab (vgl. Abbildung 31).

Es zeigt sich eine deutliche Abhängigkeit der Wachstumsinhibition in Abhängigkeit von der Allicinkonzentration im Wildtyp (Abbildung 31 und 32). Die höchste Konzentration führt zu einer Abnahme der Nettozunahme der optischen Dichte um etwa 50 %. Diese Beobachtung entspricht den Berichten aus Säugetierzellsystemen, dass Allicin nicht nur cytotoxische, sondern auch cytostatische Eigenschaften besitzt (Bat-Chen et al., 2009; Prager-Khoutorsky et al., 2007). Auch 1 mM H_2O_2 reduziert die Zellproliferation (Abbildungen 31 und 33). Eigene Versuche mit unterschiedlichen humanen Zell-Linien ergaben, dass Allicin ein potenter Inhibitor der Zellproliferation ist (Kapitel 4.3.3; Abbildung 53). Möglicherweise liegt ein konservierter Mechanismus vor, der die Inhibition der Proliferation reguliert.

Die cytostatische Wirkung ist in der $\Delta tpk1$ Mutante stärker ausgeprägt als im Wildtyp und den beiden anderen katalytischen TPK-Untereinheiten; die höchste der getesteten Konzentrationen führte – im Gegensatz zum Wildtyp – zu einer vollständigen Inhibition der Zellproliferation (Abbildung 31). Auch im Hemmhoftest zeigte sich eine erhöhte Suszeptibilität (Abbildung 27), die sich nicht im Droptest widerspiegelt (Abbildung 29), so dass davon auszugehen ist, dass sich die Beobachtung im Hemmhoftest auf die Proliferationsinhibition zurückführen lässt.

Obwohl BCY1 ein negativer Regulator der Aktivität der TPK-Untereinheiten ist, weist die Tendenz des Phänotyps der $\Delta tpk1$ und $\Delta bcy1$ in die gleiche Richtung; beide zeigen eine verringerte Zellteilung nach Behandlung mit Allicin (Abbildungen 27, 31 und 32). Möglicherweise ist diese nicht zu erwartende Beobachtung mit dem Umstand zu erklären, dass die Lokalisation von TPK1 und BCY1 korreliert – in proliferierenden Zellen sind beide Proteine im Zellkern zu finden, während in nicht-proliferierenden Zellen die Faktoren auch im Cytosol nachweisbar sind (Schmelzle et al., 2004); die Lokalisation wird reguliert über den TOR (Target of Rapamycin) Signalweg (*ibid.*), der unter anderem auch zentral ist für die Regulation der Autophagie. Erste Hinweise für die Induktion von Autophagie durch Allicin in Hefe konnten gewonnen werden, sind aber in dieser Arbeit nicht gezeigt

(unveröffentlicht). So zeigten Hefezellen, die mit Allicin behandelt worden waren, eine erhöhte Kernlokalisation des ATG8-Proteins (nicht gezeigt), was als typischer Prozess der Autophagie-Induktion angesehen wird (Klionsky et al., 2007).

Zusammenfassend lässt sich zu diesem Teilaspekt also festhalten, dass möglicherweise eine unterschiedliche Lokalisation der PKA-Untereinheiten zu einer differenziellen Sensitivität der jeweiligen Mutanten beiträgt. Im Folgenden wäre es also von Belang, die Lokalisation der PKA Untereinheiten (beispielsweise mit einem GFP-Konstrukt) nachzuverfolgen und die Lokalisation der Untereinheiten mit der Resistenz der jeweiligen Kultur zu korrelieren.

Wie auch in den übrigen Assays verhält sich $\Delta tpk2$ wie der Wildtyp. Aus diesem Umstand wird geschlossen, dass TPK2 weder auf Ebene der Cytotoxizität noch der Proliferationsinhibierung für die Antwort von Hefezellen auf Allicin verantwortlich ist.

Im Gegensatz zum Droptest zeigte $\Delta tpk3$ keinen Unterschied zum Wildtyp in der Wachstumskinetik in Anwesenheit von Allicin (Abbildungen 29 für die Daten des Droptests und die Wachstumskinetiken in Abbildungen 31 und 32). Der Droptest zeigte aber eine erhöhte Überlebensrate von $\Delta tpk3$ bei Behandlung mit Allicin. Die PKA ist somit an zwei unterschiedlichen Prozessen beteiligt: Die Zellteilung, wo vornehmlich BCY1 und TPK1 von Bedeutung zu sein scheinen, während für die Regulation des allicininduzierten Zelltods TPK3 vornehmlich interessant ist. Der genauen Regulation dieser unterschiedlichen Funktionen der PKA-Untereinheiten nachzugehen, kann ein lohnender Inhalt künftiger Studien sein.

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es, Faktoren zu identifizieren, die an der Zelltod-Induktion von Allicin beteiligt sind. Aufgrund der in diesen ersten Assays gewonnenen Eindrücke wurde nun die Arbeit auf die $\Delta tpk3$ Mutante, die offenbar eine Rolle im Zelltod spielt, und die $\Delta bcy1$ Mutante, die vornehmlich in der Zellproliferation von Bedeutung ist, beschränkt. Die Experimente wurden mit der heterozygoten Mutante von EUROSCARF (und nicht etwa der homozygoten LT22-Mutante) durchgeführt. Die homozygote LT22 zeigt ein deutlich verzögertes Wachstum, so dass es schwierig ist, Mutanten- und Wildtyp Zellen in einem vergleichbaren physiologischen Zustand zu erhalten (z.B. in Bezug auf Kulturdichte). Weil auch der heterozygote Stamm (offenbar aufgrund des Gene-dosage Effekts) einen Phänotyp im Wachstumstest zeigte, wurde beschlossen, weitere Versuche mit dem heterozygoten $\Delta bcy1$ Stamm von EUROSCARF durchzuführen.

In den nun diskutierten Versuchen wurde der Versuch unternommen, Prozesse besser zu verstehen, die möglicherweise eine Rolle spielen bei der Funktionsweise der PKA in seiner regulativen Eigenschaft des Zelltods.

4.3.5 Beteiligung von Reaktiven Spezies an der Toxizität des Allicins in Hefe

Allicin selbst ist ein starkes Oxidationsmittel, so dass die beobachteten zellulären Oxidationsreaktionen auch ohne das Zutun von ROS erklärlich sind, jedoch wurde für nahe mit Allicin verwandte Substanzen wie DADS gezeigt, dass ihre Funktion mit ROS korreliert (Lemar et al., 2007;

Lemar et al., 2005). Ferner erhöht Allicin bei einer kombinierten Behandlung die ROS-Akkumulation von Amphotericin B (An et al., 2009). Aus diesem Grunde wurde mit zwei verschiedenen Methoden die Akkumulation von ROS verfolgt: Neben der Verwendung von Dichlorofluorescein-Diacetat wurde Lucigenin, das als Superoxid-spezifisch galt (Faulkner und Fridovich, 1993) als weitere Methode des ROS Nachweises gewählt.

Der Nachweis von Reaktiven Spezies mittels fluorometrischer bzw. spektrometrischer Assays ist in vielen Fällen aufgrund der geringen Spezifität problematisch (Winterbourn, 2014). So ist 2,7-Dichlorofluoresceindiacetat keineswegs spezifisch für ROS, sondern reagiert neben reaktivem Sauerstoff auch mit reaktiven Stickstoffspezies wie $\cdot\text{NO}$, so dass DCFDA allgemein als Reagenz zum Nachweis Reaktiver Spezies gebraucht werden kann, ohne dass eine genaue Spezifizierung der Natur der Reaktiven Spezies möglich wäre (Myhre et al., 2003).

Eine erhöhte Spezifität ist bei der Verwendung von Lucigenin gegenüber Superoxid-Anionen zu beobachten (Faulkner und Fridovich, 1993), wenngleich auch bei diesem System eine, wenn auch geringere, Reaktivität gegenüber $\cdot\text{NO}$ beobachtet wird (Skatchkov et al., 1999). Die Aussage, die aus den beiden Assays gewonnen werden kann, ist also eine Antwort auf die Frage, ob Reaktive Spezies gebildet werden.

Reaktive Spezies, insbesondere ROS, sind bedeutende Signalkomponenten für die Induktion der Apoptose (Ciriolo, 2005) und auch im Hefesystem (Perrone et al., 2008), weshalb die Frage für das Verständnis der Hefe-induzierten Apoptose bedeutsam ist, ob Allicin in Abhängigkeit von ROS oder unabhängig davon Apoptose zu induzieren vermag; ferner stellt sich die Frage, ob PKA auf diesen Prozess einen Einfluss hat. Es ist gezeigt worden, dass eine unregulierte PKA-Aktivität in Hefezellen zu einer mitochondrien-abhängigen Produktion von Reaktiven Sauerstoff-Spezies führt und auf diese Weise Apoptose induzieren kann (Leadsham und Gourlay, 2010).

Die Resultate des DCFDA- und Lucigenin-Assays erscheinen widersprüchlich. Während die Ergebnisse des DCFDA-Assays eine Zunahme der Konzentration Reaktiver Spezies nach Allicin im Wildtyp und der Δbcy1 Mutante suggerieren und bei Δtpk3 nach Allicinbehandlung auf einem niedrigen Niveau bleiben (Abbildung 34), ist im Lucigenin-Assay bei allen Behandlungen kein deutlicher Unterschied zur unbehandelten Kontrolle zu beobachten (Abbildung 35); dass das erhöhte DCFDA-Signal nicht darauf zurückzuführen ist, dass eine direkte Reaktion von DCFDA mit Allicin stattfindet, konnte durch eine Mischung von DCFDA mit Allicin in Abwesenheit von Zellen ausgeschlossen werden. Die Fluoreszenz nahm hierbei nicht zu. Das schließt aus, dass auch Allicin als Reaktive Schwefelspezies die Oxidation des DCFDA hervorrufen kann und so ein Artefakt in diesem Allicin hervorruft. Auch in Humanzellen wurde die Bildung reaktiver Spezies nach Behandlung mit Allicin, sowohl in Form von Knoblauchsaff als auch von chemisch synthetisiertem Allicin, verfolgt (Siehe Abbildung 52); die Ergebnisse dieses Versuches zeigen für Allicin nur eine marginale Zunahme der Fluoreszenz bei hohen Konzentrationen, bei Knoblauchsaff ist eine stärkere Antwort zu beobachten; eine detailliertere Diskussion dieser Resultate ist unter Abschnitt 4.5 gegeben.

Aufgrund des Umstandes, dass der etablierte Lucigenin-Assay ein deutliches Signal bei der Behandlung mit Naphthochinon zeigt, das bekannt ist, die Bildung von Superoxid zu induzieren

(Schopfer et al., 2008), bestätigt, dass dieser Assay auch für ROS-induzierende Substanzen in Hefe genutzt werden kann (Abbildung 35). Kulturen, die mit Allicin behandelt worden sind, zeigten jedoch keine Tendenz einer Veränderung im Lucigenin-Assay, weder im Wildtyp (Abbildung 36 A) noch in der $\Delta tpk3$ oder $\Delta bcy1$ -Mutante (Abbildung 36 B und C).

Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist, dass das positive DCFDA-Signal nicht durch Superoxid, sondern durch Stickstoffspezies hervorgerufen wird. Für eine Vielzahl von aktiven Komponenten des Knoblauchs ist eine Wirkung auf die RNS-Bildung in Säugetiersystemen bekannt (Ku et al., 2002), wenngleich andererseits auch gezeigt worden ist, dass in Makrophagen die Aktivität induzierbarer NO-Synthase gehemmt wird (Dirsch et al., 1998; Haase et al., 2012).

Es ist bedeutsam, zu untersuchen, welchen Einfluss die Behandlung von Allicin auf Hefezellen hinsichtlich der Akkumulation von NO hat. Dies wäre möglich, indem die Akkumulation von RNS (z. B. mittels Griess-Reagenz) verfolgt wird oder die Nitrosylierung von Tyrosin- oder Cysteinresten mittels Antikörpern verfolgt wird (Buchczyk et al., 2000). Erste Resultate von allicinbehandelten Hefezellen mit Griess-Assay legen eine Akkumulation von NO nahe, wenngleich diese Ergebnisse einer weiteren Überprüfung bedürfen.

Um schließlich physiologisch festzustellen, ob es eine Rolle von Reaktiven Sauerstoffspezies in der Wirkung von Allicin gibt, wurde erneut ein chemogenetischer Ansatz gewählt. Die Deletion von Faktoren, die an der Detoxifizierung von ROS beteiligt sind, sollten eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber Allicin aufweisen, wenn Allicin eine Akkumulation von ROS induziert und diese an der Wirkung des Allicins beteiligt sind. Eine Mutation in der cytosolischen Katalase CTT1, die an der Entgiftung von H_2O_2 beteiligt ist, sowie eine Mutation in der cytosolischen Superoxid-Dismutase SOD1 zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zum Wildtyp. Dieser Umstand deutet darauf hin, dass ROS nicht an der Toxizität des Allicins beteiligt sind. Ferner ist eine $\Delta sod2$ Mutante statistisch signifikant erhöht resistent gegenüber Allicin im Hemmhofstest (Abbildung 37). Für diese Mutante ist eine verringerte Resistenz gegenüber einer Vielzahl von Toxinen beschrieben mit Ausnahme der Resistenz gegen Ölsäure (Lockshon et al., 2012). Wie SOD2 an der Anfälligkeit von Hefezellen gegenüber Allicin beteiligt ist, lässt sich in diesem Kontext nicht weiter erklären und bedürfte eingehenderer Untersuchungen.

Aus diesen Daten lässt sich zusammenfassend schließen, dass – zumindest Reaktive Sauerstoffspezies – für die Toxizität des Allicins nicht von Bedeutung sind. Weil DCFDA auch eine hohe Reaktivität gegenüber RNS aufweist, lässt sich jedoch nicht ausschließen, dass möglicherweise RNS induziert werden, deren Rolle in Hefe nur ansatzweise verstanden sind.

4.3.6 Proteinkinase A reguliert die Apoptose via AIF1

Weil gezeigt worden war, dass eine $\Delta aif1$ Mutante eine dramatisch erhöhte Resistenz gegenüber Allicin aufweist (siehe Abbildung 22), sollte untersucht werden, ob es zwischen dem PKA-Signalweg und der Funktion des AIF1-Proteins eine Verbindung gibt. Die Translokation des proapoptotischen AIF1 Proteins ist eine notwendige Voraussetzung für die Induktion der Apoptose in Hefe (Wissing et al., 2004). In der Folge wäre also zu erwarten, dass Allicin auch eine Translokation des AIF1-Proteins

bewirkt. Durch ein AIF-GFP Fusionsprotein konnte gezeigt werden, dass Allicin in Wildtypzellen die Translokation in den Zellkern hervorruft (Bilder sind in Abbildung 38 gezeigt). Dies bestätigt, dass Allicin über AIF1 Apoptose zu induzieren in der Lage ist und unterstützt die Daten, die anhand der Mutantenstudie gewonnen wurden. Eine entsprechende Wirkung von Wasserstoffperoxid war bereits gezeigt worden (Wissing et al., 2004).

Zugleich wurde die Frage gestellt, ob die PKA auf einem noch nicht verstandenen Weg diese Lokalisationsänderung des AIF1 Proteins beeinflusst. Dies wäre ein möglicher Erklärungsansatz für die Beeinflussung des Zelltods und würde belegen, dass TPK3 Apoptose beeinflusst.

Die Translokation des AIF1-Proteins bleibt bei $\Delta tpk3$ Zellen aus, so dass davon auszugehen ist, dass TPK3 für den Translokationsprozess – entweder direkt oder indirekt - von Bedeutung ist (Abbildung 39). Ein allgemein anerkanntes Modell zur PKA-abhängigen Regulation von Zelltod besagt, dass die Protein-Kinase A an der Induktion von ROS beteiligt ist, die dann als ein „second messenger“ auf die Translokation des AIF-Proteins einwirken (Carmona-Gutierrez et al., 2010; Wissing et al., 2004). Eine direkte Interaktion zwischen AIF1 und PKA-Untereinheiten ist in den Interaktionsdaten der Yeast-Genome-Datenbank nicht aufgeführt, jedoch wird eine Interaktion zwischen AIF1 und dem Protein-Kinase C Signalweg auf genetischer Basis beschrieben (Costanzo et al., 2010). Sollte dieser Signalweg an der Regulation der AIF-Translokation beteiligt sein, würde dies bedeuten, dass eine Interaktion bzw. Überschneidung zwischen dem PKA- und PKC-Signalweg zu finden wäre.

Allein für das TPK3 Protein ist eine Vielfalt von Substraten beschrieben, von denen nicht bekannt ist, ob sie an der proapoptotischen Funktion des Signalweges beteiligt sind. Diese Faktoren zu identifizieren wäre notwendig, um die Rolle der TPK3 in der allicininduzierten Apoptose besser zu verstehen. Dazu könnten Mutanten von beschriebenen, physikalischen Interaktionspartnern der TPK3 hinsichtlich ihrer differentiellen Resistenz gegenüber Allicin untersucht werden. Auf diese Weise wäre eine Identifikation von Faktoren möglich, die direkte Substrate der TPK3 darstellen. Um Faktoren *downstream* davon weitergehend zu untersuchen, wäre beispielsweise eine vergleichende Gesamttranskriptanalyse von Wildtyp und $\Delta tpk3$ Zellen in unbehandeltem und allicin-behandeltem Zustand denkbar, die aufzeigt, in welcher Weise TPK3 an der Veränderung des Transkriptoms nach Allicinbehandlung beteiligt ist; dass Allicin das Transkriptom von Hefezellen massiv verändert, konnte bereits gezeigt werden (Yu et al., 2010).

Interessanterweise verhielt sich die $\Delta bcy1$ Mutante dem Wildtyp entsprechend, was wiederum nahelegt, dass BCY1 nicht an der Regulation des allicininduzierten Zelltods beteiligt ist.

Auch in Säugerzellen wurde die Rolle von PKA und AIF1 in der durch Allicin induzierten Apoptose gezeigt, wobei hier allerdings keine funktionelle Abhängigkeit der beiden Faktoren demonstriert wurde (Park et al., 2005). Es ist m.K.n. auch im Säugetiermodell keine direkte Interaktion des PKA-Signalweges und des AIF-Proteins bekannt.

Dieses Experiment lieferte zusätzliche Evidenzen dafür, dass AIF1 am allicininduzierten Zelltod in Hefe beteiligt ist und die TPK3 Untereinheit der PKA auf eine nicht verstandene Weise auf den Lokalisationsprozess einwirkt.

Neben dem Nachweis der Translokation von AIF durch Allicin wurde ferner getestet, ob eine Überexpression des AIF1-Proteins zu einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber Allicin führt. Dies ist eine weitere Bestätigung der Rolle von AIF in der allicininduzierten Apoptose.

Dazu wurde das AIF-GFP Konstrukt verwendet. Zunächst wurde die Funktion als AIF-Überexpressionslinie mit verschiedenen H_2O_2 -Konzentrationen getestet (vgl. Abbildung 40). Die Expression des Konstruktes wird durch Methioninmangel induziert; Zellen, die bei Methioninmangel kultiviert wurden, zeigen eine höhere Anfälligkeit gegenüber Wasserstoffperoxid im Vergleich zu Zellen, die in Anwesenheit von Methionin kultiviert wurden, die Expression des AIF-GFP Konstruktes also reprimiert wurde. Um auszuschließen, dass der Methioninmangel zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber H_2O_2 führt, wurden nichttransformierte Hefezellen in methioninhaltigem und methioninfreiem Medium kultiviert, mit H_2O_2 kultiviert und die Zelltodrate mittels Droptest ermittelt. Es konnte kein Unterschied in der Zelltodrate zwischen Zellen die mit und ohne Methionin kultiviert wurden, festgestellt werden. Somit ist davon auszugehen, dass die veränderte Resistenz der AIF-Linien wirklich auf die Expression des Proteins zurückzuführen ist.

Bei der Behandlung mit Allicin bzw. H_2O_2 zeigen die AIF-überexprimierenden Linien eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber der Behandlung im Vergleich zu nicht-induzierten Zellen (vgl. Abbildung 41). Dies entspricht der Erwartung aufgrund des Befundes, dass AIF1 für den Zelltod durch H_2O_2 oder Allicin notwendig ist. Ähnliches lässt sich auch für $\Delta bcy1$ feststellen und deckt sich somit weitgehend mit den Befunden der AIF-Lokalisationsstudie.

Wenn jedoch TPK3 eine Voraussetzung für die Aktivität des AIF1 Proteins darstellt, wäre zu erwarten, dass in der $\Delta tpk3$ Mutante eine Überexpression von AIF1 keinen Effekt haben sollte. Es ist jedoch zu beobachten, dass die absolute Resistenz zwar im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist, jedoch die Überexpression von AIF1 auch zu einer erhöhten Suszeptibilität im Vergleich zur nicht-induzierten Kontrolle führt. Eine Mutation im *TPK3*-Gen ist also nicht ausreichend, um die proapoptotische Wirkung einer AIF1 Überexpression gänzlich aufzuheben.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass verschiedene Versuche gezeigt haben, dass das AIF1 Protein für die Resistenz von Hefezellen gegenüber Allicin notwendig ist: Eine Mutante zeigt eine deutlich erniedrigte Resistenz gegenüber Allicin, die Überexpression ist bei einer Allicinbehandlung deutlich empfindlicher und Allicin induziert die Translokation des AIF1 Proteins, was für seine Resistenz notwendig ist.

Die Lokalisationsdaten des AIF1 Proteins im $\Delta tpk3$ Hintergrund legen nahe, dass die PKA auf eine nicht verstandene Weise die Lokalisation beeinflusst: Dies kann entweder direkt geschehen, indem PKA beispielsweise Transportproteine durch Phosphorylierung modifiziert oder indirekt durch eine Beeinflussung von Apoptose-Signalwegen, die ihrerseits wiederum die AIF-Lokalisation regulieren. Die Überexpressionslinie des AIF1 im $\Delta tpk3$ Mutantenhintergrund zeigte aber, dass eine Mutation in *TPK3* nicht ausreichend ist, um die Wirkung von AIF1 aufzuheben. Wiederum aber wurde deutlich, dass BCY1 offenbar nicht von zentraler Bedeutung ist für die Zelltodinduktion bei Behandlung mit Allicin.

Die Fragmentierung von Zellkernen gilt als ein zentraler Prozess der Wirkung des AIF (Wissing *et al.* 2004)

4.3.7 Zwischenfazit: Modellübersicht und ein erster Ausblick

In diesem ersten Abschnitt wurde gezeigt, dass Allicin in der Lage ist, Apoptose in Hefezellen zu induzieren. Als ein bedeutsamer Resistenzfaktor wurde Glutathion identifiziert, dessen Oxidation mit der Induktion von Apoptose korreliert. Wie weitere Ergebnisse zeigten, scheinen im Gegensatz dazu Thioredoxine bei der Resistenz gegenüber Allicin von nachrangiger Bedeutung zu sein. Es ist damit gelungen, ein für tierische und pflanzliche Systeme geltendes Modell, dass der zelluläre Redoxstatus mit dem physiologischen Status der Zelle korreliert (Kranner *et al.*, 2006; Schafer und Buettner, 2001) auf Hefe zu übertragen. Die besondere Rolle des Glutathions für die Resistenz gegenüber Allicin konnte auch in *Arabidopsis* nachgewiesen werden. Die *pad2* Mutante, die im *GSH1* Gen defizient ist, ist ebenfalls erhöht empfindlich gegenüber Allicin. In den tierischen Zelllinien, die getestet wurden, zeigte sich eine Korrelation zwischen Zelltod und der Oxidation von Glutathion durch Allicin. All diese Befunde deuten darauf hin, dass Glutathion entscheidend ist für die toxische Wirkung des Allicins.

Ferner konnte mittels Phalloidin-Färbung gezeigt werden, dass Allicin auf das Actin-Cytoskelett einwirkt; davon ausgehend wurde erwartet, dass RAS2 bedeutsam ist sowie nachfolgend der cAMP/PKA-Signalweg, was anhand von Mutantenstudien bestätigt werden konnte. Auch im Pflanzensystem konnte bereits eine Beeinflussung des Actin-Cytoskeletts belegt werden, indem gezeigt wurde, dass die Actin-abhängige protoplasmische Strömung in hyalinen Zellen von *Tradescantia fluminensis* zum Erliegen kommt (B.Sc.-Arbeit Miriam Schreiber, *unveröffentlicht*). Aus diesen Befunden wurde das folgende Arbeitsmodell entwickelt (Abbildung 62):

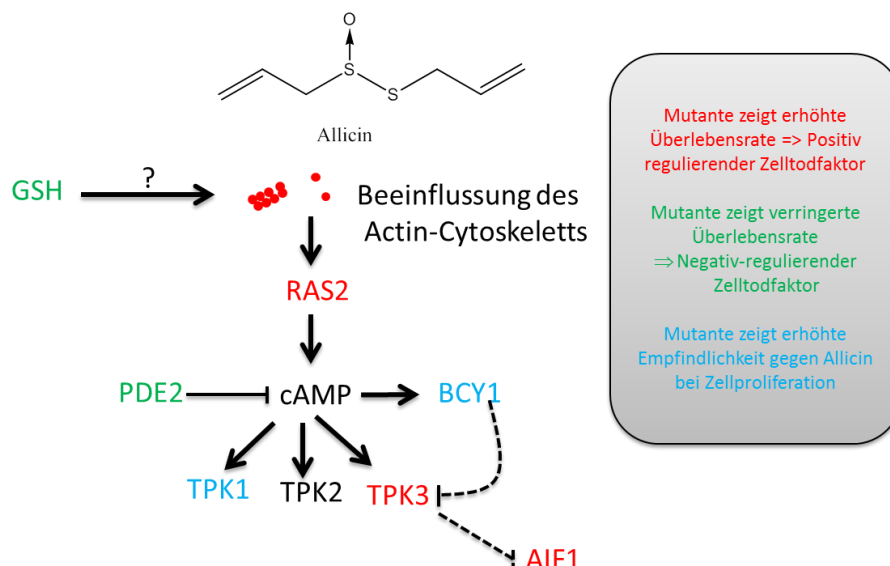


Abbildung 62: Zwischenstand des Modells der Wirkung von Allicin auf Hefezellen

Zwischenstand des Modells zur Signaltransduktion von allicininduziertem Zelltod: Allicin wirkt auf das Actin-Zytoskelett der Hefe, was eine Aktivierung der RAS2-GTPase bewirkt. Diese Interaktion zwischen Cytoskelett und RAS-Aktivierung scheint belegt (Breitenbach *et al.*, 2005). RAS2 wiederum fördert die Synthese von cAMP durch Interaktion mit der Adenylatcyclase; die Rückreaktion von

cAMP zu AMP wird durch die PDE2 katalysiert. Das Gleichgewicht aus PDE2- und Adenylatcyclase-aktivität reguliert die Konzentration von cAMP, dessen Bindung an die Proteinkinase A die Aktivierung dieser Signalkaskade bedingt. Es gibt eine Verbindung zwischen TPK3 und AIF1, die offenbar darin besteht, dass TPK3 an der Regulation der AIF-Lokalisation beteiligt ist. Nachfolgend zu prüfen bleiben die Rolle von GSH als Puffersubstanz gegen die Wirkung des Allicins auf das Actincytoskelett und die Verbindung von TPK3 und AIF1.

Bislang blieb jedoch die Beobachtung, dass Allicin auf das Actin-Cytoskelett wirkt und die Beobachtung, dass *Δras2* eine veränderte Resistenz gegen Allicin aufweist, auf rein korrelativer Basis. Nachfolgend wird es notwendig sein, die Abhängigkeit der RAS2 Aktivierung durch die Beeinflussung des Cytoskeletts funktionell nachzuweisen. Als Maß für die Aktivität der RAS2-Aktivierung kann die Akkumulation von cAMP genutzt werden, weil RAS2 direkt auf die Adenylatcyclase CYR1 einwirkt und die Aktivität dieses Proteins beeinflusst (Bhattacharya et al., 1995). Eine Möglichkeit, diesen Effekt zu studieren, wäre, die cAMP-Level in allicinbehandelten Wildtyp-Zellen und in Hefemutanten, die in der Polymerisation bzw. Depolymerisation des Actincytoskeletts beeinflusst sind, zu quantifizieren. So zeigt die *Δend3* Mutante eine ausgedehnte Akkumulation von filamentösem (F-)-Actin, die zur Induktion von Apoptose führt (Gourlay und Ayscough, 2005a); möglicherweise würde bei diesem Stamm Allicin in subletalen Dosen eine Erhöhung der Überlebensrate im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bedingen.

Ferner stellt sich die Frage, ob Glutathion als Redoxpuffer auf die Polymerisation des Actins Einfluss nimmt. Deshalb wäre es nützlich, die Phalloidin-Färbung neben Wildtyp-Zellen auch bei Glutathion-Synthesemutanten bzw. der *Δglr1* (Glutathion-Reduktase) zu wiederholen, um zu testen, ob bei diesen Mutanten bereits bei geringeren Allicin-Konzentrationen ein Effekt auf das Actin-Cytoskelett zu beobachten ist und das Glutathionsystem einen Schutzmechanismus für das Actin-Cytoskelett darstellt.

Möglicherweise wäre nachfolgend eine Quantifizierung der cAMP-Level in unbehandelten und mit Allicin behandelten Glutathion-Mutanten sinnvoll.

Zur Messung der cAMP-Konzentrationen kämen käufliche, auf dem ELISA-Prinzip basierende Kits sowie HPLC-basierte Verfahren (Spoto et al., 1991) in Frage.

Dass bezüglich des Zelltodes TPK3 und hinsichtlich der Zellproliferation die PKA-Untereinheiten TPK1 und BCY1 von Bedeutung sind, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Um die Weise, in der TPK3 den Zelltod beeinflusst, mehr im Detail zu verstehen, wäre es notwendig, Faktoren, die unterhalb von TPK3 (bzw. im Falle der Zellproliferationsinhibition BCY1 und TPK1) agieren, auf ihren Einfluss auf den allicinbedingten Phänotyp hin zu untersuchen. Dazu können mittels Datenbankanalyse direkte physikalische Interaktionspartner der jeweiligen Untereinheiten identifiziert werden, von denen Mutanten auf einen abweichenden Phänotypen hin untersucht werden können.

Der AIF1-induzierte Zelltod ist nicht so gut verstanden wie die Entsprechung in Säugetiersystemen. Zwar ist eine Interaktion mit der Nuclease NUC1 gezeigt, die für Effekte auf DNA verantwortlich ist (DNA-Laddering, Kernfragmentierung) (Wissing et al., 2004). Signalwege *upstream* von AIF1 sind jedoch weitestgehend unverstanden, so dass es zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht möglich ist

abzuschätzen, an welcher Stelle TPK3 bzw. seine *downstream* Faktoren eingreifen. Ein interessanter Befund besteht darin, dass AIF zumindest auf Ebene der Transkription durch den Transkriptionsfaktor YAP1 reguliert wird (Gasch et al., 2000), dessen Rolle in der Allicinresistenz ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit bearbeitet wurde.

4.4 Beteiligung des YAP1-Transkriptionsfaktors an der Resistenz gegenüber Allicin

Im vorangegangenen Teilprojekt wurde versucht, Faktoren zu identifizieren, die an der Zelltodinduktion in Hefezellen durch Allicin beteiligt sind. Eine weitere wichtige Frage für das Verständnis der Toxizität des Allicins ist die Frage nach Resistenzmechanismen.

In einem Mikroarrayexperiment wurde gezeigt, dass das am stärksten differenziell regulierte Gen nach Behandlung mit Allicin der uncharakterisierte Open-Reading-Frame YKL071w ist (Yu et al., 2010). Weil bereits für eine Vielzahl von anderen thiolreaktiven Substanzen eine erhöhte differenzielle Expression dieses ORF in unterschiedlichen Genechip-Experimenten gezeigt worden ist (Iwahashi et al., 2006; Trott et al., 2008) und der ORF für die Resistenz von Hefezellen gegenüber Furfural bedeutsam ist (Heer et al., 2009), wurde die Hypothese aufgestellt, dass möglicherweise der ORF an der Resistenz gegen Allicin beteiligt ist. Für diese Hypothese spricht, dass BLAST-Analysen der Aminosäureabfolge des YKL071w-Peptids eine Verwandtschaft zu Short-Chain Alkohol-Dehydrogenasen, also Enzymen der Oxidoreduktase-Familie, aufweisen, die auch an der Redoxregulation in Hefezellen beteiligt sein könnten. Aufgrund der geschilderten Eigenschaften wurde YKL071w mit OSI1 (oxidative stress-induced 1) bezeichnet, was den Umstand widerspiegelt, dass die Expression durch thiol-reaktiven oder oxidativen Stress induziert wird.

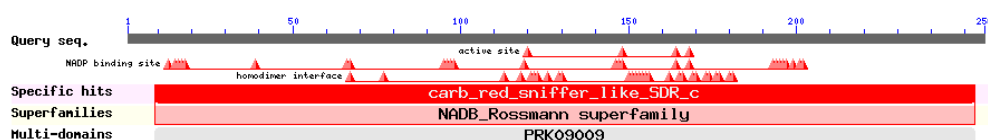


Abbildung 63: BLAST-Analyse des YKL071w-Peptids

Das Peptid aus *S. cerevisiae* zeigt Ähnlichkeiten zu Oxidoreduktasen der s.g. Rossmann-Superfamilie, die eine charakteristische Struktur aufweisen.

Es wurde die Resistenz von *osi1*-Mutantenzellen und einer OSI1-Überexpression im Vergleich zu Wildtyp-Zellen im Hemmhofstest gegen Allicin und H₂O₂ quantifiziert. Der Einfluss einer OSI1-Mutation bzw. Überexpression ist bei der Behandlung mit Allicin deutlich schwächer als bei der Behandlung mit Wasserstoffperoxid, was darauf hindeutet, dass OSI1 für die Resistenz von Hefezellen gegenüber Allicin von nachrangiger Bedeutung ist (Abbildung 47). Das wiederum belegt, dass die Wirkweise von Allicin als Thiolreagenz nicht mit der von beispielsweise Furfural zu vergleichen ist, an der OSI1 beteiligt ist (Heer et al., 2009).

Obwohl *OSI1* nicht zentral an der Resistenz gegen Allicin beteiligt ist, wird die Expression des Gens durch Allicin massiv induziert. Diese beschriebene Eigenschaft (Yu et al., 2010) wurde mittels qPCR überprüft. Eine Behandlung von BY4742 Zellen mit Allicin in einer finalen Konzentration von 100 μM führte zu einer signifikanten Zunahme der Genexpression, normiert auf das Gen *YBR044c*, das mittels Datenbankanalyse als stabil exprimiert bei Behandlung mit unterschiedlichen Stimuli identifiziert wurde (Abbildung 43).

Eine Ursache für die Regulation des *OSI1* Gens wurde gefunden in der Promotersequenz des Gens, die eine Akkumulation von YAP1 Bindestellen aufweist. Die Vielzahl der Bindestellen des YAP1-Transkriptionsfaktors legen nahe, dass die Expression von *OSI1* in unmittelbarem Zusammenhang zur oxidativen Aktivierung des YAP1-Proteins steht.

Der Export von YAP1 aus dem Zellkern wird durch die Ausbildung eines intramolekularen Disulfids verhindert, so dass nach oxidativer Modifikation der Transkriptionsfaktor im Zellkern verbleibt und dort zu einer Modifikation der Transkription führt. Daraus ergaben sich die Fragen, ob YAP1 tatsächlich für die allicin-induzierte *OSI1*-Expression verantwortlich ist und ob man die *OSI1*-Expression als Marker für die Aktivität des YAP1-Transkriptionsfaktors nutzen kann. Eine solche Anwendung wäre analog zum Nrf2/Keap Reportersystem in Säugetierzellen (beispielsweise: Smirnova et al., 2011). Interessanterweise zeigt YKL071w neben dieser genetischen Interaktion mit YAP1 als Protein eine physikalische Interaktion mit YAP6 (Idziorek et al., 1995), was eine Beteiligung von anderen Vertretern der YAP1-Familie an der Antwort auf Allicin nahelegen würde.

Um diese Fragen zu beantworten, wurde in der Forschungsarbeit von Ivan Schlembach (RWTH Aachen) ein Konstrukt erstellt, bei dem die Promoter-Region des *OSI1*-Gens (1 kb *upstream* vom Startcodon des *OSI1*-ORF) die Expression einer Luciferase reguliert. Dieses Konstrukt wurde sowohl in Wildtyp-Zellen als auch in *yap1*-Mutantenzellen transformiert, um zu überprüfen, ob der YAP1-Transkriptionsfaktor tatsächlich für die *OSI1*-Expression bedeutsam ist.

Dabei ergab sich, dass die Aktivität des *OSI1*-Promoters nicht nur durch Allicin, sondern auch durch H_2O_2 und Diamid stimuliert wird, allerdings wurden deutlich höhere Konzentrationen dieser Oxidationsmittel benötigt, um die gleiche Luciferase-Aktivität zu erzielen im Vergleich zu Allicin. Diamid ist ein Thiolreagenz, das in einer Vielzahl von Studien verwendet worden war (Gulshan et al., 2011; Kuge et al., 2001). Daraus lässt sich schließen, dass Allicin besonders aktiv ist bezüglich der oxidativen Ausbildung von Disulfiden (Abbildung 45). Inwieweit die Disulfidbrücken jedoch intramolekulare Disulfide darstellen oder es durch die Interaktion mit Allicin zu einer Proteinmodifikation vom Typ einer Thioallylierung kommt, ist gegenwärtig noch nicht geklärt. Deutlich wird jedoch, dass Allicin eine Aktivierung von YAP1 bewirkt.

In *yap1*-Mutantenzellen wurde jedoch bei keiner Behandlung eine Induktion der Luciferase-Expression beobachtet, so dass davon auszugehen ist, dass YAP1 für die Regulation der Luciferase-Expression entscheidend ist und eine Bindesequenz des PDR3-Transkriptionsfaktors, die ebenfalls in der Promoterregion liegt, keine oder nachrangige Bedeutung hat (Abbildung 46).

Die *OSI1* Expression ist also spezifisch abhängig von der YAP1-Aktivität. In früheren Studien wurde stets das *TRX2*-Gen der Hefe verwendet, um eine YAP1-abhängige Modifikation der Genexpression zu

belegen. Es wurden dabei z. B. β -Galactosidase Konstrukte unter Kontrolle des *TRX2*-Promoters erstellt (Gulshan et al., 2005). Nachteilig an diesem System ist, dass die Expression von *TRX2* nicht ausschließlich von YAP1, sondern auch durch den Transkriptionsfaktor SKN7 reguliert wird (Morgan et al., 1997). Für die Idee, ein durch YAP1 reguliertes Gen als Biomarker oxidativen Stresses zu nutzen, erscheint das *OSI1*-Gen dem *TRX2* Gen zum gegenwärtigen Zeitpunkt überlegen, weil aufgrund der gewonnenen Befunde es scheint, als sei die Regulation des *OSI1* Gens allein abhängig vom redox-regulierten YAP1-Protein. Damit stellt das OSI1-Konstrukt einen vielversprechenden Redoxsensor dar.

in einem weiteren, unabhängigen Assay wurde die Eigenschaft von Allicin getestet, die Lokalisation von YAP1 zu beeinflussen. Analog zum AIF1 Protein wird auch die Funktion von YAP1 durch seine Lokalisation bedingt. Reduziert wird YAP1 aus dem Kern exportiert, in oxidiertem Zustand kann dieser Transport nicht mehr erfolgen (Delaunay et al., 2000). Eine Kernlokalisation ist Voraussetzung für die Funktion von YAP1. Deshalb wurde getestet, ob Allicin tatsächlich die Lokalisation des YAP1 Protein beeinflusst. Dazu wurde ein YAP1-GFP Fusionsprotein in BY4742-Wildtyp-Zellen eingebracht und die Lokalisation des Fusionsproteins nach Allicin- bzw. H_2O_2 -behandlung beobachtet. Weil eine Ausbildung einer Disulfidbrücke den Export des YAP1-Proteins durch das Kernexportin CRM1 unterbindet, ist zu erwarten, dass nach Behandlung mit Oxidanzien eine erhöhte Rate von Zellen zu finden ist, die ein klares kernlokalisiertes YAP1-GFP-Signal aufweisen.

Dass eine Behandlung mit verschiedenen Oxidanzien die Kernlokalisation von YAP1 erhöht, ist mit dieser Methode gezeigt worden (so für H_2O_2 , Diamide oder Diethylmaleimide (Coleman et al., 1999; Kuge et al., 1997). Die Beobachtung ließ sich für H_2O_2 in unserem System bestätigen und für Allicin erweitern (Siehe Abbildung 48). Es lässt sich also schlussfolgern, dass Allicin die Kernlokalisation des YAP1-Proteins bedingt durch Oxidation von spezifischen Cysteinresten, wobei noch zu zeigen sein wird, ob dies durch Ausbildung eines intramolekularen Disulfids geschieht oder durch eine Thioallylierung der Cysteinreste durch Allicin. Dies kann geschehen durch Aufreinigung des YAP1-Proteins aus allicinbehandelten Zellen und einer anschließenden massenspektrometrischen Untersuchung, wobei ein thioallyliertes Protein einen Massenunterschied von 72 Da aufweisen sollte.

Die Regeneration des YAP1 Proteins vom oxidierten in den reduzierten Zustand erfolgt gemäß der Literatur durch *TRX2* (Okazaki et al., 2007). In einer $\Delta trx2$ -Mutante wäre also nach einem oxidativen Stimulus eine verlängerte und verstärkte Aktivität des YAP1 Proteins zu erwarten. Interessanterweise ist die $\Delta trx2$ -Mutante deutlich empfindlicher gegen H_2O_2 und in deutlich geringerem Ausmaß, aber statistisch signifikant, gegen Allicin.

Um die Beobachtung, dass Allicin auf die Aktivität des YAP1 Transkriptionsfaktors Einfluss nimmt, für die Arbeit nutzbar zu machen und weitergehend die Toxizität des Allicins zu verstehen, wurde untersucht, ob YAP1 als zentraler transkriptioneller Regulator oxidativen Stresses in Hefe (Stephen et al., 1995) auch für die Resistenz gegenüber Allicin von Bedeutung ist. $\Delta yap1$ Mutanten sind deutlich anfälliger gegen die Behandlung mit Allicin als der Wildtyp (Siehe Abbildung 49) Als Kontrolle wurde Wasserstoffperoxid verwendet, dessen Resistenz bekanntermaßen durch YAP1 reguliert wird (Kuge et al., 1997; Okazaki et al., 2007). Dabei reguliert YAP1 die Transkription des für die Entgiftung des

H₂O₂ wichtigen Catalase-Enzyms CTT1 (Lee et al., 1999), was die außerordentliche Bedeutung des YAP1 Proteins für die Resistenz von Hefe gegenüber H₂O₂ erklärt. Dieser Befund spiegelt sich auch in den Ergebnissen wider, die in dieser Arbeit im Hemmhoftest gewonnen wurden. Während die eingesetzten H₂O₂-Konzentrationen nur kleine Hemmhöfe verursachen, ist die *yap1* Mutante hypersensitiv gegenüber H₂O₂-Exposition.

Es wurde gezeigt, dass für die Resistenz gegen Allicin Glutathion von Bedeutung ist. Es ist bekannt, dass auch Schlüsselenzyme des Glutathionstoffwechsels durch YAP1 reguliert werden (so *GSH1* (Wu und Moye-Rowley, 1994) oder *GLR1* (Grant et al., 1996a)). Es wurde also die Hypothese aufgestellt, dass YAP1 bedeutsam ist für die Resistenz gegen Allicin. Zwar ist die Differenz zwischen Mutante und Wildtyp hinsichtlich der Resistenz gegenüber Allgaschicin nicht in der Stärke ausgeprägt, verglichen zu H₂O₂, dennoch wird deutlich, dass *yap1* deutlich sensibler gegen Allicin ist als der Wildtyp. Dass der Effekt einer YAP1-Mutation schwächer ist bei Allicin als bei H₂O₂ lässt sich durch den Umstand erklären, dass die Gene des Glutathionmetabolismus außer über YAP1 auch über den Transkriptionsfaktor SKN7 reguliert werden (Lee et al., 1999) und somit ein polygenes Merkmal darstellt. Weil YAP1 auch die Expression der Catalase reguliert (s.o.), ist in einer $\Delta yap1$ Mutante einer der zentralen Detoxifizierungsmechanismen unterdrückt. Das dürfte die Hypersensibilität der $\Delta yap1$ Mutante erklären.

Um die Rolle von YAP1 in der Resistenz von Hefezellen gegen Allicin besser zu verstehen, wird es künftig notwendig sein, weitere Faktoren zu analysieren, die möglicherweise bedeutsam sind für die Funktion des YAP1-Transkriptionsfaktors. So ist beispielsweise die Rolle des YAP-binding Proteins 1 (YBP1; YBR216) bei der Aktivierung des YAP1 Proteins durch Allicin bislang nicht untersucht. Für eine ROS-abhängige Aktivierung des YAP1-Proteins ist die Glutathion-Peroxidase 3 (GPX3) notwendig. Es ist zu erwarten, dass dieses Protein für die Aktivierung des YAP1-Proteins durch Allicin nicht essentiell ist, unter der Voraussetzung, dass die Oxidation des YAP1 durch Allicin selbst und nicht durch ROS bedingt wird.

Die Beobachtung, dass YAP1 beiträgt zur Resistenz von Hefezellen gegenüber Allicin, wurde gänzlich unabhängig gemacht von der Bearbeitung der PKA. Verschiedene Publikationen deuten jedoch auf eine Verzahnung zwischen PKA- und YAP1 Signalweg hin. So wurde gezeigt, dass die BCY1 Untereinheit die Funktion des YAP1-Gens negativ beeinflusst, ein erhöhtes cAMP Level (das notwendig ist für die PKA-Aktivität) die YAP1 Aktivität aber nicht beeinflusst (Hasan et al., 2002). Es ist also davon auszugehen, dass die YAP1-modifizierende Aktivität des BCY1-Proteins ein cAMP-unabhängiger Prozess ist. Für ein tiefergehendes Verständnis der Wirkung von Allicin auf Hefezellen ist es bedeutsam, diese Querverbindung mehr im Detail zu verstehen.

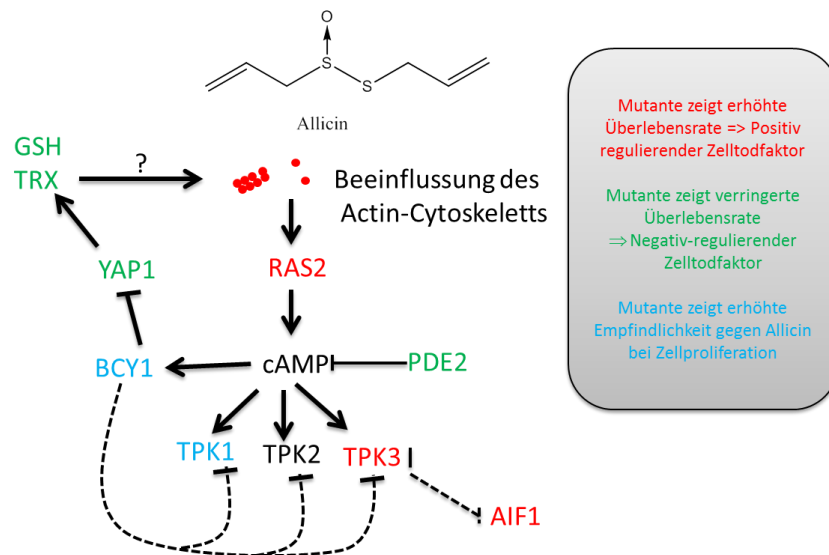


Abbildung 64: Erweiterung des Modells der Wirkung von Allicin auf Hefezellen

Allicin aktiviert den PKA Signalweg, der auch mit YAP1 in Verbindung steht. YAP1 wiederum reguliert die Synthese des Glutathions, von dem gezeigt worden ist, dass es einen entscheidenden Resistenzfaktor gegenüber Allicin darstellt. Dabei reguliert YAP1 die Glutathion-Biosynthese (GSH1).

4.5 Wirkungen von Allicin und Knoblauchsaff auf Säugetierzellen

Die Erforschung der molekularen Wirkung des Allicins kann für verschiedene Anwendungen von Bedeutung sein. So ist die antimikrobielle Wirkung von Knoblauchpräparationen neben der medizinischen auch für die landwirtschaftliche Nutzung von Bedeutung (Slusarenko et al., 2008).

Darüber hinaus sind die gesundheitlichen Aspekte des Knoblauchs von Belang, weil Knoblauch als Nahrungsmittel genutzt wird. Die Eigenschaften des Allicins, in verschiedenen tierischen und menschlichen Zellsystemen Apoptose induzieren zu können, ist verschiedentlich gezeigt worden (Oommen et al., 2004; Park et al., 2005). Bereits 1960 wurde ein Experiment durchgeführt, im Zuge dessen eine Präinkubation von Tumorexplantaten in Allicin vor einer Implantation in gesunde Mäuse ein vollständiges Abtöten der Explantate zur Folge hat und keine Krebsentstehung erfolgte wie in den Mäusen, in die unbehandelte Tumorexplante eingepflanzt wurde (Di Paolo und Carruthers, 1960). Eine Verabreichung von Allicin auf dem Nahrungswege führte nicht zu einer Verringerung des Tumorwachstums (*ibid.*).

In diesem Versuchsteil sollte die Wirkung von Knoblauchsaff und chemisch synthetisiertem Allicin als seinem putativen Wirkprinzip auf unterschiedliche Säugetierzellen untersucht und verglichen werden. Dieser rein deskriptive Befund sollte Informationen über unterschiedliche Empfindlichkeit von Zell-Linien liefern und diese mit physiologischen Größen wie der Akkumulation reaktiver Spezies und Glutathionoxidation korrelieren. Die Veränderung des GSH/GSSG Gleichgewichtes zu Gunsten von GSSG bewirkt eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber der Induktion von Apoptose (Voehringer, 1999).

In einem ersten Ansatz sollte durch Nachweis von reduziertem Glutathion mittels Monobromobiman untersucht werden, ob Allicin in den unterschiedlichen Zelllinien von Maus und Mensch auf die Behandlung des Allicins bzw. Knoblauchsafes mit einer Abnahme an reduziertem Glutathion reagiert, was sich in einer Abnahme der Fluoreszenz bemerkbar macht. Mit dieser Methode ist es nicht möglich, die Zunahme an oxidiertem Glutathion zu messen, weil das fluoreszierende Bimanaddukt nur an der reduzierten Thiolgruppe von GSH gebildet wird (Sanchez-Fernandez et al., 1997).

Dabei unterscheiden sich die verschiedenen Zelllinien in ihrer Fluoreszenzintensität in der Kontrolle erheblich, die dann konzentrationsabhängig abnimmt (Abbildung 51). Eine Zunahme der Fluoreszenz, die für eine Erhöhung des GSH-Spiegels sprechen würde, wie es für vaskuläre Endothelzellen beobachtet worden ist (Horev-Azaria et al., 2009), konnte nicht beobachtet werden, weder für die Behandlung mit Allicin noch mit Knoblauchsaft. Die Effekte von chemisch synthetisiertem Allicin und Knoblauchsaft sind gut miteinander vergleichbar, so dass davon auszugehen ist, dass der Redoxeffekt bei Knoblauchsaft auf Allicin zurückzuführen ist.

Mit dieser Methode kann nicht, wie beim Glutathion-Recycling Assay, sowohl GSH als GSSG quantitativ bestimmt werden; einzig die relative GSH-korrelierte Fluoreszenz ergibt ein (semiquantitatives) Ergebnis über den glutathionbasierten Redoxzustand der Zelle. Es kann also nicht unterschieden werden zwischen der Bildung eines intramolekularen Disulfids (GSSG) oder einer Bildung mit S-Allyladdukten, wie sie in *in vitro* Experimenten beobachtet wurden (Rabinkov et al., 2000). S-Allyladdukte des Glutathions (S-Allylmercaptogluthione) weisen verschiedene biologische Funktionen auf: So inhibiert GSSA die Zellproliferation von HuT 78 Zellen (Nepravishta et al., 2012) und das Cysteinderivat CSSA zeigt eine anticancerogene Aktivität in einer Vielzahl von Zelllinien (Liang et al., 2011), so dass davon auszugehen ist, dass diese Intermediate in der Toxizität des Allicins von Bedeutung sind. Eine weitergehende Untersuchung zur Bildung von GSSA bzw. CSSA nach Allicinexposition in Säugetierzellen sowie eine weitergehende Untersuchung der molekularen Wirkung dieser Cystein- und Glutathionaddukte des Allicins stehen noch aus.

Die Abnahme der Monobromobiman-Fluoreszenz kann sowohl durch die direkte Reaktion von Glutathion mit Allicin und nachfolgender Bildung von GSSA bzw. GSSG erklärt werden als auch durch die Möglichkeit der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies. Allicin gilt aufgrund seiner Eigenschaft, die Expression antioxidativer Enzyme zu fördern als physiologisches Antioxidans (Liu et al., 2010), obwohl es chemisch ein Oxidationsmittel darstellt.

Bei der Messung der Bildung von Reaktiven Spezies zeigt sich bei diesem Assay eine deutliche Abweichung zwischen chemisch-synthetisiertem Allicin, das nur eine minimale Zunahme der ROS-Produktion verursacht und Knoblauchsaft, das eine massive Induktion der ROS Produktion bedingt. Es ist wahrscheinlich, dass die Zellen auf andere Komponenten des Knoblauchsafes mit der Bildung Reaktiver Spezies antworten (z. B. Proteine in Knoblauchsaft). Ferner ist bekannt, dass andere potentiell im Knoblauchsaft enthaltene Substanzen (wie Polysulfane) die Bildung von ROS (Lin et al., 2008) induzieren, so dass sich die beobachtete Zunahme von ROS auch auf das Vorhandensein dieser

Substanzen zurückführen ließe (Wu et al., 2005), die in chemisch synthetisiertem Allicin nicht zu finden sind.

Wie schon in den Heferversuchen gezeigt, führt Allicin nur zu einer geringen Zunahme des Gehaltes an Reaktiven Sauerstoffspezies (Abbildung 52). Die Oxidation des Glutathions ist also bei Behandlung mit Allicin direkt durch das Allicin bedingt.

4.5.1 Einfluss von Knoblauchsaff und synthetischem Allicin auf die Zellproliferation

Die Einflussnahme von Knoblauchsaff bzw. Allicin als chemisch synthetisierter Substanz auf die Proliferation von Zellen ist von besonderer Bedeutung für ein Erwägen dieser Komponenten als Agenzien, die eine Aktivität gegenüber Krebszellen zeigen. Ein cytostatischer Effekt kann dabei – neben direkten cytotoxischen Effekten – von großem therapeutischem Interesse sein (Rixe und Fojo, 2007).

Der Einfluss von Knoblauchsaff und Allicin auf die Zellproliferation wurde mit dem ^3H -Thymidin-Assay verfolgt, der darauf basiert, dass ein radioaktiv markiertes Nucleosid (^3H -Thymidin) in neu synthetisierte DNA im Zuge der mitotischen Teilung von Zellen inkorporiert wird. Nach Waschen der Zellen und damit verbundenem Beseitigen des nicht inkorporierten ^3H -Thymidins kann durch das radioaktive Signal mittel Scintillation auf die Menge inkorporierten Thymidins geschlossen werden, was ein Maß für die Neusynthese von DNA und damit mitotischer Teilung darstellt.

Zwischen den unterschiedlichen Zell-Linien zeigen sich in der unbehandelten Kontrolle deutliche Varianzen hinsichtlich ihrer Proliferation (Abbildung 53). Die A549 Zelllinie zeigt die stärkste Proliferation, die durch geringe Mengen Knoblauchsaff (bis zu einer Allicin-Konzentration von 0,0094 mM) geringfügig stimuliert wird. Die Proliferationsrate der übrigen Zelllinien ist deutlich geringer und zeigt frühzeitig eine konzentrationsabhängige Inhibition der Proliferation durch Allicin. Dabei ist der Unterschied zwischen A549 und den übrigen getesteten Zelllinien deutlich bei einer Allicin-Konzentration von 0,0375 mM Allicin (in Knoblauchsaff; Abbildung 53, oberes Diagramm), bei der A549 nicht komplett inhibiert wird, die übrigen getesteten Zelllinien jedoch eine nahezu vollständige Inhibition der Zellproliferation aufweisen. Ab einer Konzentration von 0,075 mM Allicin (in Knoblauchsaff) wird die Zellproliferation in allen Zelllinien komplett inhibiert.

Ein sehr ähnliches Bild ergibt sich für chemisch synthetisiertes Allicin ((Abbildung 53, unteres Diagramm). Auch hier ist 0,075 mM Allicin eine Schwellenkonzentration, bei der (mit Ausnahme von A549, die noch eine marginale Proliferationsaktivität aufweist) eine vollständige Proliferationsinhibition erreicht wurde. Dieser Befund passt zur Feststellung, dass bei 0,075 mM die Bimanfluoreszenz ein Minimum erreicht, was darauf hindeutet, dass GSH ab dieser Konzentration oxidiert vorliegt. Es scheint also eine Korrelation zwischen der GSH-Oxidation und der Inhibition der Zellproliferation zu geben. Die Beziehung zwischen dem Glutathion-Redoxzustand und der Zellproliferation in Säugetierzellen ist beschrieben (Aw, 2003). Eine Beeinflussung der Zellproliferation durch Allicin wurde bereits für andere Zell-Linien beschrieben (Hirsch et al., 2000); es ist zu vermuten, dass in der Oxidation des Glutathions ein Erklärung für die cytostatische Wirkung

des Allicins liegt. Ein mögliches Target ist NF κ B, das durch eine Verschiebung des GSH/GSSG Gleichgewichts aktiviert wird (Christman et al., 2000).

Es ist bereits beschrieben worden, dass Allicin die Zellproliferation inhibiert (Bat-Chen et al., 2009; Hirsch et al., 2000). Der Mechanismus der Proliferationsinhibition durch Allicin ist nicht im Detail verstanden. Ein möglicher, postulierter Mechanismus ist eine Redoxaktivierung von p21^{ras}. Eine Untersuchung der Inhibition von Zellteilung in Bakterien legt darüber hinaus nahe, dass Allicin direkt auf die DNA und RNA-Synthese wirkt (Feldberg et al., 1988). Auch in CB2 Tumor Zellen konnte gezeigt werden, dass Allicin die Zellproliferation und DNA-Synthese inhibiert (Campas-Baypoli et al., 2010; Miron et al., 2003). Inwieweit daran die Eigenschaft des Allicins, an DNA zu binden beteiligt ist, muss im Weiteren noch untersucht werden (*ibid.*).

4.5.2 Allicin verringert die Überlebensrate unterschiedlicher Zelllinien

Neben der Beeinflussung der Zellproliferation ist die Toxizität von Allicin (in Form von Knoblauchsaff bzw. als chemisch synthetisiertes Allicin) von großem Interesse. Verschiedentlich ist für Allicin gezeigt worden, dass es in der Lage ist, in verschiedenen Säugetierzelllinien Zelltod zu induzieren, z.B. (Park et al., 2005). Dieser Effekt ist auch genutzt worden, indem ein Antikörper, der spezifisch an CD20 als Epitop einer B-Zelllymphozyten Leukämie bindet, an Alliinase gekoppelt wurde und so erlaubt, *in situ* Allicin zu produzieren (Arditti et al., 2005).

Wiederum zeigt sich ein vergleichbares Bild zwischen chemisch synthetisiertem Allicin und Knoblauchsaff. In beiden Behandlungen zeigt sich die HUVEC-Zelllinie deutlich sensibler gegenüber der Behandlung mit Allicin als die übrigen getesteten Zelllinien. Auffällig ist, dass auch hier bei 0,075 mM ein maximaler Effekt beobachtet wird. Diese Konzentration ist in allen getesteten Zelllinien gleich und korreliert, wie schon für die Zellproliferation gezeigt wurde, mit einem maximalen Effekt im Monobromobiman-Assay.

Dies spricht dafür, dass die Regulation der Zellproliferation und des Zelltods korreliert mit der Konzentration an reduziertem Glutathion. Aufgrund einer Vielzahl von Beobachtungen, dass der Zustand des Glutathion-Redoxpuffers eng korreliert ist mit dem physiologischen Zustand der Zelle, spiegelt sich in dem Modell wider, das Schafer und Buettner entwerfen, indem sie das zelluläre elektrochemische Redoxpotential zur Vorhersage des Zustandes in Zellen vorhersagen (Schafer und Buettner, 2001). Folgende Abbildung soll die Korrelation zwischen dem Biman-Test und dem MTT-Assay verdeutlichen.

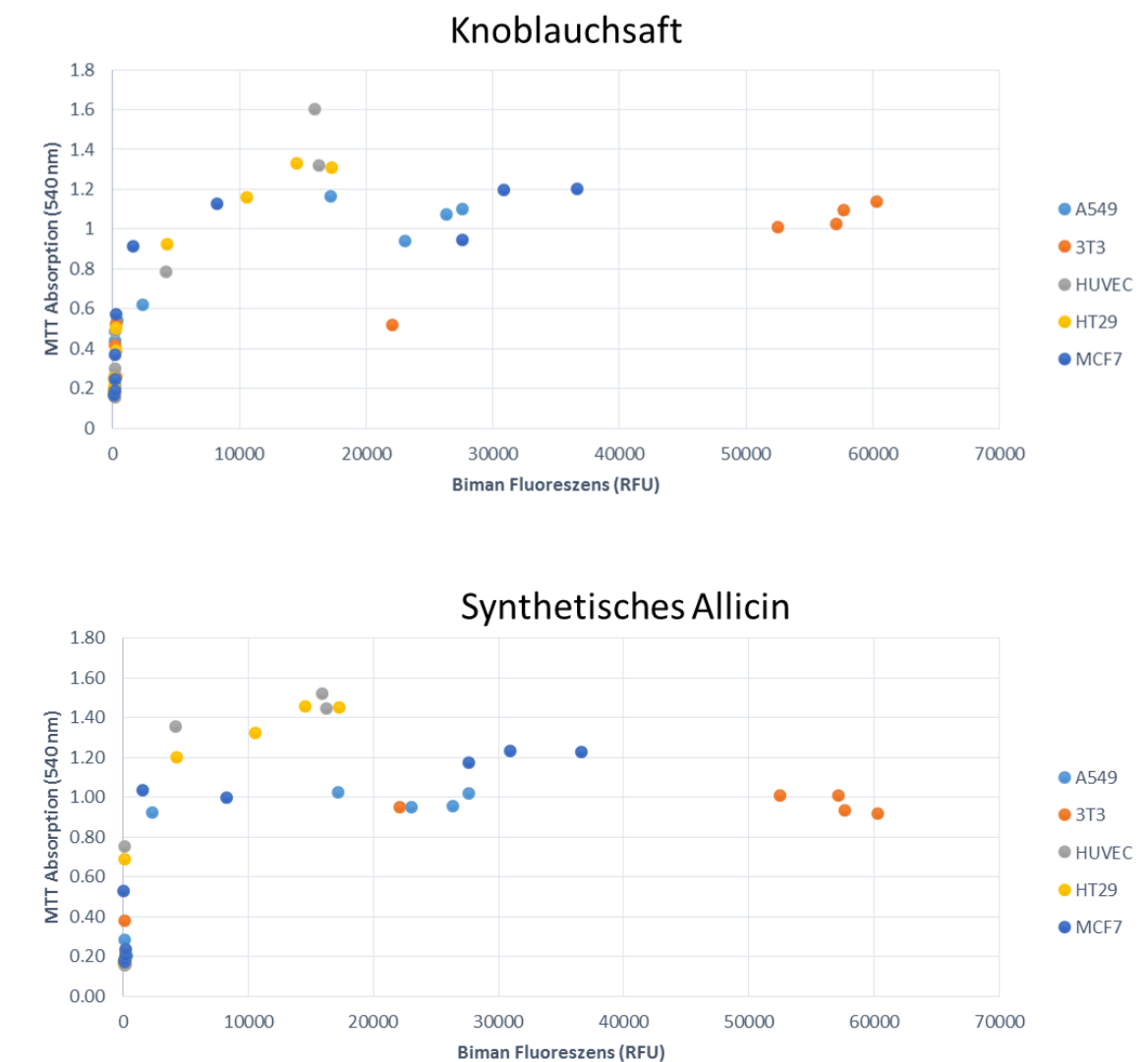


Abbildung 65: Korrelation zwischen Biman-Fluoreszenz und MTT-Absorption als Maß für die Überlebensrate von Zellen

Allicin führt zu einer Oxidation von Glutathion, was mit einer Abnahme der Biman-Fluoreszenz einhergeht. In dieser Grafik ist die MTT-Absorption als Maß für die metabolische Aktivität und damit die Vitalität der Zellen als Funktion der Biman-Fluoreszenz gezeigt. Sowohl bei Allicin als auch Knoblauchsaft korreliert die Abnahme der MTT-Absorption mit einer geringeren Biman-Fluoreszenz, wobei zwischen den einzelnen Zelllinien deutliche Unterschiede bestehen.

Diese Gegenüberstellung legt nahe, dass die Vitalität von Zellen, die mit Allicin behandelt sind, stark korreliert mit dem Redoxzustand der Zelle. Dies wiederum deckt sich mit dem Modell, das Schafer und Buettner aufstellen und das diese Redoxabhängigkeit auf Grundlage des elektrochemischen Potentials der Zelle quantitativ beschreibt (Schafer & Buettner, 2001).

4.5.3 Induktion apoptotischen Zelltods durch Allicin in verschiedenen Zell-Linien.

Um weitergehend zu untersuchen, ob die oben beschriebene Toxizität des Allicins gegenüber den unterschiedlichen humanen Zell-Linien auf der Induktion von Apoptose beruht, wurde der Farbstoff

YOPRO-1 verwendet. In apoptotischen Zellen mit permeabilisierter Membran ist dieser Farbstoff in der Lage einzudringen und führt dort zu einer Fluoreszenz (Idziorek et al., 1995). Dabei kann dieser Farbstoff nur als erster Hinweis gesehen werden, nicht jedoch als abschließende Bewertung der apoptose-induzierenden Eigenschaften genutzt werden.

Für Allicin ist in verschiedenen Zelllinien beschrieben, dass Allicin Apoptose zu induzieren in der Lage ist (Bat-Chen et al., 2009; Cha et al., 2012; Chu et al., 2013; Oommen et al., 2004; Zhang et al., 2010). Für die hier getesteten Zelllinien ergibt sich das interessante Bild, dass nur 3T3 und MCF7 einen deutlichen Anstieg an YOPRO-1 positiven Zellen zeigen, was nahelegt, dass nur in diesen beiden Zell-Linien Apoptose induziert wird, wenngleich in den übrigen getesteten Linien im MTT-Assay eine deutliche Abnahme der metabolischen Aktivität als Marker für die Vitalität zu beobachten ist. Diese Beobachtung trifft sowohl für Knoblauchsaff wie chemisch synthetisiertes Allicin zu. Damit ist ausgeschlossen, dass Allicin die Zellen nicht beeinflusst, zumal auch die Zellproliferation in diesen Zell-Linien beeinflusst wird.

Diese Beobachtungen legen verschiedene Interpretationsansätze nahe: Zum einen könnten die Resultate bedeuten, dass Allicin in den übrigen Zell-Linien (A549, HUVEC und HT29) keinen apoptotischen, sondern nekrotischen Zelltod induziert. Bislang gibt es für Allicin m.K.n keinen Hinweis für nicht-apoptotischen Zelltod mit Ausnahme von autophagen Prozessen. Um diese Differenzierung zu machen, wären eine Doppelfärbung mit Propidium-Iodid und eine durchflusszytometrische Analyse sinnvoll gewesen.

Eine detaillierte Untersuchung zur Fragestellung, ob Allicin auch in A549, HUVEC und HT29 Apoptose induziert, wäre anhand von molekularen und biochemischen Markern notwendig, beispielsweise Aktivierung von Caspase-Kaskaden oder die Fragmentierung von späten apoptotischen Markern wie Poly(ADP-ribose)polymerase-1. Diese Resultate würden Aufschluss darüber geben, ob Allicin als chemisch reine Substanz bzw. in Form von Knoblauchsaff in der Lage ist, Apoptose zu induzieren.

4.6 Relevanz der Untersuchung der Toxizität von Allicin auf Pflanzen

Allicin ist ein Phytoanticipin aus Knoblauch (Curtis et al., 2004), das die Knoblauchpflanze gegen Pathogene und Fressfeinde schützt (*ibid.*). Diese Eigenschaften kann man sich zu Nutze machen für die Anwendung von Allicin in landwirtschaftlichen Anwendungen (Slusarenko et al., 2008); so zeigt Knoblauchsaff eine gute Wirkung gegen *Phytophthora infestans* an Tomaten oder *Pseudoperonospora cubensis* an Gurke (Portz et al., 2008). An Tomaten konnte eine phytotoxische Wirkung von Knoblauchsaff beobachtet werden (Portz, 2008).

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Knoblauchsaff, dessen wichtigste aktive Komponente Allicin ist, Wirksamkeit gegen samenbürtige Krankheiten zeigt, z. B. an Möhre oder Weizen (Perelló et al., 2013; Slusarenko et al., 2008). Für Beizbehandlungen von Samen ist es wichtig, dass zwar das Inokulum des Pathogens zuverlässig abgetötet wird, der Same selbst aber nicht geschädigt wird, so dass die Keimrate oder die Entwicklung des Keimlings negativ beeinflusst wird.

Da beschrieben ist, dass Extrakte aus Knoblauch allelopathische Effekte zeigen, d. h. die Keimung und Entwicklung von Pflanzenkeimlingen hemmen (HAN et al., 2013a), sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob Allicin Wirkungen auf die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* hat. Die Arbeit mit dieser Modellpflanze erlaubt es – ähnlich wie im Hefesystem – anhand von Mutanten auf

genetischem Wege Faktoren zu identifizieren, die an Resistenz oder Suszeptibilität gegen die zu erwartende Allcintoxizität beteiligt sind.

4.7 Allicin inhibiert die Keimung und Keimlingsentwicklung von *Arabidopsis thaliana*

In einem ersten Assay sollte getestet werden, ob Allicin die Keimung von *Arabidopsis thaliana* inhibiert. Es wurde eine Konzentration von 2 mg mL^{-1} als Testkonzentration gewählt. Eine Behandlung von Samen mit dieser Konzentration würde in den bereits getesteten Pathosystemen ausreichen, samenbürtige Krankheiten zu bekämpfen (Perelló et al., 2013; Portz, 2008; Slusarenko et al., 2008).

Dabei wird die Keimungsrate des Col-0 Wildtyps, die dessen in allcinfreien Bedingungen kultiviert werden, verglichen mit Samen, die in Anwesenheit von Allicin keimen. Es zeigt sich für den Wildtyp eine Reduktion der Keimungsrate von $\sim 100 \%$ auf $\sim 70 \%$ bei Allicin. Dies zeigt, dass Allicin die Keimung von Pflanzen inhibieren kann. Erste Hinweise auf einen keimungsinhibierenden Effekt von Allicin wurden schon 1949 publiziert (Evenari, 1949). Mögliche Mechanismen, auf denen Allicin die Keimung inhibiert, sind – in Analogie zum Hefesystem – eine Inaktivierung von Enzymen durch Thioallylierung bzw. Oxidation (Wills, 1956) bzw. eine Veränderung des Redoxstatus. Das elektrochemische Potential in Pflanzensamen determiniert, wie auch in tierischen Zellen und Hefe, den physiologischen Zustand (Kranner et al., 2006) und entscheidet somit über die Keimfähigkeit der Samen (*ibid.*).

Diese Hypothese kann dadurch getestet werden, dass Mutanten, die im Glutathion-definierten Redox-Status beeinflusst sind, dem gleichen Test unterzogen werden. Dazu bietet sich die *pad2* Mutante (Glazebrook und Ausubel, 1994) an, die etwa 30% der Glutathionkonzentration im Vergleich zum Wildtyp aufweist (Parisy et al., 2006). Weil die absolute Glutathionkonzentration herabgesetzt ist, führt eine Behandlung mit Allicin zu einer stärkeren Verschiebung des elektrochemischen Potentials – wie bereits für Hefe diskutiert. Daher ist zu erwarten, dass in der *pad2* Mutante die Keimungsrate bei Allicinbehandlung niedriger ist im Vergleich zum Col-0 Wildtyp.

Während sich die Keimrate der *pad2* Mutante in allcinfreien Bedingungen mit annähernd 100 % nicht von Col-0 unterscheidet, ist in Anwesenheit von Allicin die Keimung von *pad2* annähernd vollständig inhibiert. Wie schon für Hefe gezeigt, ist auch in *Arabidopsis* Glutathion ein notwendiger Faktor für die Resistenz gegen Allicin. Es ist zu vermuten, dass auch hier die Verschiebung des elektrochemischen Potentials an dieser Beobachtung beteiligt ist.

Im Vergleich wird die Vitamin C-defiziente *vtc1* Mutante getestet, für die beschrieben ist, dass das GSH/GSSG Verhältnis zu Gunsten des GSHs verschoben ist, möglicherweise um den Vitamin C Mangel zu kompensieren (Colville und Smirnov, 2008). Die Keimrate der *vtc1* Mutante wird nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle (in allcinfreier Umgebung) reduziert. Dies legt nahe, dass Vitamin C nicht wichtig ist für die Beeinflussung der Keimung. Inwieweit die geringfügige Verschiebung des glutathiondefinierten elektrochemischen Potentials in der *vtc1* Mutante im Vergleich zum Wildtyp für diesen extremen Phänotyp beiträgt, wäre in weiteren Versuchen zu untersuchen.

Wie bereits in den Versuchen mit Hefe wird hier angenommen, dass die physiologische Wirkung von Allicin in weiten Teilen auf der Aktivität als Oxidanzmittel beruht. Deshalb wird die *sid2* Mutante in diesen Assay mit einbezogen, die in der Biosynthese von Salicylsäure beeinflusst ist (Nawrath und Métraux, 1999). Salicylsäure ist an der Resistenz von Arabidopsis gegen eine Vielzahl von biotischen und abiotischen Stressoren beteiligt (Halim et al., 2006; Horváth et al., 2007). Die Rolle von Salicylsäure bei oxidativem Stress jedoch ist kontrovers: Während die Behandlung von Arabidopsis mit Salicylsäure zu H₂O₂-abhängigem oxidativen Stress führt (Rao et al., 1997), zeigen salicylsäuredefiziente *sid2* Mutanten eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber Ozon (Yoshida et al., 2009); *sid2* ist jedoch im Vergleich zum Wildtyp weniger anfällig gegenüber Cadmium (Zawoznik et al., 2007). Die *sid2* Mutante ist bezüglich der Keimungsinhibition durch Allicin nahezu nicht inhibiert. Das spricht für einen Toxizitätsmechanismus, der dem Cadmium ähnlicher ist. Um herauszufinden, was die Ursache für die erhöhte Resistenz von *sid2* gegen Allicin in diesem Assay ist, bedarf es weiterer Versuche. Interessant ist jedoch, dass in früheren Versuchen bei Behandlung mit Allicin in Form von Knoblauchsaff keine Erhöhung des Salicylsäurelevels in Arabidopsis beobachtet werden konnte (Curtis et al., 2004).

Die *coi1* Mutante als Jasmonat-Perzeptionsmutante ist erhöht empfindlich gegenüber Allicin-Behandlung. Damit zeigt sie einen entgegengesetzten Phänotyp zur *sid2* Mutante. Dies ist in Übereinstimmung mit dem klassischen Modell, dass Jasmonat und Salicylsäure entgegengesetzt wirkende Substanzen darstellen (Beckers und Spoel, 2006). Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass jasmonat-abhängige Gene, die von oxidativem Stress induziert werden, abhängig sind von Glutathion (Han et al., 2013b). Wie genau der Jasmonat-Weg auf die Resistenz von Arabidopsis gegenüber Allicin Einfluss nimmt, ist an dieser Stelle nicht geklärt und bedarf weiterer Untersuchungen.

4.8 Allicin beeinflusst Keimlingsentwicklung

Werden Arabidopsis-Keimlinge in allicinfreien Bedingungen angezogen und dann auf Medium übertragen, das Allicin enthält, zeigt Allicin weitere Wirkungen. Besonders auffällig sind eine Wirkung auf Wurzeln, deren Entwicklung in Anwesenheit von Allicin inhibiert wird, und ein Ausbleichen in Anwesenheit von Allicin.

Die Entwicklung von Wurzeln ist in hohem Maße abhängig vom Glutathion. Die *rm1* Mutante als Mutante des *GSH1* Gens ist in der postembryonalen Entwicklung des Wurzelapikalmeristems massiv beeinflusst. Dementsprechend ist die *rm1* Mutante nicht in der Lage, eine Wurzel auszubilden (Vernoux, 2000). Der Phänotyp der *rm1* Mutante ist in hohem Maße dem ähnlich, den Arabidopsis Keimlinge, die nach der Keimung auf allicinhaltiges Medium aufgebracht wurden, aufweisen. Dies ist, wie bereits bei der Inhibition der Keimung beobachtet, wahrscheinlich auf eine Beeinflussung des Glutathion-Status zurückzuführen.

Neben der Verkürzung der Wurzel unterbleibt vollständig eine Ausbildung von Wurzelhaaren in Anwesenheit von Allicin (siehe Abbildung 57). Die Wurzelhaarentwicklung unterliegt explizit einer

thiol-abhängigen Redoxkontrolle, wobei Glutathion zwar von besonderer Bedeutung ist, aber auch beispielsweise durch Thiolreagenzien wie Dithiothreitol ersetzt werden kann (Sanchez-Fernandez et al., 1997). Auch diese Beobachtung gibt einen weiteren Hinweis darauf, dass eine Beeinflussung des Glutathionstatus für die beobachteten Effekte von Allicin auf die Wurzelentwicklung beteiligt sein kann.

Unterstützt wird diese Vermutung durch die Beobachtung, dass die Wurzellänge in der *pad2* Mutante in Anwesenheit von Allicin signifikant kürzer ist als im Col-0 Wildtyp in der entsprechenden Behandlung. Im Gegensatz zum Keimungsassay, bei dem die *vtc1* Mutante resistenter gegen Allicinbehandlung war als der Wildtyp, zeigt *vtc1* in diesem Assay eine stärkere Inhibition der Wurzelentwicklung als der Wildtyp. Allerdings weist auch die unbehandelte Kontrolle kürzere Wurzeln als der Wildtyp auf, so dass davon auszugehen ist, dass *vtc1* in der Wurzelentwicklung beeinträchtigt ist. Möglicherweise ist dieser Effekt mit der Beobachtung korreliert, dass die *vtc1* Mutante hypersensitiver gegenüber Ammonium ist, das in Hoagland-Medium enthalten ist (Barth et al., 2010).

Interessanterweise ist auch in diesem Assay die *sid2* Mutante weniger empfindlich gegen die Allicinexposition als der Wildtyp; die Wurzellänge ist signifikant höher als bei entsprechender Behandlung des Wildtyps mit Allicin, während sich die unbehandelten Kontrollen nicht unterscheiden. Für Salicylsäure ist eine stimulierende Wirkung sowohl auf die Wurzelbildung als auch auf die Keimung unter Bedingungen abiotischen Stresses beschrieben (Rivas-San Vicente und Plasencia, 2011). Diese Befunde aber würden nahelegen, dass ein Fehlen von Salicylsäure zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Allicin führen würde; die Daten jedoch zeigen, dass das Fehlen von Salicylsäure zu einer **erhöhten Resistenz** führt. Dieser Befund bedarf zweifelsohne weiterer Untersuchungen, um jenseits der hier angeführten deskriptiven Ebene zu verstehen, was die Rolle von Salicylsäure in der Resistenz von Pflanzen gegenüber Allicin ist.

Es ist beschrieben, dass Glutathion für die Wurzelentwicklung entscheidend ist (Vernoux, 2000); die Rolle des Glutathions ist eng verknüpft mit der Lokalisation von Auxin, das konzentrationsabhängig die Wurzelentwicklung reguliert (Koprivova et al., 2010; Reinhardt et al., 2000). Unter der Annahme, dass Allicin auf das Redoxgleichgewicht des Glutathions einwirkt, ist zu erwarten, dass es zu einer Veränderung der Auxinlokalisierung kommt.

Mit zwei unterschiedlichen Konstrukten wurde die Lokalisation von Auxin in Arabidopsis-Wurzeln untersucht. Beide beruhen auf der Interaktion mit dem Aux/IAA-System, das nach Perzeption von Auxin durch den TIR1-Rezeptor für den Proteinabbau markiert wird. Es zeigt sich, dass unter Verwendung des DR5:GFP Konstruktes nach 24 Stunden Inkubation die Fluoreszenz im Vergleich zur Kontrolle diffus erscheint, somit also die typische Verteilung des Auxins nicht mehr vorliegt. Diese aber ist notwendig für eine geordnete Entwicklung der Wurzel. Ein Konstrukt mit geringerer Halbwertszeit des Proteins ist das DII-Venus Konstrukt, das somit eine höhere Zeitauflösung der Beeinflussung durch Allicin erlaubt (Brunoud et al., 2012a). DII Venus zeigt bereits eine Stunde nach Allicinbehandlung eine Verringerung der Fluoreszenz, was dafür spricht, dass die Auxinkonzentration in der Wurzel zunimmt. In Zusammenhang mit DR5:GFP (die allerdings aufgrund der geringeren

zeitlichen Auflösung erst nach 24 Stunden ausgewertet wurden; nach einer Stunde war in diesem Konstrukt keine deutliche Änderung zu beobachten) deutet dies darauf hin, dass Auxin in der Wurzelspitze staut. Dies ist möglicherweise dadurch bedingt, dass der gerichtete Transport des Auxins durch Allicin gestört wird. Inhibition des Auxintransportes führt also zu verkürzten Wurzeln (Katekar und Geissler, 1980; Reed et al., 1998) und zu einem Phänotyp, der dem der Allicinbehandlung ähnlich ist. Weil die Inhibition des Auxintransportes ein bedeutender Wirkmechanismus von Herbiziden ist, kann diese Beobachtung von Interesse sein (Subramanian et al., 1997).

Ein denkbarer Mechanismus ist die Beeinflussung des Actin-Cytoskeletts; Hinweise dafür stammen aus der Inhibition der protoplasmatischen Strömung in *Tradescantia fluminensis* (B.Sc.-Arbeit Miriam Schreiber, RWTH Aachen; unveröffentlicht). Auch in Hefe konnte gezeigt werden, dass Allicin das Cytoskelett angreift, wenngleich für Humanzellen gezeigt worden ist, dass Allicin zwar das Tubulin-Cytoskelett beeinflusst, nicht aber das Actin-Cytoskelett (Prager-Khoutorsky et al., 2007). Was die Ursache für die Unterschiede in der Beobachtung ist, ist unklar. Die Studie von Prager-Khoutorsky setzt sehr geringe Konzentrationen von Allicin ein, um Effekte auf das Cytoskelett zu beobachten (0,2 - 25 μM). Möglicherweise können bei höheren Konzentrationen, wie sie in diesen Studien eingesetzt worden sind, ebenfalls Effekte auf das Actin-Cytoskelett beobachtet werden. Ein denkbarer Mechanismus, wie Allicin die Auxin-Verteilung in der Zelle beeinflusst, ist, dass durch die Störung des Actin-Cytoskeletts die hochgradig in ihrer Lokalisation regulierten PIN-Effluxtransporter nicht in ihrer basipetalen Ausrichtung erhalten bleiben (Dhonukshe et al., 2008), sondern dass sie durch die Membran diffundieren und so einen nicht-gerichteten Ausstrom von Auxin erzeugen.

Um herauszufinden, ob dieser Mechanismus tatsächlich derjenige ist, der für die Wirkung des Allicins auf die Wurzelentwicklung zutrifft, ist es notwendig, die Lokalisation von PIN-Proteinen in Arabidopsis-Wurzeln, die Allicin ausgesetzt waren bzw. nicht ausgesetzt waren, zu testen. Dies ist möglich mithilfe von PIN-GFP Konstrukten. Dabei ist zu bedenken, dass die PIN-Transporter, abhängig von Entwicklungsstadium und Organ, von unterschiedlicher Wichtigkeit sind. Deshalb ist es sinnvoll, verschiedene PIN-GFP Konstrukte in dieser Weise zu testen. Zu korrelieren sind diese Daten mit Aufnahmen, die den Zustand des Actin-Cytoskeletts zeigen, das entweder durch eine Actin-GFP (bzw. eine Fusion eines Actin-Bindeproteins mit einem Fluorophor) oder einem farbstoffmarkierten Phalloidin visualisiert wird. Ist bei gleicher Konzentration eine Beeinflussung des Actincytoskeletts, der PIN-Lokalisation und der Auxin-Verteilung zu beobachten, lässt sich korrelativ daraus schließen, dass zwischen den drei Beobachtungen ein kausaler Zusammenhang besteht. Entsprechende Versuche sind bereits begonnen worden.

4.9 Allicin bedingt Ausbleichen von photosynthetisch aktiven Organen

Ausbleichen von Blättern gilt als Symptom für oxidativen Stress, entweder direkt durch oxidative Schädigung der Pigmente oder in Folge eines, durch oxidative Bedingungen induzierten programmierten Zelltodprogramms (Foyer und Noctor, 2005).

Es wurde beobachtet, dass Allicin ein Ausbleichen von photosynthetisch aktiven Organen bewirkt, sowohl bei Keimlingen, die auf allicinhaltigen Medien kultiviert wurden, als auch im s.g. „floating-leaf assay“. Diese Beobachtung wurde als Symptom für oxidative Schädigungen durch Allicin interpretiert; dass Allicin auch in Pflanzen oxidativ wirkt, konnte in den vorangegangenen Versuchen gezeigt werden, indem die Wurzelentwicklung in der *pad2* Mutante stärker beeinflusst wird als im Wildtyp, was nahe legt, dass Glutathion für die Resistenz gegenüber Allicin zentral ist.

Die Eigenschaft des Ausbleichens von Pflanzen ist ein einfach zu identifizierendes makroskopisches Merkmal, das geeignet ist, auch in großem Maßstab verwendet zu werden, um resistente von nicht resistenten Pflanzen gegenüber Allicin zu identifizieren.

Mit diesen einfachen Tests wurde die Wirkung von Allicin auf Pflanzen getestet. Diese Fragestellung ist sowohl hinsichtlich einer möglichen landwirtschaftlichen Anwendung im Zuge von Samenbehandlung von Belang als auch von ökologischem Interesse, weil *Allium*-Arten allelopathische Effekte auf andere Pflanzen zeigen. Mit einfachen Mutantenstudien und zellbiologischen Verfahren wurde gezeigt, dass die Resistenz von Pflanzen gegenüber Allicin auf Glutathion und Jasmonat beruht, während eine Salicylsäuremutante erhöht empfindlich ist. Die strikt koordinierte Auxinlokalisierung, die in besonderer Weise mit Glutathion korreliert, wird durch Allicin beeinflusst. Diese Daten legen nahe, dass die Wirkung des Allicins auf Glutathion zentral ist für die Wirkung von Allicin auf Pflanzenwurzeln und eine Vielzahl unterschiedlicher Prozesse beeinflusst. Diese, nur ansatzweise untersuchten Prozesse bieten ein spannendes Feld für weitere und detailliertere Untersuchungen zur Redoxwirkung von Allicin und damit zum besseren Verständnis von Reaktiven Schwefelspezies und oxidativem Stress im Allgemeinen in Pflanzen.

4.10 Gesamtüberblick: Wirkung von Allicin auf verschiedene biologische Systeme

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von Allicin auf drei unterschiedliche experimentelle Systeme getestet: Ein besonderer Schwerpunkt lag auf der Wirkung von Allicin auf Hefezellen. Ausgehend von der Beobachtung, dass Allicin gegen eine Vielzahl von phytopathogenen Pilzen wirksam ist (Curtis et al., 2004) und sich daher möglicherweise für einen Einsatz in der Landwirtschaft eignet (Arnault et al., 2013; Portz et al., 2008; Slusarenko et al., 2008), sollte die molekulare Funktion von Allicin auf pilzliche Organismen untersucht werden. Dazu eignet sich das Hefesystem aufgrund seiner einfachen und schnellen Kultivierbarkeit sowie seiner hervorragenden genetischen Zugänglichkeit in besonderer Weise. Weil diese Befunde auch von medizinischem Interesse sind, wurde eine vergleichende physiologische Studie zur Wirkung von Allicin in Form von chemisch synthetisierter Reinsubstanz und Knoblauchsaff auf unterschiedene Säugetierzelllinien durchgeführt.

Für eine landwirtschaftliche Anwendung sind neben der Wirkung auf den Zielorganismus auch Nebeneffekte wie Phytotoxizität bedeutsam. Diese wurden an Tomate bei der Behandlung mit Knoblauchsaff beobachtet (Portz, 2008). Um die Ursachen dieser Phytotoxizität besser zu verstehen, wurde das Modellsystem *Arabidopsis thaliana* gewählt.

In allen Modellsystemen stellte sich Glutathion als bedeutender Faktor bei der Wirkung des Allicins dar: In Hefezellen konnte quantitativ nachgewiesen werden, dass Allicin eine Oxidation des Glutathions bewirkt, die mit der Induktion von Apoptose korreliert. Außerdem erwiesen sich

Mutanten des Glutathionstoffwechsels als deutlich empfindlicher gegenüber Allicinbehandlung, wohingegen Thioredoxin-Mutanten einen geringeren Effekt zeigten.

Auch in den unterschiedlichen Säugetierzellen wurde nach Allicinbehandlung mittels Monobromobiman-methode eine Oxidation von Glutathion festgestellt.

In Arabidopsis schließlich konnte gezeigt werden, dass eine Allicinbehandlung die Wurzelentwicklung der Pflanzen inhibiert, ein Prozess, der klare Abhängigkeit von Glutathion zeigt. Darüber hinaus war eine Glutathionbiosynthesemutante (*pad2*) hinsichtlich Keimung in Anwesenheit von Allicin bzw. Wurzelentwicklung sensibler als der Wildtyp Col-0.

All diese Befunde heben die besondere Bedeutung von Glutathion für die Toxizität und Resistenz von Zellen gegenüber Allicin hervor. Bereits bei seiner Identifizierung 1944 wurde eine starke Thioreaktivität des Allicins postuliert (Cavallito und Bailey, 1944). Glutathion ist der bedeutendste Thiol-Redoxpuffer der Zelle. Die Ergebnisse zeigen, dass Glutathion in der Zelle notwendig ist für die Resistenz verschiedener biologischer Systeme gegen Allicin.

Offenbar schützt Glutathion Proteine vor einer direkten Reaktion der Protein-Cysteinreste mit Allicin. Eine direkte Reaktion von Allicin mit Protein-Cysteinresten (Thioallylierung) könnte die Funktion der Proteine beeinflussen. *In vitro* Experimente belegen, dass Allicin eine Vielzahl von Proteinen mit katalytisch aktivem Cystein inhibiert (Wills, 1956).

Dass Proteine durch den Einfluss von Allicin beeinflusst werden, zeigt die Aktivierung des YAP1-Transkriptionsfaktors. Weil der Kernexport von YAP1 durch Oxidation inhibiert wird und die Kernlokalisation die Voraussetzung für die transkriptionsregulierende Eigenschaft von YAP1 ist, zeigt die Induktion der Genexpression des *OS11*-Gens, das exklusiv durch YAP1 reguliert wird, dass YAP1 in Anwesenheit von Allicin oxidiert wird. Ob die Oxidation zur Ausbildung von intramolekularen Disulfiden führt oder zur Thioallylierung der Cysteinreste, ist bislang nicht geklärt. Die Ergebnisse sowohl in Hefe als auch in tierischen Zellen legen nahe, dass reaktive Spezies (außer Allicin selbst, das zur Klasse der „Reaktiven Schwefelspezies“ gehört (Gruhlke und Slusarenko, 2012)) für die Toxizität des Allicins nicht bedeutsam sind.

Ein möglicher Signalweg, der zunächst in humanen Epithelcarcinomzellen postuliert wurde (Park et al., 2005), bei dem Protein-Kinase A die Apoptose reguliert, konnte in Hefe bestätigt werden. Ein mögliches Target, das diesen Signalweg reguliert, ist das Actin-Cytoskelett.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es im Rahmen dieser Arbeit gelungen ist, grundlegende Mechanismen der Allicintoxizität in verschiedenen biologischen Systemen zu identifizieren, wobei in allen getesteten Substanzen Allicin als „Redox-Toxin“ aktiv war.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

Ort, Datum

Unterschrift

5 Literatur

- Abe, S. (1964). The Effect of p-Chloromereuribenzoate on Rotational Protoplasmic Streaming in Plant Cells. *Protoplasma* 58, 483-492.
- Agniswamy, J., Fang, B., und Weber, I.T. (2007). Plasticity of S2–S4 specificity pockets of executioner caspase-7 revealed by structural und kinetic analysis. *FEBS J* 274, 4752-4765.
- Alamgir, M., Erukova, V., Jessulat, M., Azizi, A., und Golshani, A. (2010b). Chemical-genetic profile analysis of five inhibitory compounds in yeast. *BMC Chem Biol* 10:6.
- Alexandre, J., Batteux, F., Nicco, C., Chéreau, C., Laurent, A., Guillemin, L., Weill, B., und Goldwasser, F. (2006a). Accumulation of hydrogen peroxide is an early und crucial step for paclitaxel-induced cancer cell death both in vitro und in vivo. *Int J Cancer* 119, 41-48.
- Alexandre, J., Nicco, C., Chéreau, C., Laurent, A., Weill, B., Goldwasser, F., und Batteux, F. (2006b). Improvement of the Therapeutic Index of Anticancer Drugs by the Superoxide Dismutase Mimic Mangafodipir. *J Nat Cancer Inst* 98, 236-244.
- Allen, N.S., und Allen, R.D. (1978). Cytoplasmic Streaming in Green Plants. *Ann Rev Biophys Bioeng* 7, 497-526.
- Allison, W.S. (1976). Formation and reactions of sulfenic acids in proteins. *Accounts Chem Res* 9, 293-299.
- Almeida, B., Ohlmeier, S., Almeida, A.J., Madeo, F., Leao, C., Rodrigues, F., und Ludovico, P. (2009). Yeast protein expression profile during acetic acid-induced apoptosis indicates causal involvement of the TOR pathway. *Proteomics* 9, 720-732.
- Ameyar, M., Wisniewska, M., und Weitzman, J.B. (2003). A role for AP-1 in apoptosis: the case for and against. *Biochimie* 85, 747-752.
- An, M., Shen, H., Cao, Y., Zhang, J., Cai, Y., Wang, R., und Jiang, Y. (2009). Allicin enhances the oxidative damage effect of amphotericin B against *Candida albicans*. *Int J Antimicro Agents* 33, 258-263.
- Anand, P., und Stamler, J. (2012). Enzymatic mechanisms regulating protein S-nitrosylation: implications in health und disease. *J Mol Med* 90, 233-244.
- Ankri, S., und Mirelman, D. (1999). Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes Infect* 1, 125-129.
- Anwar, A. (2009). Natural Polysulfides - Reactive Sulfur Species from *Allium* with Applications in Medicine und Agriculture Dissertation. Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät Universität des Saarlandes, Saarbrücken. 144.
- Apitz-Castro, R., Cabrera, S., Cruz, M.R., Ledezma, E., und Jain, M.K. (1983). Effects of garlic extract and of three pure components isolated from it on human platelet aggregation, arachidonate metabolism, release reaction und platelet ultrastructure. *Thrombosis Res* 32, 155-169.
- Arditti, F.D., Rabinkov, A., Miron, T., Reisner, Y., Berrebi, A., Wilchek, M., und Mirelman, D. (2005). Apoptotic killing of B-chronic lymphocytic leukemia tumor cells by allicin generated in situ using a rituximab-alliinase conjugate. *Mol Cancer Ther* 4, 325-331.
- Armstrong, J.S., Steinauer, K.K., Hornung, B., Irish, J.M., Lecane, P., Birrell, G.W., Peehl, D.M., und Knox, S.J. (2002). Role of glutathione depletion und reactive oxygen species generation in apoptotic signaling in a human B lymphoma cell line. *Cell Death Differ* 9, 252-263.
- Arnault, I., Fleurance, C., Vey, F., Fretay, G.D., und Auger, J. (2013). Use of Alliaceae residues to control soil-borne pathogens. *Ind Crops Prod* 49, 265-272.
- Arokium, H., Camougrand, N., Vallette, F.M., und Manon, S. (2004). Studies of the interaction of substituted mutants of BAX with yeast mitochondria reveal that the C-terminal hydrophobic alpha-helix

is a second ART sequence und plays a role in the interaction with anti-apoptotic BCL-xL. *J Biol Chem* 279, 52566--52573.

Aruoma, O., Halliwell, B., Hoey, B.M., und Butler, J. (1988). The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors. *Biochem J* 256, 251-255.

Atkins, P.W. (2001). *Kurzlehrbuch Physikalische Chemie*, 3. Auflage, Wiley VCH, Weinheim.

Avruch, J., Khokhlatchev, A., Kyriakis, J.M., Luo, Z., Tzivion, G., Vavvas, D., und Zhang, X.F. (2001). Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Prog Horm Res* 56, 127-155.

Aw, T.Y. (2003). Cellular Redox: A Modulator of Intestinal Epithelial Cell Proliferation. *News Physiol Sci* 18, 201-204.

Bach, R.D., Dmitrenko, O., und Thorpe, C. (2008). Mechanism of thiolate-disulfide interchange reactions in biochemistry. *J Org Chem* 73, 12-21.

Balmer, Y., Vensel, W.H., Tanaka, C.K., Hurkman, W.J., Gelhaye, E., Rouhier, N., Jacquot, J.-P., Manieri, W., Schürmann, P., Droux, M., *et al.* (2004). Thioredoxin links redox to the regulation of fundamental processes of plant mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2642-2647.

Barbacid, M. (1987). RAS GENES. *Ann Rev Biochem* 56, 779-827.

Basnakian, A.G., Apostolov, E.O., Yin, X., Abiri, S.O., Stewart, A.G., Singh, A.B., und Shah, S.V. (2006). Endonuclease G promotes cell death of non-invasive human breast cancer cells. *Exp Cell Res* 312, 4139-4149.

Bat-Chen, W., Tal, G., Irena, P., Zvi, L., und Betty, S. (2009). Allicin purified from fresh garlic cloves induces apoptosis in colon cancer cells via Nrf2. *Nutr Cancer* 62, 947-957.

Benavides, G.A., Squadrito, G.L., Mills, R.W., Patel, H.D., Isbell, T.S., Patel, R.P., Darley-Usmar, V.M., Doeller, J.E., und Kraus, D.W. (2007). Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 17977-17982.

Bhattacharya, S., Chen, L., Broach, J.R., und Powers, S. (1995). Ras membrane targeting is essential for glucose signaling but not for viability in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 2984-2988.

Bishop, A.L., Rab, F.A., Sumner, E.R., und Avery, S.V. (2007). Phenotypic heterogeneity can enhance rare-cell survival in 'stress-sensitive' yeast populations. *Mol Microbiol* 63, 507-520.

Biteau, B.T., Labarre, J., und Toledano, M.B. (2003). ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature* 425, 980-984.

Blilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Friml, J., Heidstra, R., Aida, M., Palme, K., und Scheres, B. (2005). The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature* 433, 39-44.

Block, E. (1992). The Organosulfur Chemistry of the Genus *Allium* - Implications for the Organic Chemistry of Sulfur. *Angew Chem Int Ed Engl* 31, 1135-1178.

Block, E. (2010). *Garlic und Other Alliums - The Lore und the Science*, 1. Auflage, Royal Society of Chemistry, Cambridge.

Block, E., Ahmad, S., Jain, M.K., Crecely, R.W., Apitz-Castro, R., und Cruz, M.R. (1984). The chemistry of alkyl thiosulfate esters. 8. (E,Z)-Ajoene: a potent antithrombotic agent from garlic. *J Americ Chem Soc* 106, 8295-8296.

Bonaventura, J., Rodriguez, E.N., Beyley, V., und Vega, I.E. (2010). Allylation of intraerythrocytic hemoglobin by raw garlic extracts. *J Med Food* 13, 943-949.

Bos, J.L. (1989). ras Oncogenes in Human Cancer: A Review. *Cancer Research* 49, 4682-4689.

Botet, J., Mateos, L., Revuelta, J.L., und Santos, M.A. (2007). A Chemogenomic Screening of Sulfanilamide-Hypersensitive *Saccharomyces cerevisiae* Mutants Uncovers ABZ2, the Gene Encoding a Fungal Aminodeoxychorismate Lyase. *Eukaryot Cell* 6, 2102-2111.

Boucher, D., Blais, V., und Denault, J.-B. (2012). Caspase-7 uses an exosite to promote poly(ADP ribose) polymerase 1 proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 5669-5674.

- Bouillet, P., und Strasser, A. (2002). BH3-only proteins — evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Sci* **115**, 1567-1574.
- Brachmann, C., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., und Boeke, J.D. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: A useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption und other applications. *Yeast* **14**, 115-132.
- Brannan, R.G. (2010). Reactive Sulfur Species Act as Prooxidants in Liposomal and Skeletal Muscle Model Systems. *J Agric Food Chem* **58**, 3767–3771.
- Breitenbach, M., Laun, P., und MarioGimona (2005). The actin cytoskeleton, RAS–cAMP signaling and mitochondrial ROS in yeast apoptosis. *Trends Cell Biol* **15**, 637-639.
- Broek, D., Samiy, N., Fasano, O., Fujiyama, A., Tamanoi, F., Northup, J., und Wigler, M. (1985). Differential activation of yeast adenylate cyclase by wild type und mutant RAS proteins. *Cell* **41**, 763-769.
- Brunoud, G., Wells, D.M., Oliva, M., Larrieu, A., Mirabet, V., Burrow, A.H., Beeckman, T., Kepinski, S., Traas, J., Bennett, M.J., *et al.* (2012). A novel sensor to map auxin response und distribution at high spatio-temporal resolution. *Nature* **482**, 103-106.
- Buchanan, B.B., und Balmer, Y. (2005). Redox regulation: a broadening horizon. *Annu Rev Plant Biol* **56**, 187-220.
- Buchczyk, D.P., Briviba, K., Hartl, F.U., und Sies, H. (2000). Responses to peroxynitrite in yeast: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a sensitive intracellular target for nitration und enhancement of chaperone expression und ubiquitination. *Biol Chem* **381**, 121-126.
- Busch, C., Jacob, C., Anwar, A., Burkholz, T., Ba, L.A., Cerella, C., Diederich, M., Brandt, W., Wessjohann, L., und Montenarh, M. (2010). Diallylpolsulfides induce growth arrest und apoptosis. *Int J Oncol* **36**, 743-749.
- Büttner, S., Eisenberg, T., Carmona-Gutierrez, D., Ruli, D., Knauer, H., Ruckenstuhl, C., Sigrist, C., Wissing, S., Kollroser, M., Fröhlich, K.-U., *et al.* (2007). Endonuclease G Regulates Budding Yeast Life and Death. *Mol Cell* **25**, 233-246.
- Büttner, S., Ruli, D., Vogtle, F.N., Galluzzi, L., Moitzi, B., Eisenberg, T., Kepp, O., Habernig, L., Carmona-Gutierrez, D., Rockenfeller, P., *et al.* (2011). A yeast BH3-only protein mediates the mitochondrial pathway of apoptosis. *EMBO J* **30**, 2779-2792.
- C Wimmer, V Doye, P Grandi, U Nehrbass, und Hurt, E.C. (1992). A new subclass of nucleoporins that functionally interact with nuclear pore protein NSP1. *EMBO J* **11**, 5051-5061.
- Campas-Baypoli, O.N., Sanchez-Machado, D.I., Bueno-Solano, C., Ramirez-Wong, B., und Lopez-Cervantes, J. (2010). HPLC method validation for measurement of sulforaphane level in broccoli by-products. *Biomed Chromatogr* **24**, 387-392.
- Candé, C., Cohen, I., Daugas, E., Ravagnan, L., Larochette, N., Zamzami, N., und Kroemer, G. (2002). Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie* **84**, 215-222.
- Carmona-Gutierrez, D., Eisenberg, T., Büttner, S., Meisinger, C., Kroemer, G., und Madeo, F. (2010). Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines. *Cell Death Differ* **17**, 763-773.
- Cavallito, C.J., und Bailey, J.H. (1944). Allicin, the Antibacterial Principle of *Allium sativum* L. I. Isolation, Physical Properties and Antibacterial Action. *J Am Chem Soc* **66**, 1950-1951.
- Cavallito, C.J., Buck, J.S., und Suter, C.M. (1944). Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. II. Determination of the chemical structure. *J Am Chem Soc* **66**, 1952-1954.
- Cha, J.H., Choi, Y.J., Cha, S.H., Choi, C.H., und Cho, W.H. (2012). Allicin inhibits cell growth und induces apoptosis in U87MG human glioblastoma cells through an ERK-dependent pathway. *Oncol Rep* **28**, 41-48.
- Chang, H.Y., und Yang, X. (2000). Proteases for Cell Suicide: Functions und Regulation of Caspases. *Microbio Mol Biol Rev* **64**, 821-846.

- Chao, D.T., und Korsmeyer, S.J. (1998). BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 16, 395-419.
- Chatterji, T., Keerthi, K., und Gates, K.S. (2005). Generation of reactive oxygen species by a persulfide (BnSSH). *Bioorg Med Chem Lett* 15, 3921-3924.
- Chen, S.-R., Dunigan, D.D., und Dickman, M.B. (2003). Bcl-2 family members inhibit oxidative stress-induced programmed cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radic Biol Med* 34, 1315-1325.
- Cheng, J.C., Seeley, K.A., und Sung, Z.R. (1995). RML1 und RML2, Arabidopsis Genes Required for Cell Proliferation at the Root Tip. *Plant Physiol* 107, 365-376.
- Chiu, W.C., Chen, C.J., Lee, T.S., Chen, Z.J., Ke, P.H., und Chiang, A.N. (2010). Oxidative stress enhances AP-1 and NF-kappaB-mediated regulation of beta(2)-glycoprotein I gene expression in hepatoma cells. *J Cell Biochem* 111, 988-998.
- Christman, J.W., Blackwell, T.S., und Juurlink, B.H. (2000). Redox regulation of nuclear factor kappa B: therapeutic potential for attenuating inflammatory responses. *Brain Pathol* 10, 153-162.
- Chu, Y.-L., Ho, C.-T., Chung, J.-G., Raghu, R., Lo, Y.-C., und Sheen, L.-Y. (2013). Allicin Induces Anti-human Liver Cancer Cells through the p53 Gene Modulating Apoptosis and Autophagy. *J Agr Food Chem* 61, 9839-9848.
- Ciriolo, M.R. (2005). Redox control of apoptosis. *Antioxid Redox Signal* 7, 432-435.
- Cobbett, C.S., May, M.J., Howden, R., und Rolls, B. (1998). The glutathione-deficient, cadmium-sensitive mutant, *cad2-1*, of *Arabidopsis thaliana* is deficient in γ -glutamylcysteine synthetase. *Plant J* 16, 73-78.
- Coleman, S.T., Epping, E.A., Steggerda, S.M., und Moye-Rowley, W.S. (1999). Yap1p activates gene transcription in an oxidant-specific fashion. *Mol Cell Biol* 19, 8302-8313.
- Colombo, S., Paiardi, C., Pardons, K., Winderickx, J., und Martegani, E. (2014). Evidence for adenylate cyclase as a scaffold protein for Ras2-Ira interaction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Signal* 26, 1147-1154.
- Colombo, S., Ronchetti, D., Thevelein, J.M., Winderickx, J., und Martegani, E. (2004). Activation state of the Ras2 protein und glucose-induced signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 279, 46715-46722.
- Cooper, K.E., Linton, A.H., und Sehgal, S.N. (1958). The Effect of Inoculum Size on Inhibition Zones in Agar Media Using *Staphylococci* and Streptomycin. *J Gen Microbiol* 18, 670-687.
- Costanzo, M., Baryshnikova, A., Bellay, J., Kim, Y., Spear, E.D., Sevier, C.S., Ding, H., Koh, J.L., Toufighi, K., Mostafavi, S., *et al.* (2010). The genetic landscape of a cell. *Science* 327, 425-431.
- Creelman, R.A., und Mullet, J.E. (1995). Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development und response to biotic und abiotic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4114-4119.
- Curtis, H., Noll, U., Störmann, J., und Slusarenko, A.J. (2004). Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi und Oomycetes. *Physiol Mol Plant Pathol* 65, 79-89.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, G., Giustarini, D., und Milzani, A. (2009). Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans. *Trends Biochem Sci* 34, 85-96.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Colombo, R., und Milzani, A. (2003). Actin S-glutathionylation: evidence against a thiol-disulphide exchange mechanism. *Free Radic Biol Med* 35, 1185-1193.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Colombo, R., und Milzani, A. (2007). S-glutathionylation in protein redox regulation. *Free Radic Biol Med* 43, 883-898.
- Dam, T.K., Bachhawat, K., Rani, P.G., und Surolia, A. (1998). Garlic (*Allium sativum*) Lectins Bind to High Mannose Oligosaccharide Chains. *J Biol Chem* 273, 5528-5535.
- DeFeo-Jones, D., Scolnick, E.M., Koller, R., und Dhar, R. (1983). ras-Related gene sequences identified und isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 306, 707-709.
- Delaunay, A., Isnard, A.-D., und Toledano, M.B. (2000). H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *EMBO J* 19, 5157-5166.

- Despres, C., Chubak, C., Rochon, A., Clark, R., Bethune, T., Desveaux, D., und Fobert, P.R. (2003). The Arabidopsis NPR1 Disease Resistance Protein Is a Novel Cofactor That Confers Redox Regulation of DNA Binding Activity to the Basic Domain/Leucine Zipper Transcription Factor TGA1. *Plant Cell* 15, 2181-2191.
- Després, C., DeLong, C., Glaze, S., Liu, E., und Fobert, P.R. (2000). The Arabidopsis NPR1/NIM1 Protein Enhances the DNA Binding Activity of a Subgroup of the TGA Family of bZIP Transcription Factors. *Plant Cell* 12, 279-290.
- Di Paolo, J.A., und Carruthers, C. (1960). The Effect of Allacin from Garlic on Tumor Growth *Cancer Res* 20, 431-434.
- Díez, D., Sánchez-Jiménez, F., und Ranea, J.A.G. (2011). Evolutionary expansion of the Ras switch regulatory module in eukaryotes. *Nucl Acid Res* 39, 5526-5537.
- Dimmer, K.S., Fritz, S., Fuchs, F., Messerschmitt, M., Weinbach, N., Neupert, W., und Westermann, B. (2002). Genetic basis of mitochondrial function und morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 13, 847-853.
- Dirsch, V.M., Kiemer, A.K., Wagner, H., und Vollmar, A.M. (1998). Effect of allacin and ajoene, two compounds of garlic, on inducible nitric oxide synthase. *Atherosclerosis* 139, 333-339.
- Dong, J.H., Wen, J.F., und Tian, H.F. (2007). Homologs of eukaryotic Ras superfamily proteins in prokaryotes and their novel phylogenetic correlation with their eukaryotic analogs. *Gene* 396, 116-124.
- Dubreuil-Maurizi, C., Vitecek, J., Marty, L., Branciard, L., Frettinger, P., Wendehenne, D., Meyer, A.J., Mauch, F., und Poinssot, B. (2011). Glutathione deficiency of the Arabidopsis mutant pad2-1 affects oxidative stress-related events, defense gene expression and hypersensitive response. *Plant Physiol* 157, 2000-2012.
- Eaton, P., und Shattock, M.J. (2002). Purification of Proteins Susceptible to Oxidation at Cysteine Residues: Identification of Malate Dehydrogenase as a Target for S-Glutathiolation. *Ann NY Acad Sci* 973, 529-532.
- Eisenberg, T., Buttner, S., Kroemer, G., und Madeo, F. (2007). The mitochondrial pathway in yeast apoptosis. *Apoptosis* 12, 1011-1023.
- Ellmore, G.S., und Feldberg, R.S. (1994). Alliin lyase localication in bundle sheaths of the garlic clove (*Allium sativum*). *Am J Bot* 81, 89-94.
- Entian, K.D., Schuster, T., Hegemann, J.H., Becher, D., Feldmann, H., Guldener, U., Gotz, R., Hansen, M., Hollenberg, C.P., Jansen, G., *et al.* (1999). Functional analysis of 150 deletion mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by a systematic approach. *Mol Gen Genet* 262, 683-702.
- Escoté, X., Miranda, M., Menoyo, S., Rodríguez-Porrata, B., Carmona-Gutiérrez, D., Jungwirth, H., Madeo, F., Cordero, R.R., Mas, A., Tinahones, F., *et al.* (2012). Resveratrol induces antioxidant defence via transcription factor Yap1p. *Yeast* 29, 251-263.
- Fairlamb, A.H., Blackburn, P., Ulrich, P., Chait, B.T., und Cerami, A. (1985). Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science* 227, 1485-1487.
- Farah, M.E., und Amberg, D.C. (2007). Conserved actin cysteine residues are oxidative stress sensors that can regulate cell death in yeast. *Mol Biol Cell* 18, 1359-1365.
- Farah, M.E., Sirotkin, V., Haarer, B., Kakhniashvili, D., und Amberg, D.C. (2011). Diverse protective roles of the actin cytoskeleton during oxidative stress. *Cytoskeleton* 68, 340-354.
- Faulkner, K., und Fridovich, I. (1993). Luminol and lucigenin as detectors for $O_2^{\cdot-}$. *Free Radic Biol Med* 15, 447-451.
- Fedor-Chaiken, M., Deschenes, R.J., und Broach, J.R. (1990). SRV2, a gene required for RAS activation of adenylate cyclase in yeast. *Cell* 61, 329-340.
- Fedoroff, N. (2006). Redox Regulatory Mechanisms in Cellular Stress Responses. *Ann Bot* 98, 289-300.
- Feechan, A., Kwon, E., Yun, B.-W., Wang, Y., Pallas, J.A., und Loake, G.J. (2005). A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8054-8059.

- Feldberg, R.S., Chang, S.C., Kotik, A.N., Nadler, M., Neuwirth, Z., Sundstrom, D.C., und Thompson, N.H. (1988). In vitro mechanism of inhibition of bacterial cell growth by allicin. *Antimicrob Agents Chemother* 32, 1763–1768.
- Feldmann, H. (2012). *Yeast Molecular und Cell Biology*, 2. Auflage, Wiley-Blackwell, Weinheim.
- Fernández-Medarde, A., und Santos, E. (2011). Ras in Cancer and Developmental Diseases. *Gen Cancer* 2, 344–358.
- Fogh, J., Wright, W.C., und Loveless, J.D. (1977). Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst* 58, 209–214.
- Fourquet, S., Guerois, R., Biard, D., und Toledano, M.B. (2010). Activation of NRF2 by nitrosative agents und H₂O₂ involves KEAP1 disulfide formation. *J Biol Chem* 285, 8463–8471.
- Foyer, C.H., und Noctor, G. (2005). Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17, 1866–1875.
- Foyer, C.H., und Shigeoka, S. (2011). Understanding Oxidative Stress and Antioxidant Functions to Enhance Photosynthesis. *Plant Physiol* 155, 93–100.
- Fraser, J.A., Kansagra, P., Kotecki, C., Saunders, R.D., und McLellan, L.I. (2003). The modifier subunit of *Drosophila* glutamate-cysteine ligase regulates catalytic activity by covalent and noncovalent interactions und influences glutathione homeostasis in vivo *J Biol Chem* 278, 46369–46377.
- Fraser, J.A., Saunders, R.D., und McLellan, L.I. (2002). *Drosophila melanogaster* glutamate-cysteine ligase activity is regulated by a modifier subunit with a mechanism of action similar to that of the mammalian form *J Biol Chem* 277, 1158–1165.
- Fratelli, M., Demol, H., Puype, M., Casagrande, S., Eberini, I., Salmona, M., Bonetto, V., Mengozzi, M., Duffieux, F., Miclet, E., *et al.* (2002). Identification by redox proteomics of glutathionylated proteins in oxidatively stressed human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3505–3510.
- Fratelli, M., Demol, H., Puype, M., Casagrande, S., Villa, P., Eberini, I., Vandekerckhove, J., Gianazza, E., und Ghezzi, P. (2003). Identification of proteins undergoing glutathionylation in oxidatively stressed hepatocytes und hepatoma cells. *Proteomics* 3, 1154–1161.
- Fratelli, M., Gianazza, E., und Ghezzi, P. (2004). Redox proteomics: identification und functional role of glutathionylated proteins. *Expert Rev Proteomics* 1, 365–376.
- Fröhlich, K.-U., und Madeo, F. (2000). Apoptosis in yeast- a monocellular organism exhibits altruistic behaviour. *FEBS Lett* 473, 6–9.
- Fuhrer, J. (1982). Ethylene Biosynthesis und Cadmium Toxicity in Leaf Tissue of Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiol* 70, 162–167.
- Gales, G., Penninckx, M., Block, J.-C., und Leroy, P. (2008). Role of glutathione metabolism status in the definition of some cellular parameters und oxidative stress tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* cells growing as biofilms. *FEMS Yeast Res* 8, 667–675.
- Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D., und Brown, P.O. (2000). Genomic Expression Programs in the Response of Yeast Cells to Environmental Changes. *Mol Biol Cell* 11, 4241–4257.
- Ghezzi, P., und Di Simplicio, P. (2009). Protein Glutathiolation. In: *Redox Signaling und Regulation in Biology und Medicine*, C. Jacob, und P. Winyard (Edit.), Wiley-VCH, Weinheim.
- Giaever, G., Chu, A.M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., Andre, B., *et al.* (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 418, 387–391.
- Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H., und Parks, W.P. (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 51, 1417–1423.
- Gil, R., und Seeling, J.M. (1999). Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing ira1 mutant alleles modeled after disease-causing mutations in NF1. *Mol Cell Biochem* 202, 109–118.

- Giles, G.I., und Jacob, C. (2002). Reactive sulfur species: an emerging concept in oxidative stress. *Biol Chem* 383, 375-388.
- Giles, G.I., Tasker, K.M., und Jacob, C. (2001). Hypothesis: the role of reactive sulfur species in oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 31, 1279-1283.
- Glazebrook, J., und Ausubel, F.M. (1994). Isolation of phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterization of their interactions with bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8955-8959.
- Gold, R., Kappos, L., Arnold, D.L., Bar-Or, A., Giovannoni, G., Selmaj, K., Tornatore, C., Sweetser, M.T., Yang, M., Sheikh, S.I., *et al.* (2012). Placebo-Controlled Phase 3 Study of Oral BG-12 for Relapsing Multiple Sclerosis. *New Eng J Med* 367, 1098-1107.
- Gourlay, C.W., und Ayscough, K.R. (2005a). Identification of an upstream regulatory pathway controlling actin-mediated apoptosis in yeast. *J Cell Sci* 118, 2119-2132.
- Gourlay, C.W., und Ayscough, K.R. (2005b). A role for actin in aging und apoptosis. *Biochem Soc Trans* 33, 1260-1264.
- Gourlay, C.W., und Ayscough, K.R. (2006). Actin-induced hyperactivation of the Ras signaling pathway leads to apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 26, 6487-6501.
- Granroth, B. (1970). Biosynthesis and decomposition of cysteine derivatives in onion und other *Allium* species *Ann Acad Sci Fenn Chem* 154, 1-71.
- Grant, C.M. (2001). Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. *Mol Microbiol* 39, 533-541.
- Grant, C.M., Collinson, L.P., Roe, J.-H., und Dawes, I.W. (1996a). Yeast glutathione reductase is required for protection against oxidative stress and is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Mol Microbiol* 21, 171-179.
- Grant, C.M., MacIver, F.H., und Dawes, I.W. (1996b). Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 29, 511-515.
- Griffith, O.W. (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase und 2-vinylpyridine. *Anal Biochem* 106, 207-212.
- Griffith, O.W. (1982). Mechanism of action, metabolism, und toxicity of buthionine sulfoximine und its higher homologs, potent inhibitors of glutathione synthesis. *J Biol Chem* 257, 13704-13712.
- Gross, A., McDonnell, J.M., und Korsmeyer, S.J. (1999). BCL-2 family members und the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13, 1899-1911.
- Gruhlke, M.C.H., Nwachukwu, I., Arbach, M., Anwar, A., Noll, U., und Slusarenko, A.J. (2011). Allicin from Garlic, Effective in Controlling Several Plant Diseases, is a Reactive Sulfur Species (RSS) that Pushes Cells into Apoptosis. In: *Modern Fungicides und Antifungal Compounds VI*, Dehn (Edit.), Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft, Braunschweig.
- Gruhlke, M.C.H., Portz, D., Stitz, M., Anwar, A., Schneider, T., Jacob, C., Schlaich, N.L., und Slusarenko, A.J. (2010). Allicin disrupts the cell's electrochemical potential und induces apoptosis in yeast. *Free Radic Biol Med* 49, 1916-1924.
- Gruhlke, M.C.H., und Slusarenko, A.J. (2012). The biology of reactive sulfur species (RSS). *Plant Physiol Biochem* 59, 98-107.
- Gruhlke, M.C.H., und Slusarenko, A.J. (Im Druck). The cellular 'thiolstat' as an emerging target of many plant secondary metabolites. In: *Recent Advances in Redox Active Plant und Microbial Products: From Basic Chemistry to Widespread Applications in Medicine und Agriculture*, C. Jacob, A.J. Slusarenko, G. Kirsch, und P. Winyard (Edit). Springer, Berlin/Heidelberg.
- Guaragnella, N., Passarella, S., Marra, E., und Giannattasio, S. (2010). Knock-out of metacaspase und/or cytochrome C results in the activation of a ROS-independent acetic acid-induced programmed cell death pathway in yeast. *FEBS Lett* 584, 3655-3660.
- Guilfoyle, T., Hagen, G., Ulmasov, T., und Murfett, J. (1998). How Does Auxin Turn On Genes? *Plant Physiol* 118, 341-347.

- Gulshan, K., Lee, S.S., und Moye-Rowley, W.S. (2011). Differential Oxidant Tolerance Determined by the Key Transcription Factor Yap1 Is Controlled by Levels of the Yap1-binding Protein, Ybp1. *J Biol Chem* 286, 34071-34081.
- Gulshan, K., Rovinsky, S.A., Coleman, S.T., und Moye-Rowley, W.S. (2005). Oxidant-specific Folding of Yap1p Regulates Both Transcriptional Activation and Nuclear Localization. *J Biological Chem* 280, 40524-40533.
- H B Drugeon, M E Juvin, J Caillon, und Courtieu, A.L. (1987). Assessment of formulas for calculating critical concentration by the agar diffusion method. *Antimicrob Agents Chemother* 31, 870-875.
- Haase, H., Hieke, N., Plum, L.M., Gruhlke, M.C.H., Slusarenko, A.J., und Rink, L. (2012). Impact of allicin on macrophage activity. *Food Chem* 134, 141-148.
- Halliwell, B. (2001). *Free Radicals and Other Reactive Species in Disease*. John Wiley & Sons, New York
- Hanoune, J., und Defer, N. (2001). Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Ann Rev Pharm Tox* 41, 145-174.
- Harwood, D.T., Nimmo, S.L., Kettle, A.J., Winterbourn, C.C., und Ashby, M.T. (2008). Molecular Structure and Dynamic Properties of a Sulfonamide Derivative of Glutathione That Is Produced Under Conditions of Oxidative Stress by Hypochlorous Acid. *Chem Res Toxicol* 21, 1011-1016.
- Hasan, R., Leroy, C., Isnard, A.-D., Labarre, J., Boy-Marcotte, E., und Toledano, M.B. (2002). The control of the yeast H₂O₂ response by the Msn2/4 transcription factors. *Mol Microbiol* 45, 233-241.
- Heer, D., Heine, D., und Sauer, U. (2009). Resistance of *Saccharomyces cerevisiae* to High Concentrations of Furfural Is Based on NADPH-Dependent Reduction by at Least Two Oxireductases. *Appl Environ Microbiol* 75, 7631-7638.
- Hewitt, W. (2003). *Microbiological Assay for Pharmaceutical Analysis: A Rational Approach*. CRC Press, Boca Raton.
- Hewitt, W., und Vincent, S. (1989). Chapter 4 – The Agar diffusion assay. In *Theory und Application of Microbiological Assay*, W. Hewitt, und S. Vincent, (Edit), Academic Press, London.
- Hicks, L.M., Cahoon, R.E., Bonner, E.R., Rivard, R.S., Sheffield, J., und Jez, J.M. (2007). Thiol-based regulation of redox-active glutamate-cysteine ligase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 19, 2653-2661.
- Hill, B.G., und Bhatnagar, A. (2012). Protein S-glutathiolation: Redox-sensitive regulation of protein function. *J Mol Cell Cardiol* 52, 559-567.
- Hirsch, K., Danilenko, M., Giat, J., Miron, T., Rabinkov, A., Wilchek, M., Mirelman, D., Levy, J., und Sharoni, Y. (2000). Effect of purified allicin, the major ingredient of freshly crushed garlic, on cancer cell proliferation. *Nutr Cancer* 38, 245-254.
- Hlavatá, L., Aguilaniu, H., Pichová, A., und Nyström, T. (2003). The oncogenic RAS2val19 mutation locks respiration, independently of PKA, in a mode prone to generate ROS. *EMBO J* 22, 3337-3345.
- Ho, J., und Bretscher, A. (2001). Ras regulates the polarity of the yeast actin cytoskeleton through the stress response pathway. *Mol Biol Cell* 12, 1541-1555.
- Hoffman, C.S., und Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* 57, 267-272.
- Holmes, W.E., Lee, J., Kuang, W.J., Rice, G.C., und Wood, W.I. (1991). Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science* 253, 1278-1280.
- Hopkins, F.G. (1921). On an autooxidizable component of the cell. *Biochem J* 15, 286-303.
- Hopkins, F.G. (1929). On Glutathione: An reinvestigation *J Biol Chem* 84, 269-303.
- Horev-Azaria, L., Eliav, S., Izigov, N., Pri-Chen, S., Mirelman, D., Miron, T., Rabinkov, A., Wilchek, M., Jacob-Hirsch, J., Amariglio, N., *et al.* (2009). Allicin up-regulates cellular glutathione level in vascular endothelial cells. *Eur J Nutr* 48, 67-74.
- Huang, K.-P., und Huang, F.L. (2002). Glutathionylation of proteins by glutathione disulfide S-oxide. *Biochem Pharmacol* 64, 1049-1056.

- Huey, R.B., Carlson, M., Crozier, L., Frazier, M., Hamilton, H., Harley, C., Hoang, A., und Kingsolver, J.G. (2002). Plants Versus Animals: Do They Deal with Stress in Different Ways? *Integr Comp Biol* 42, 415-423.
- Humphrey, J.H., und Lightbown, J.W. (1952). A General Theory for Plate Assay of Antibiotics with some Practical Applications. *J Gen Microbiol* 7, 129-143.
- Hurwitz, N., Segal, M., Marbach, I., und Levitzki, A. (1995). Differential activation of yeast adenylyl cyclase by Ras1 and Ras2 depends on the conserved N terminus. *Proc Natl Acad Sci* 92, 11009-11013.
- Idziorek, T., Estaquier, J., De Bels, F., und Ameisen, J.C. (1995). YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability. *J Immunol Methods* 185, 249-258.
- Inouye, S., Takizawa, T., und Yamaguchi, H. (2001). Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *J Antimicrob Chemother* 47, 565-573.
- Iwahashi, Y., Hosoda, H., Park, J.H., Lee, J.H., Suzuki, Y., Kitagawa, E., Murata, S.M., Jwa, N.S., Gu, M.B., und Iwahashi, H. (2006). Mechanisms of patulin toxicity under conditions that inhibit yeast growth. *J Agric Food Chem* 54, 1936-1942.
- Izawa, S., Inoue, Y., und Kimura, A. (1995). Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 368, 73-76.
- Jacob, C. (2011). Redox signalling via the cellular thiolstat. *Biochem Soc Trans* 39, 1247-1253.
- Jacob, C., und Anwar, A. (2008). The chemistry behind redox regulation with a focus on sulphur redox systems. *Physiol Plant* 133, 469-480.
- Jacob, C., Jamier, V., und Ba, L.A. (2011). Redox active secondary metabolites. *Curr Opin Chem Biol* 15, 149-155.
- Jacob, C., Knight, I., und Winyard, P.G. (2006). Aspects of the biological redox chemistry of cysteine: from simple redox responses to sophisticated signalling pathways. *Biol Chem* 387, 1385-1397.
- Jacob, C., Lancaster, J.R., und Giles, G.I. (2004). Reactive sulphur species in oxidative signal transduction. *Biochem Soc Trans* 32, 1015-1017.
- Jakobsen, T.H., van Gennip, M., Phipps, R.K., Shanmugham, M.S., Christensen, L.D., Alhede, M., Skindersoe, M.E., Rasmussen, T.B., Friedrich, K., Uthe, F., *et al.* (2012). Ajoene, a Sulfur Rich Molecule from Garlic, Inhibits Genes Controlled by Quorum Sensing. *Antimicrob Agents Chemother* 56, 2314-2325.
- Jander, G., Strähle, J., und Schweda, E. (1995). Einführung in das anorganisch-chemische Praktikum 14. Auflage, S. Hirzel Verlag, Stuttgart.
- Javle, M., und Curtin, N.J. (2011). The role of PARP in DNA repair und its therapeutic exploitation. *Br J Cancer* 105, 1114-1122.
- Jaynes, P.K., McDonough, J.P., und Mahler, H.R. (1982). Properties und Possible Functions of the Adenylate Cyclase in Plasma Membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 2, 1481-1491.
- Jez, J.M., Cahoon, R.E., und Chen, S. (2004). Arabidopsis thaliana glutamate-cysteine ligase: functional properties, kinetic mechanism, und regulation of activity. *J Biol Chem* 279, 33463-33470.
- Ji, Y., Akerboom, T.P.M., Sies, H., und Thomas, J.A. (1999). S-Nitrosylation und S-Glutathiolation of Protein Sulfhydryls by S-Nitroso-Glutathione. *Arch Biochem Biophys* 362, 67-78.
- Jocelyn, P.C. (1967). The Standard Redox Potential of Cysteine-Cystine from the Thiol-Disulphide Exchange Reaction with Glutathione und Lipoic Acid. *Eur J Biochem* 2, 327-331.
- Jocelyn, P.C. (1972). Biochemistry of the SH-group. The occurrence, chemical properties, metabolism und biological functions of thiols und disulphides, Academic Press, London.
- Jones, M.G., Collin, H.A., Tregova, A., Trueman, L., Brown, L., Cosstick, R., Hughes, J., Milne, J., Wilkinson, M.C., Tomsett, A.B., *et al.* (2007). The Biochemical und Physiological Genesis of Alliin in Garlic. *Medic Aromatic Plant Sci Biotechnol* 1, 21-24.

- Jonkers, D., van den Broek, E., van Dooren, I., Thijs, C., Dorant, E., Hageman, G., und Stobberingh, E. (1999). Antibacterial effect of garlic und omeprazole on *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother* 43, 837-839.
- Jönsson, T.J., und Lowther, W.T. (2007). The peroxiredoxin repair proteins. *Subcell Biochem* 44, 115-141.
- Kalyanaraman, B., Karoui, H., Singh, R.J., und Felix, C.C. (1996). Detection of Thiyl Radical Adducts Formed during Hydroxyl Radical- und Peroxynitrite-Mediated Oxidation of Thiols—A High Resolution ESR Spin-Trapping Study at Q-band (35 GHz). *Anal Biochem* 241, 75-81.
- Kapitzky, L., Beltrao, P., Berens, T.J., Gassner, N., Zhou, C., Wuster, A., Wu, J., Babu, M.M., Elledge, S.J., Toczyski, D., *et al.* (2010). Cross-species chemogenomic profiling reveals evolutionarily conserved drug mode of action. *Mol Syst Biol* 6, 451.
- Karinand, M., und Shaulia, E. (2001). AP-1: Linking Hydrogen Peroxide und Oxidative Stress. *IUBMB Life* 52, 17-24.
- Karlson, P., Doenecke, D., und Koolman, J. (1994). Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler, 14. Auflage, Thieme, Stuttgart.
- Kavanagh, F. (1972). An approach to Accurate Diffusion Assays. In: *Analytical Microbiology*, F. Kavanagh, (Edit) Academic Press, New York
- Kelkel, M., Cerella, C., Mack, F., Schneider, T., Jacob, C., Schumacher, M., Dicato, M., und Diederich, M. (2012). ROS-independent JNK activation and multisite phosphorylation of Bcl-2 link diallyl tetrasulfide-induced mitotic arrest to apoptosis. *Carcinogenesis* 33, 2162-2171.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., und Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257
- Keusgen, M., Jünger, M., Krest, I., und Schöning, M.J. (2003). Development of a biosensor specific for cysteine sulfoxides. *Biosens Bioelectron* 18, 805-812.
- Khan, M.A.S., Chock, P.B., und Stadtman, E.R. (2005). Knockout of caspase-like gene, YCA1, abrogates apoptosis and elevates oxidized proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 17326-17331.
- Khodavandi, A., Alizadeh, F., Aala, F., Sekawi, Z., und Chong, P. (2010). In Vitro Investigation of Antifungal Activity of Allicin Alone and in Combination with Azoles Against *Candida* Species. *Mycopathologia* 169, 287-295.
- Khodavandi, A., Alizadeh, F., Harmal, N.S., Sidik, S.M., Othman, F., Sekawi, Z., Jahromi, M.A.F., Ng, K.-P., und Chong, P.P. (2011a). Comparison between efficacy of allicin and fluconazole against *Candida albicans* in vitro and in a systemic candidiasis mouse model. *FEMS Microbiol Lett* 315, 87-93.
- Khodavandi, A., Harmal, N.S., Alizadeh, F., Scully, O.J., Sidik, S.M., Othman, F., Sekawi, Z., Ng, K.P., und Chong, P.P. (2011b). Comparison between allicin and fluconazole in *Candida albicans* biofilm inhibition and in suppression of HWP1 gene expression. *Phytomedicine* 19, 56-63.
- Khoshnan, A., Tindell, C., Laux, I., Bae, D., Bennett, B., und Nel, A.E. (2000). The NF- κ B Cascade Is Important in Bcl-xL Expression and for the Anti-Apoptotic Effects of the CD28 Receptor in Primary Human CD4+ Lymphocytes. *J Immunol* 165, 1743-1754.
- Kice, J.L., Venier, C.G., und Heasley, L. (1967). Mechanisms of reactions of thiosulfinates (sulfenic anhydrides). I. Thiosulfinate-sulfenic acid reaction. *J Am Chem Soc* 89, 3557-3565.
- Kice, J.L., Venier, C.G., Large, G.B., und Heasley, L. (1969). Mechanisms of reactions of thiosulfinates (sulfenic anhydrides). III. Sulfide-catalyzed disproportionation of aryl thiosulfinates. *J Am Chem Soc* 91, 2028-2035.
- Kim, Y.-S., Kim, K.S., Han, I., Kim, M.-H., Jung, M.H., und Park, H.-K. (2012). Quantitative und Qualitative Analysis of the Antifungal Activity of Allicin Alone und in Combination with Antifungal Drugs. *PLoS ONE* 7, e38242.
- Klapheck, S. (1988). Homoglutathione: isolation, quantification and occurrence in legumes. *Physiol Plant* 74, 727-732.

- Klapheck, S. (1992). γ -Glutamylcysteinylserine - a new homologue of glutathione in plants of the family *Poaceae*. *Bot Acta* 105, 174-179.
- Klatt, P., Molina, E.P., und Lamas, S. (1999). Nitric Oxide Inhibits c-Jun DNA Binding by Specifically Targeted S-Glutathionylation. *J Biol Chem* 274, 15857-15864.
- Klein, J.A., Longo-Guess, C.M., Rossmann, M.P., Seburn, K.L., Hurd, R.E., Frankel, W.N., Bronson, R.T., und Ackerman, S.L. (2002). The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature* 419, 367-374.
- Klionsky, D.J., Cuervo, A.M., und Seglen, P.O. (2007). Methods for Monitoring Autophagy from Yeast to Human. *Autophagy* 3, 181-206.
- Knall, C., Young, S., Nick, J.A., Buhl, A.M., Worthen, G.S., und Johnson, G.L. (1996). Interleukin-8 Regulation of the Ras/Raf/Mitogen-activated Protein Kinase Pathway in Human Neutrophils. *J Biol Chem* 271, 2832-2838.
- Koch, H.P., und Lawson, L.D. (1996). *Garlic - The Science und Therapeutic Application of Allium sativum L. und Related Species*, 2. Auflage, Williams und Wilkins, Baltimore.
- Kooyman, E.C. (1967). Thiyl Radicals. *Pure Appl Chem* 15, 81-88.
- Koprivova, A., Mugford, S., und Kopriva, S. (2010). *Arabidopsis* root growth dependence on glutathione is linked to auxin transport. *Plant Cell Rep* 29, 1157-1167.
- Kranner, I., Birtic, S., Anderson, K.M., und Pritchard, H.W. (2006). Glutathione half-cell reduction potential: A universal stress marker and modulator of programmed cell death? *Free Radic Biol Med* 40, 2155-2165.
- Krezel, A., und Maret, W. (2006). Zinc-buffering capacity of a eukaryotic cell at physiological pZn. *J Biol Inorg Chem* 11, 1049-1062.
- Kröncke, K.D. (2007). Cellular stress and intracellular zinc dyshomeostasis. *Arch Biochem Biophys* 463.
- Kröncke, K.D., und Klotz, L.O. (2009). Zinc fingers as biologic redox switches? *Antioxid Redox Signal* 11, 1015-1027.
- Krysan, P.J., Young, J.C., und Sussman, M.R. (1999). T-DNA as an Insertional Mutagen in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 11, 2283-2290.
- Ku, D.D., Abdel-Razek, T.T., Dai, J., Kim-Park, S., Fallon, M.B., und Abrams, G.A. (2002). Garlic and its active metabolite allicin produce endothelium- and nitric oxide-dependent relaxation in rat pulmonary arteries. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29, 84-91.
- Kuge, S., Arita, M., Murayama, A., Maeta, K., Izawa, S., Inoue, Y., und Nomoto, A. (2001). Regulation of the yeast Yap1p nuclear export signal is mediated by redox signal-induced reversible disulfide bond formation. *Mol Cell Biol* 21, 6139-6150.
- Kuge, S., und Jones, N. (1994). YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *EMBO J* 13, 655-664.
- Kuge, S., Jones, N., und Nomoto, A. (1997). Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *EMBO J* 16, 1710-1720.
- Kuge, S., Toda, T., Iizuka, N., und Nomoto, A. (1998). Crm1 (Xpo1) dependent nuclear export of the budding yeast transcription factor yAP-1 is sensitive to oxidative stress. *Genes to Cells* 3, 521-532.
- Kumar, C., Igbaria, A., D'Autreaux, B., Planson, A.-G., Junot, C., Godat, E., Bachhawat, A.K., Delaunay-Moisand, A., und Toledano, M.B. (2011). Glutathione revisited: a vital function in iron metabolism and ancillary role in thiol-redox control. *EMBO J* 30, 2044-2056.
- La Porta, C.A., und Comolli, R. (1998). PKC-dependent modulation of I κ B α -NF κ B pathway in low metastatic B16F1 murine melanoma cells and in highly metastatic BL6 cells. *Anticancer Res* 18, 2591-2597.
- Lancaster, J.E., und Collin, H.A. (1981). Presence of alliinase in isolated vacuoles and of alkyl cysteine sulfoxides in the cytoplasm of bulbs of onion (*Allium cepa*). *Plant Sci Lett* 2, 169-176.

- Lancaster, J.E., und Shaw, M.L. (1989). γ -Glutamyl peptides in the biosynthesis of S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides (flavour precursors) in *Allium*. *Phytochemistry* 28, 455-460.
- Lau, S., Jurgens, G., und De Smet, I. (2008). The evolving complexity of the auxin pathway. *Plant Cell* 20, 1738-1746.
- Lawson, L.D., und Wang, Z.J. (2001). Low allicin release from garlic supplements: a major problem due to the sensitivities of alliinase activity. *J Agric Food Chem* 49, 2592-2599.
- Leadsham, J., und Gourlay, C. (2010). cAMP/PKA signaling balances respiratory activity with mitochondria dependent apoptosis via transcriptional regulation. *BMC Cell Biol* 11, 92.
- Leadsham, J.E., Miller, K., Ayscough, K.R., Colombo, S., Martegani, E., Sudbery, P., und Gourlay, C.W. (2009). Whi2p links nutritional sensing to actin-dependent Ras-cAMP-PKA regulation and apoptosis in yeast. *J Cell Sci* 122, 706-715.
- Lee, J., Godon, C., Lagniel, G., Spector, D., Garin, J., Labarre, J., und Toledano, M.B. (1999). Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J Biol Chem* 274, 16040-16046.
- Lemar, K.M., Aon, M.A., Cortassa, S., O'Rourke, B., Müller, C.T., und Lloyd, D. (2007). Diallyl disulphide depletes glutathione in *Candida albicans*: oxidative stress-mediated cell death studied by two-photon microscopy. *Yeast* 24, 695-706.
- Lemar, K.M., Passa, O., Aon, M.A., Cortassa, S., Müller, C.T., Sue Plummer, B.O.R., und Lloyd, D. (2005). Allyl alcohol and garlic (*Allium sativum*) extract produce oxidative stress in *Candida albicans*. *Microbiology* 151, 3257-3265.
- Li, J., Huang, F.L., und Huang, K.-P. (2001). Glutathiolation of Proteins by Glutathione Disulfide S-Oxide Derived from S-Nitrosoglutathione. *J Biol Chem* 276, 3098-3105.
- Li, Z.-S., Szczypka, M., Lu, Y.-P., Thiele, D.J., und Rea, P.A. (1996). The yeast cadmium factor protein (YCF1) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump. *J Biol Chem* 271, 6509-6517.
- Liang, D., Qin, Y., Zhao, W., Zhai, X., Guo, Z., Wang, R., Tong, L., Lin, L., Chen, H., Wong, Y.C., *et al.* (2011). S-allylmercaptocysteine effectively inhibits the proliferation of colorectal cancer cells under in vitro and in vivo conditions. *Cancer Lett* 310, 69-76.
- Lill, R., und Mühlenhoff, U. (2006). Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes: components and mechanisms. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 457-486.
- Lin, Y.-T., Yang, J.-S., Lin, S.-Y., Tan, T.-W., Ho, C.-C., Hsia, T.-C., Chiu, T.-H., Yu, C.-S., Lu, H.-F., Weng, Y.-S. *et al.* (2008). Diallyl Disulfide (DADS) Induces Apoptosis in Human Cervical Cancer Ca Ski Cells via Reactive Oxygen Species and Ca²⁺-dependent Mitochondria-dependent Pathway. *Anticancer Res* 28, 2791-2799.
- Liu, C., Cao, F., Tang, Q.Z., Yan, L., Dong, Y.G., Zhu, L.H., Wang, L., Bian, Z.Y., und Li, H. (2010). Allicin protects against cardiac hypertrophy and fibrosis via attenuating reactive oxygen species-dependent signaling pathways. *J Nutr Biochem* 21, 1238-1250.
- Livas, D., Almering, M., Daran, J.-M., Pronk, J., und Gancedo, J. (2011). Transcriptional responses to glucose in *Saccharomyces cerevisiae* strains lacking a functional protein kinase A. *BMC Genomics* 12, 405.
- Lockshon, D., Olsen, C.P., Brett, C.L., Chertov, A., Merz, A.J., Lorenz, D.A., Van Gilst, M.R., und Kennedy, B.K. (2012). Rho signaling participates in membrane fluidity homeostasis. *PLoS ONE* 7, 5.
- Longo, V.D., Ellerby, L.M., Bredesen, D.E., Valentine, J.S., und Gralla, E.B. (1997). Human Bcl-2 reverses survival defects in yeast lacking superoxide dismutase and delays death of wild-type yeast. *J Cell Biol* 137, 1581-1588.
- López-Mirabal, H.R., Thorsen, M., Kielland-Brandt, M.C., Toledano, M.B., und Winther, J.R. (2007). Cytoplasmic glutathione redox status determines survival upon exposure to the thiol-oxidant 4,4'-dipyridyl disulfide. *FEMS Yeast Res* 7, 391-403.
- Lowenstein, E.J., Daly, R.J., Batzer, A.G., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, E.Y., Bar-Sagi, D., und Schlessinger, J. (1992). The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to Ras signaling. *Cell* 70, 431-442.

- Lowy, D.R., und Willumsen, B.M. (1993). Function and regulation of ras. *Annu Rev Biochem* 62, 851-891.
- Lu, S.C. (2009). Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med* 30, 42-59.
- Ludovico, P., Rodrigues, F., Almeida, A., Silva, M.T., Barrientos, A., und Corte-Real, M. (2002). Cytochrome c release and mitochondria involvement in programmed cell death induced by acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 13, 2598-2606.
- Lumper, L., und Zahn, H. (1965). Chemie und Biochemie des Disulfidaustausches. In: *Advances in Enzymology und Related Areas of Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc, New York.
- MacNicol, P.K. (1987). Homogluthathione and glutathione synthetases of legume seedlings: partial purification und substrate specificity *Plant Sci* 53, 229-235.
- Madeo, F., Engelhardt, S., Herker, E., Lehmann, N., Maldener, C., Proksch, A., Wissing, S., und Fröhlich, K.-U. (2002a). Apoptosis in yeast: a new model system with applications in cell biology und medicine. *Curr Genet* 41, 208-216.
- Madeo, F., Fröhlich, E., und Fröhlich, K.U. (1997). A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. *J Cell Biol* 139, 729-734.
- Madeo, F., Herker, E., Maldener, C., Wissing, S., Lächelt, S., Herlan, M., Fehr, M., Lauber, K., Sigrist, S.J., Wesselborg, S., *et al.* (2002b). A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol Cell* 9, 911-917.
- Magherini, F., Tani, C., Gamberi, T., Caselli, A., Bianchi, L., Bini, L., und Modesti, A. (2007). Protein expression profiles in *Saccharomyces cerevisiae* during apoptosis induced by H₂O₂. *Proteomics* 7, 1434-1445.
- Maloney, J., R., Theriot, K., J., McGee, S., Booth, D., Torres, J., E., und Wilson, W., R., Jr. (2006). Process for producing diallyl disulfide. Patent. International Application Number: PCT/US2004/022596. Publikationsdatum: 16.02.2006.
- Mansfield, J.W. (2000). Antimicrobial Compounds und Resistance - The Role of Phytoalexins und Phytoanticipins. In: *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases*, A.J. Slusarenko, R.S.S. Fraser, und L.C. van Loon, (Edit). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Maple, J., und Moller, S.G. (2007). Mutagenesis in Arabidopsis. *Methods Mol Biol* 362, 197-206.
- Marchetti, P., Decaudin, D., Macho, A., Zamzami, N., Hirsch, T., Susin, S.A., und Kroemer, G. (1997). Redox regulation of apoptosis: impact of thiol oxidation status on mitochondrial function. *Eur J Immunol* 27, 289-296.
- Mateo, A., Funck, D., Muhlenbock, P., Kular, B., Mullineaux, P.M., und Karpinski, S. (2006). Controlled levels of salicylic acid are required for optimal photosynthesis und redox homeostasis. *J Exp Bot* 57, 1795-1807.
- Matsumoto, K., Uno, I., Oshima, Y., und Ishikawa, T. (1982). Isolation und characterization of yeast mutants deficient in adenylate cyclase und cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 2355-2359.
- Mattila, P.K., Quintero-Monzon, O., Kugler, J., Moseley, J.B., Almo, S.C., Lappalainen, P., und Goode, B.L. (2004). A high-affinity interaction with ADP-actin monomers underlies the mechanism und in vivo function of Srv2/cyclase-associated protein. *Mol Biol Cell* 15, 5158-5171.
- May, M.J., und Leaver, C.J. (1993). Oxidative stimulation of glutathione synthesis in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant Physiol* 103, 621-627.
- Meister, A. (1995a). Glutathione biosynthesis und its inhibition. *Methods Enzymol* 252, 26-30.
- Meister, A. (1995b). Glutathione metabolism. *Methods Enzymol* 251, 3-7.
- Meyer, A.J., und Hell, R. (2005). Glutathione homeostasis und redox-regulation by sulfhydryl groups. *Photosynth Res* 86, 435-457.
- Michelet, L., Zaffagnini, M., Massot, V., Keryer, E., Vanacker, H., Miginiac-Maslow, M., Issakidis-Bourguet, E., und Lemaire, S. (2006). Thioredoxins, glutaredoxins, und glutathionylation: new crosstalks to explore. *Photosynth Res* 89, 225-245.

- Millan, M.J., Marin, P., Bockaert, J., und Mannoury la Cour, C. (2008). Signaling at G-protein-coupled serotonin receptors: recent advances and future research directions. *Trends Pharmacol Sci* 29, 454-464.
- Miron, T., Listowsky, I., und Wilchek, M. (2010). Reaction mechanisms of allicin and allyl-mixed disulfides with proteins und small thiol molecules. *Eur J Med Chem* 45, 1912-1918.
- Miron, T., Mironchik, M., Mirelman, D., Wilchek, M., und Rabinkov, A. (2003). Inhibition of tumor growth by a novel approach: in situ allicin generation using targeted alliinase delivery. *Mol Cancer Ther* 2, 1295-1301.
- Miron, T., Rabinkov, A., Mirelman, D., Wilchek, M., und Weiner, L. (2000). The mode of action of allicin: its ready permeability through phospholipid membranes may contribute to its biological activity. *Biochim Biophys Acta* 1463, 20-30.
- Montenarh, M., und Saidu, N.E. (2012). The effect of diallyl polysulfanes on cellular signaling cascades. *Nat Prod Commun* 7, 401-408.
- Morgan, B., Ezeriņa, D., Amoako, T.N.E., Riemer, J., Seedorf, M., und Dick, T.P. (2013). Multiple glutathione disulfide removal pathways mediate cytosolic redox homeostasis. *Nat Chem Biol* 9, 119-125.
- Morgan, B.A., Banks, G.R., Toone, W.M., Raitt, D., Kuge, S., und Johnston, L.H. (1997). The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 16, 1035-1044.
- Mou, Z., Fan, W., und Dong, X. (2003). Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* 113, 935-944.
- Moye-Rowley, W.S., Harshman, K.D., und Parker, C.S. (1989). Yeast YAP1 encodes a novel form of the jun family of transcriptional activator proteins. *Genes Dev* 3, 283-292.
- Münchberg, U., Anwar, A., Mecklenburg, S., und Jacob, C. (2007). Polysulfides as biologically active ingredients of garlic. *Org Biomol Chem* 5, 1505-1518.
- Munday, R., Munday, J.S., und Munday, C. (2003). Comparative effects of mono-, di-, tri- und tetrasulfides derived from plants of the *Allium* family: Redox cycling in vitro und hemolytic activity und phase 2 enzyme induction in vivo. *Free Radic Biol Med* 34, 1200-1211.
- Murray, M.J., Shilo, B.-Z., Shih, C., Cowing, D., Hsu, H.W., und Weinberg, R.A. (1981). Three different human tumor cell lines contain different oncogenes. *Cell* 25, 355-361.
- Myhre, O., Andersen, J.M., Aarnes, H., und Fonnum, F. (2003). Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, und lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochem Pharmacol* 65, 1575-1582.
- Nagahara, N. (2011a). Catalytic Site Cysteines of Thiol Enzyme: Sulfurtransferases. *J Amino Acids* 2011, 709404
- Nagahara, N. (2011b). Intermolecular disulfide bond to modulate protein function as a redox-sensing switch *J Amino Acids* 41, 59-72.
- Nagahara, N., Matsumura, T., Okamoto, R., und Kajihara, Y. (2009a). Protein cysteine modifications: (1) medicinal chemistry for proteomics *Curr Med Chem* 16, 4419-4444.
- Nagahara, N., Matsumura, T., Okamoto, R., und Kajihara, Y. (2009b). Protein cysteine modifications: (2) Reactivity specificity and topics of medicinal chemistry and protein engineering. *Curr Med Chem* 34, 4490-4501.
- Naganawa, R., Iwata, N., Ishikawa, K., Fukuda, H., Fujino, T., und Suzuki, A. (1996). Inhibition of microbial growth by ajoene, a sulfur-containing compound derived from garlic. *Appl Environm Microbiol* 62, 4238-4242.
- Nagy, P. (2013). Kinetics und mechanisms of thiol-disulfide exchange covering direct substitution und thiol oxidation-mediated pathways. *Antioxid Redox Signal* 18, 1623-1641.
- Nagy, P., und Ashby, M.T. (2005). Reactive sulfur species: Kinetics und mechanism of the oxidation of cystine by hypochlorous acid to give N,N'-Dichlorocystine. *Chem Res Toxicol* 18, 919-923.

- Nagy, P., und Ashby, M.T. (2006). Kinetics and mechanism of the oxidation of the glutathione dimer by hypochlorous acid und catalytic reduction of the chloroamine product by glutathione reductase. *Chem Res Toxicol* 20, 79-87.
- Nagy, P., und Ashby, M.T. (2007). Reactive sulfur species: Kinetics and mechanisms of the oxidation of cysteine by hypochlorous acid to give cysteine sulfenic acid. *J Am Chem Soc* 129, 14082-14091.
- Narasimhan, M.L., Damsz, B., Coca, M.A., Ibeas, J.I., Yun, D.J., Pardo, J.M., Hasegawa, P.M., und Bressan, R.A. (2001). A plant defense response effector induces microbial apoptosis. *Mol Cell* 8, 921-930.
- Nausser, T., Pelling, J., und Schoneich, C. (2004). Thiyl radical reaction with amino acid side chains: rate constants for hydrogen transfer and relevance for posttranslational protein modification. *Chem Res Toxicol* 17, 1323-1328.
- Ndamukong, I., Abdallat, A.A., Thurow, C., Fode, B., Zander, M., Weigel, R., und Gatz, C. (2007). SA-inducible Arabidopsis glutaredoxin interacts with TGA factors und suppresses JA-responsive PDF1.2 transcription. *Plant J* 50, 128-139.
- Nelson, D., und Cox, M. (2001). *Lehninger Biochemie*, 3. Auflage, Springer, Heidelberg.
- Nepravishta, R., Sabelli, R., Iorio, E., Micheli, L., Paci, M., und Melino, S. (2012). Oxidative species und S-glutathionyl conjugates in the apoptosis induction by allyl thiosulfate. *FEBS J* 279, 154-167.
- Netto, L.E., de Oliveira, M.A., Monteiro, G., Demasi, A.P., Cussiol, J.R., Discola, K.F., Demasi, M., Silva, G.M., Alves, S.V., Faria, V.G., *et al.* (2007). Reactive cysteine in proteins: protein folding, antioxidant defense, redox signaling und more. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 146, 180-193.
- Newman, D.J., und Cragg, G.M. (2007). Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *J Nat Prod* 70, 461-477.
- Newton, G.L., und Javor, B. (1985). γ -Glutamylcysteine und thiosulfate are the major low-molecular-weight thiols in halobacteria. *J Bacteriol* 161, 438-441.
- Newton, G.L., Rawat, M., La Clair, J.J., Jothivasan, V.K., Budiarto, T., Hamilton, C.J., Claiborne, A., Helmann, J.D., und Fahey, R.C. (2009). Bacillithiol is an antioxidant thiol produced in Bacilli. *Nat Chem Biol* 5, 625-627.
- Nikawa, J., Sass, P., und Wigler, M. (1987). Cloning and characterization of the low-affinity cyclic AMP phosphodiesterase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 7, 3629-3636.
- Noctor, G., und Foyer, C.H. (1998). Ascorbate und glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49, 249-279.
- Noctor, G., Queval, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., und Foyer, C.H. (2011). Glutathione. In *The Arabidopsis Book*, The American Society of Plant Biologists.
- Noiva, R. (1999). Protein disulfide isomerase: The multifunctional redox chaperone of the endoplasmic reticulum. *Sem Cell Dev Biol* 10, 481-493.
- North, M., Steffen, J., Loguinov, A.V., Zimmerman, G.R., Vulpe, C.D., und Eide, D.J. (2012). Genome-wide functional profiling identifies genes und processes important for zinc-limited growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet* 8, 7.
- Nwachukwu, I., Slusarenko, A.J., und Gruhlke, M.C.H. (2012). Sulfur und Sulfur Compounds in Plant Defence. *Nat Prod Commun* 7, 395-400.
- O'Connor, S.T., Lan, J., North, M., Loguinov, A., Zhang, L., Smith, M.T., Gu, A.Z., und Vulpe, C. (2012). Genome-Wide Functional und Stress Response Profiling Reveals Toxic Mechanism und Genes Required for Tolerance to Benzo[a]pyrene in *S. cerevisiae*. *Front Genet* 3, 00316.
- O'Gara, E.A., Hill, D.J., und Maslin, D.J. (2000). Activities of Garlic Oil, Garlic Powder, und Their Diallyl Constituents against *Helicobacter pylori*. *Appl Environ Microbiol* 66, 2269-2273.
- Odat, O., Matta, S., Khalil, H., Kampranis, S.C., Pfau, R., Tschlis, P.N., und Makris, A.M. (2007). Old yellow enzymes, highly homologous FMN oxidoreductases with modulating roles in oxidative stress und programmed cell death in yeast. *J Biol Chem* 282, 36010-36023.

- Ogita, A., Fujita, K.I., Taniguchi, M., und Tanaka, T. (2006). Dependence of synergistic fungicidal activity of Cu^{2+} und allicin, an allyl sulfur compound from garlic, on selective accumulation of the ion in the plasma membrane fraction via allicin-mediated phospholipid peroxidation. *Planta Med* 72, 875-880.
- Ogita, A., Hirooka, K., Yamamoto, Y., Tsutsui, N., Ichi Fujita, K., Taniguchi, M., und Tanaka, T. (2005). Synergistic fungicidal activity of Cu^{2+} und allicin, an allyl sulfur compound from garlic, and its relation to the role of alkyl hydroperoxide reductase 1 as a cell surface defense in *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicology* 215, 205-213.
- Okazaki, S., Tachibana, T., Naganuma, A., Mano, N., und Kuge, S. (2007). Multistep Disulfide Bond Formation in Yap1 Is Required for Sensing und Transduction of H_2O_2 Stress Signal. *Mol Cell* 27, 675-688.
- Oommen, S., Anto, R.J., Srinivas, G., und Karunakaran, D. (2004). Allicin (from garlic) induces caspase-mediated apoptosis in cancer cells. *Eur J Pharmacol* 485, 97-103.
- Orrenius, S., und Zhivotovsky, B. (2005). Cardiolipin oxidation sets cytochrome c free. *Nat Chem Biol* 1, 188-189.
- Ouyang, X., Tran, Q.T., Goodwin, S., Wible, R.S., Sutter, C.H., und Sutter, T.R. (2011). Yap1 activation by H_2O_2 or thiol-reactive chemicals elicits distinct adaptive gene responses. *Free Radical Biology und Medicine* 50, 1-13.
- Overvoorde, P., Fukaki, H., und Beeckman, T. (2010). Auxin Control of Root Development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2.
- Paget, M.S.B., und Buttner, M.J. (2003). Thiol-Based Regulatory Switches. *Annu Rev Genet* 37, 91-121.
- Palmiter, R.D., und Findley, S.D. (1995). Cloning und functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *EMBO J* 14, 639-649.
- Parada, L.F., Tabin, C.J., Shih, C., und Weinberg, R.A. (1982). Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. *Nature* 297, 474-478.
- Parisy, V., Poinssot, B., Owsianowski, L., Buchala, A., Glazebrook, J., und Mauch, F. (2006). Identification of PAD2 as a γ -glutamylcysteine synthetase highlights the importance of glutathione in disease resistance of *Arabidopsis*. *Plant J* 49, 159-172.
- Park, H.J., Zhang, Y., Georgescu, S.P., Johnson, K.L., Kong, D., und Galper, J.B. (2006). Human umbilical vein endothelial cells und human dermal microvascular endothelial cells offer new insights into the relationship between lipid metabolism und angiogenesis. *Stem Cell Rev* 2, 93-102.
- Park, S.-Y., Cho, S.-J., Kwon, H.-C., Lee, K.-R., Rhee, D.-K., und Pyo, S. (2005). Caspase-independent cell death by allicin in human epithelial carcinoma cells: involvement of PKA. *Cancer Lett* 224, 123-132.
- Parrish, J.Z., und Xue, D. (2003). Functional Genomic Analysis of Apoptotic DNA Degradation in *C. elegans*. *Mol Cell* 11, 987-996.
- Pasternak, M., Lim, B., Wirtz, M., Hell, R., Cobbett, C.S., und Meyer, A.J. (2008). Restricting glutathione biosynthesis to the cytosol is sufficient for normal plant development. *Plant J* 53, 999-1012.
- Pastore, A., und Piemonte, F. (2012). S-Glutathionylation signaling in cell biology: Progress und prospects. *Eur J Pharmaceut Sci* 46, 279-292.
- Paulsen, C.E., und Carroll, K.S. (2009). Chemical Dissection of an Essential Redox Switch in Yeast. *Chem Biol* 16, 217-225.
- Peck, V.M., Fuge, E.K., Padilla, P.A., Gomez, M.A., und Werner-Washburne, M. (1997). Yeast bcy1 mutants with stationary phase-specific defects. *Curr Genet* 32, 83-92.
- Perelló, A., Noll, U., und Slusarenko, A.J. (2013). In vitro efficacy of garlic extract to control fungal pathogens of wheat. *J Med Plant Res* 7, 1809-1817.
- Perrone, G.G., Tan, S.-X., und Dawes, I.W. (2008). Reactive oxygen species und yeast apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1783, 1354-1368.
- Phillips, A.J., Crowe, J.D., und Ramsdale, M. (2006a). Ras pathway signaling accelerates programmed cell death in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 726-731.

- Phillips, A.J., Crowe, J.D., und Ramsdale, M. (2006b). Ras pathway signaling accelerates programmed cell death in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Proc Nat Acad Sci U S A* 103, 726-731.
- Pirev, E., Calles, C., Schroeder, P., Sies, H., und Kröncke, K.-D. (2008). Ultraviolet-A irradiation but not ultraviolet-B or infrared-A irradiation leads to a disturbed zinc homeostasis in cells. *Free Radic Biol Med* 45, 86-91.
- Portz, D. (2008). Knoblauch im Pflanzenschutz – Wirkung, Anwendungsmöglichkeiten und molekularbiologische Studien unter besonderer Berücksichtigung des Inhaltsstoffes Allicin. Dissertation. Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften, RWTH Aachen University, Aachen.
- Portz, D., Koch, E., und Slusarenko, A.J. (2008). Effects of garlic (*Allium sativum* L.) juice containing allicin on *Phytophthora infestans* (Mont.deBary) and on downy mildew of cucumber caused by *Pseudoperonospora cubensis* (Berk.&M.A.Curtis) Rostovzev. *Eur J Plant Pathol* 122, 197–206.
- Prager-Khoutorsky, M., Goncharov, I., Rabinkov, A., Mirelman, D., Geiger, B., und Bershadsky, A.D. (2007). Allicin inhibits cell polarization, migration und division via its direct effect on microtubules. *Cell Motil Cytoskel* 64, 321-337.
- Pujol, N., Bonet, C., Vilella, F., Petkova, M.I., Mozo-Villariás, A., und De La Torre-Ruiz, M.A. (2009). Two proteins from *Saccharomyces cerevisiae*: Pfy1 und Pkc1, play a dual role in activating actin polymerization und in increasing cell viability in the adaptive response to oxidative stress. *FEMS Yeast Res* 9, 1196-1207.
- Qaddouri, B., Guaadaoui, A., Bellirou, A., Hamal, A., Melhaoui, A., Brown, G.W., und Bellaoui, M. (2011). The Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a Drug Discovery Tool to Identify Plant-Derived Natural Products with Anti-Proliferative Properties. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011, 954140.
- Quintana-Cabrera, R., Fernandez-Fernandez, S., Bobo-Jimenez, V., Escobar, J., Sastre, J., Almeida, A., und Bolaños, J.P. (2012). γ -Glutamylcysteine detoxifies reactive oxygen species by acting as glutathione peroxidase-1 cofactor. *Nat Commun* 3, 718.
- Rabinkov, A., Miron, T., Konstantinovski, L., Wilchek, M., Mirelman, D., und Weiner, L. (1998). The mode of action of allicin: trapping of radicals und interaction with thiol containing proteins. *Biochim Biophys Acta* 1379, 233-244.
- Rabinkov, A., Miron, T., Mirelman, D., Wilchek, M., Glozman, S., Yavin, E., und Weiner, L. (2000). S-Allylmercaptogluthathione: the reaction product of allicin with glutathione possesses SH-modifying and antioxidant properties. *Biochim Biophys Acta* 1499, 144-153.
- Rahman, A., Bannigan, A., Sulaman, W., Pechter, P., Blancaflor, E.B., und Baskin, T.I. (2007). Auxin, actin und growth of the *Arabidopsis thaliana* primary root. *Plant J* 50, 514-528.
- Rahman, K., und Billington, D. (2000). Dietary supplementation with aged garlic extract inhibits ADP-induced platelet aggregation in humans. *J Nutr Biochem* 130, 2662-2665.
- Raschke, W.C., Baird, S., Ralph, P., und Nakoinz, I. (1978). Functional macrophage cell lines transformed by abelson leukemia virus. *Cell* 15, 261-267.
- Rixe, O., und Fojo, T. (2007). Is Cell Death a Critical End Point for Anticancer Therapies or Is Cytostasis Sufficient? *Clin Cancer Res* 13, 7280-7287.
- Brennan, R.J. und Schiestl, R.H. (1997). Aniline und its metabolites generate free radicals in yeast. *Mutagenesis* 12, 215-220.
- Robertson, L.S., Causton, H.C., Young, R.A., und Fink, G.R. (2000). The yeast A kinases differentially regulate iron uptake und respiratory function. *Proc Nat Acad Sci U S A* 97, 5984-5988.
- Robertson, L.S., und Fink, G.R. (1998). The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13783-13787.
- Rockenfeller, P., und Madeo, F. (2010). Ageing und eating. *Biochim Biophys Acta* 1803, 499-506.
- Roetschi, A., Si-Ammour, A., Belbahri, L., Mauch, F., und Mauch-Mani, B. (2001). Characterization of an *Arabidopsis*-*Phytophthora* pathosystem: resistance requires a functional PAD2 gene und is independent of salicylic acid, ethylene und jasmonic acid signalling. *Plant J* 28, 293-305.

- Roskoski, R., Jr. (2012). ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res* 66, 105-143.
- Roucou, X., Prescott, M., Devenish, R.J., und Nagley, P. (2000). A cytochrome c-GFP fusion is not released from mitochondria into the cytoplasm upon expression of Bax in yeast cells. *FEBS Lett* 471, 235-239.
- Rouhier, N., Lemaire, S.D., und Jacquot, J.-P. (2008). The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. *Annu Rev Plant Biol* 59, 143-166.
- Ruckenstuhl, C., Carmona-Gutierrez, D., und Madeo, F. (2010). The sweet taste of death: glucose triggers apoptosis during yeast chronological aging. *Aging* 2, 643-649.
- Rustérucci, C., Espunya, M.C., Diaz, M., Chabannes, M., und Martinez, M.C. (2007). S-nitrosoglutathione reductase affords protection against pathogens in Arabidopsis, both locally and systemically. *Plant Physiol* 143, 1282-1292.
- Saidu, N.E., Touma, R., Asali, I.A., Jacob, C., und Montenarh, M. (2013). Diallyl tetrasulfane activates both the eIF2 α and Nrf2/HO-1 pathways. *Biochim Biophys Acta* 1830, 2214-2225.
- Saikumar, P., Dong, Z., Mikhailov, V., Denton, M., Weinberg, J.M., und Venkatachalam, M.A. (1999). Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med* 107, 489-506.
- Sanchez-Fernandez, R., Fricker, M., Corben, L.B., White, N.S., Sheard, N., Leaver, C.J., M, V.M., Inzé, D., und May, M.J. (1997). Cell proliferation and hair tip growth in the Arabidopsis root are under mechanistically different forms of redox control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 2745-2750.
- Sass, P., Field, J., Nikawa, J., Toda, T., und Wigler, M. (1986). Cloning and characterization of the high-affinity cAMP phosphodiesterase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 9303-9307.
- Schafer, F.Q., und Buettner, G.R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 30, 1191-1212.
- Schlaeppli, K., Bodenhausen, N., Buchala, A., Mauch, F., und Reymond, P. (2008). The glutathione-deficient mutant pad2-1 accumulates lower amounts of glucosinolates and is more susceptible to the insect herbivore *Spodoptera littoralis*. *Plant J* 55, 774-786.
- Schmelzle, T., Beck, T., Martin, D.E., und Hall, M.N. (2004). Activation of the RAS/cyclic AMP pathway suppresses a TOR deficiency in yeast. *Mol Cell Biol* 24, 338-351.
- Schmitz, I., Kirchhoff, S., und Krammer, P.H. (2000). Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *J Biochem Cell Biol* 32, 1123-1136.
- Schneider, T., Ba, L.A., Khairan, K., Zwergel, C., Bach, N.D., Bernhardt, I., Brandt, W., Wessjohann, L., Diederich, M., und Jacob, C. (2011). Interactions of polysulfanes with components of red blood cells. *Med Chem Comm* 2, 196-200.
- Schopfer, P., Heyno, E., Drepper, F., und Krieger-Liszkay, A. (2008). Naphthoquinone-dependent generation of superoxide radicals by quinone reductase isolated from the plasma membrane of soybean. *Plant Physiol* 147, 864-878.
- Schumacher, J., Kokkelink, L., Huesmann, C., Jimenez-Teja, D., Collado, I.G., Barakat, R., Tudzynski, P., und Tudzynski, B. (2008). The cAMP-Dependent Signaling Pathway and Its Role in Conidial Germination, Growth, and Virulence of the Gray Mold *Botrytis cinerea*. *Mol Plant-Microbe Interact* 21, 1443-1459.
- Schwartz, S.M. (1998). Cell Death and the Caspase Cascade. *Circulation* 97, 227-229.
- Seelig, G.F., Simonsen, R.P., und Meister, A. (1984). Reversible dissociation of γ -glutamylcysteine synthetase into two subunits. *J Biol Chem* 259, 9345-9347.
- Serero, A., Lopes, J., Nicolas, A., und Boiteux, S. (2008). Yeast genes involved in cadmium tolerance: Identification of DNA replication as a target of cadmium toxicity. *DNA Repair* 7, 1262-1275.
- Sharma, K.G., Kaur, R., und Bachhawat, A.K. (2003). The glutathione-mediated detoxification pathway in yeast: an analysis using the red pigment that accumulates in certain adenine biosynthetic mutants of yeasts reveals the involvement of novel genes. *Arch Microbiol* 180, 108-117.

- Shemarova, I.V. (2009). cAMP-dependent signal pathways in unicellular eukaryotes. *Crit Rev Microbiol* 35, 23-42.
- Shimmen, T., and Yokota, E. (1994). Physiological und Biochemical Aspects of Cytoplasmic Streaming. In: International Review of Cytology, W.J. Kwang, und J. Jonathan, (Edit), Academic Press, New York.
- Shimmen, T., und Yokota, E. (2004). Cytoplasmic streaming in plants. *Curr Opin Cell Biol* 16, 68-72.
- Sies, H. (1985). Oxidative stress. Academic Press, New York.
- Singh, R., und Whitesides, G.M. (1993). Thiol-Disulfide Interchange. In Sulphur-Containing Functional Groups, S. Patai, und Z. Rappoport (Edit), John Wiley & Sons, New York.
- Singh, S., Wishnok, J., Keshive, M., Deen, W., und Tannenbaum, S. (1996). The chemistry of the S-nitrosoglutathione/glutathione system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14428-14433.
- Singh, U.P., Pandey, V.N., Wagner, K.G., und Singh, K.P. (1990). Antifungal activity of ajoene, a constituent of garlic (*Allium sativum*). *Can J Bot* 68, 1354-1356.
- Sivaramakrishnan, S., Cummings, A.H., und Gates, K.S. (2010). Protection of a single-cysteine redox switch from oxidative destruction: On the functional role of sulfenyl amide formation in the redox-regulated enzyme PTP1B. *Bioorg Med Chem Lett* 20, 444-447.
- Skatchkov, M.P., Sperling, D., Hink, U., Mulsch, A., Harrison, D.G., Sindermann, I., Meinertz, T., und Munzel, T. (1999). Validation of lucigenin as a chemiluminescent probe to monitor vascular superoxide as well as basal vascular nitric oxide production. *Biochem Biophys Res Commun* 254, 319-324.
- Slusarenko, A.J., Patel, A., und Portz, D. (2008). Control of plant diseases by natural products: Allicin from garlic as a case study. *Eur J Plant Pathol* 121, 313-322.
- Smirnova, Natalya A., Haskew-Layton, Renee E., Basso, M., Hushpulian, Dmitry M., Payappilly, Jimmy B., Speer, Rachel E., Ahn, Y.-H., Rakhman, I., Cole, Philip A., Pinto, John T., *et al.* (2011). Development of Neh2-Luciferase Reporter and Its Application for High Throughput Screening and Real-Time Monitoring of Nrf2 Activators. *Chem Biol* 18, 752-765.
- Sohal, R.S., und Orr, W.C. (2012). The redox stress hypothesis of aging. *Free Radic Biol Med* 52, 539-555.
- Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., und Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 51, 1409-1416.
- Spoto, G., Whitehead, E., Ferraro, A., Di Terlizzi, P.M., Turano, C., und Riva, F. (1991). A reverse-phase HPLC method for cAMP phosphodiesterase activity. *Anal Biochem* 196, 207-210.
- Stennicke, H.R., Jürgensmeier, J.M., Shin, H., Deveraux, Q., Wolf, B.B., Yang, X., Zhou, Q., Ellerby, H.M., Ellerby, L.M., Bredesen, D., *et al.* (1998). Pro-caspase-3 Is a Major Physiologic Target of Caspase-8. *J Biol Chem* 273, 27084-27090.
- Stephen, D.W., und Jamieson, D.J. (1996). Glutathione is an important antioxidant molecule in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 141, 207-212.
- Stephen, D.W.S., Rivers, S.L., und Jamieson, D.J. (1995). The role of the YAP1 and YAP2 genes in the regulation of the adaptive oxidative stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 16, 415-423.
- Steudel, R. (2002). The Chemistry of Organic Polysulfanes R-Sn-R (n > 2). *Chem Rev* 102, 3905-3945.
- Stoll, A., und Seebeck, E. (1951). Chemical investigation of alliin, the specific principle of garlic. *Adv Enzymol* 11, 377-400.
- Straight, A.F., Marshall, W.F., Sedat, J.W., und Murray, A.W. (1997). Mitosis in living budding yeast: anaphase A but no metaphase plate. *Science* 277, 574-578.
- Stubbe, J., Nocera, D.G., Yee, C.S., und Chang, M.C. (2003). Radical initiation in the class I ribonucleotide reductase: long-range proton-coupled electron transfer? *Chem Rev* 103, 2167-2201.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., *et al.* (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-446.

- Szent-Györgyi, A. (1931). On the function of hexauronic acid in the respiration of cabbage leaf. *J Biol Chem* 90, 385-393.
- Tabera, L., Muñoz, R., und Gonzalez, R. (2006). Deletion of BCY1 from the *Saccharomyces cerevisiae* Genome Is Semidominant and Induces Autolytic Phenotypes Suitable for Improvement of Sparkling Wines. *Appl Environ Microbiol* 72, 2351-2358.
- Tada, Y., Spoel, S.H., Pajerowska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C., Zuo, J., und Dong, X. (2008). Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation und thioredoxins. *Science* 321, 952-956.
- Tamanoi, F., Walsh, M., Kataoka, T., und Wigler, M. (1984). A product of yeast RAS2 gene is a guanine nucleotide binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 6924-6928.
- Tanaka, K., Matsumoto, K., und Toh-E, A. (1989). IRA1, an inhibitory regulator of the RAS-cyclic AMP pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 9, 757-768.
- Tao, W., Kurschner, C., und Morgan, J.I. (1997). Modulation of Cell Death in Yeast by the Bcl-2 Family of Proteins. *J Biol Chem* 272, 15547-15552.
- Tatarintsev, A.V., Vrzhet, P.V., Ershov, D.E., Shchegolev, A.A., Turgiev, A.S., Karamov, E.V., Kornilaeva, G.V., Makarova, T.V., Fedorov, N.A., und Varfolomeev, S.D. (1992). The ajoene blockade of integrin-dependent processes in an HIV-infected cell system. *Vestn Ross Akad Med Nauk*, 6-10.
- Thangstad, O.P., Evjen, K., und Bones, A. (1991). Immunogold-EM localization of myrosinase in Brassicaceae. *Protoplasma* 161, 85-93.
- Thevelein, J.M., und De Winde, J.H. (1999). Novel sensing mechanisms und targets for the cAMP–protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* 33, 904-918.
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., Scott, J.D., McMullen, B., Hurwitz, M., Krebs, E.G., und Wigler, M. (1987a). Cloning and characterization of BCY1, a locus encoding a regulatory subunit of the cyclic AMP-dependent protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 7, 1371-1377.
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., und Wigler, M. (1987b). Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell* 50, 277-287.
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., und Wigler, M. (1987c). Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell* 50, 277-287.
- Toda, T., Uno, I., Ishikawa, T., Powers, S., Kataoka, T., Broek, D., Cameron, S., Broach, J., Matsumoto, K., und Wigler, M. (1985). In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase. *Cell* 40, 27-36.
- Todaro, G.J., und Green, H. (1963). Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture und their development into established lines. *J Cell Biol* 17, 299-313.
- Toledano, M.B., Delaunay-Moisan, A., Outten, C.E., und Igbaria, A. (2013). Functions und Cellular Compartmentation of the Thioredoxin und Glutathione Pathways in Yeast. *Antioxid Redox Signal* 18, 1-13.
- Toone, W.M., und Jones, N. (1999). AP-1 transcription factors in yeast. *Curr Opin Gen Develop* 9, 55-61.
- Townsend, D.M., Tew, K.D., und Tapiero, H. (2003). The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother* 57, 145-155.
- Travers, K.J., Patil, C.K., Wodicka, L., Lockhart, D.J., Weissman, J.S., und Walter, P. (2000). Functional und genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response und ER-associated degradation. *Cell* 101, 249-258.
- Trewavas, A. (2004). A critical assessment of organic farming-and-food assertions with particular respect to the UK und the potential environmental benefits of no-till agriculture. *Crop Protect* 23, 757-781.
- Trott, A., West, J.D., Klaic, L., Westerheide, S.D., Silverman, R.B., Morimoto, R.I., und Morano, K.A. (2008). Activation of heat shock und antioxidant responses by the natural product celastrol: transcriptional signatures of a thiol-targeted molecule. *Mol Biol Cell* 19, 1104-1112.

- Tsao, S.M., und Yin, M.-C. (2001). In-vitro antimicrobial activity of four diallyl sulphides occurring naturally in garlic und Chinese leek oils. *J Med Microbiol* 50, 646-649.
- Tu, B.P., und Weissman, J.S. (2004). Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms und consequences. *J Cell Biol* 164, 341-346.
- Tu, Z., und Anders, M.W. (1998). Identification of an important cysteine residue in human glutamate-cysteine ligase catalytic subunit by site-directed mutagenesis. *Biochem J* 336, 675-680.
- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G., und Guilfoyle, T.J. (1997). Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural und highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 9, 1963-1971.
- Vahsen, N., Cande, C., Briere, J.J., Benit, P., Joza, N., Larochette, N., Mastroberardino, P.G., Pequignot, M.O., Casares, N., Lazar, V., *et al.* (2004). AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. *EMBO J* 23, 4679-4689.
- van der Fits, L., Hilliou, F., und Memelink, J. (2001). T-DNA activation tagging as a tool to isolate regulators of a metabolic pathway from a genetically non-tractable plant species. *Transgenic Res* 10, 513-521.
- Van Etten, H.D., Mansfield, J.W., Bailey, J.A., und Farmer, E.E. (1994). Two Classes of Plant Antibiotics: Phytoalexins versus "Phytoanticipins". *Plant Cell* 6, 1191-1192.
- Vandamme, J., Castermans, D., und Thevelein, J.M. (2012). Molecular mechanisms of feedback inhibition of protein kinase A on intracellular cAMP accumulation. *Cell Signal* 24, 1610-1618.
- Vernoux, T., Wilson, R.C., Seeley, K.A., Reichheld, J.P., Muroy, S., Brown, S., Maughan, S.C., Cobbett, C.S., Montagu, M.V., Inzé, D., *et al.* (2000). The ROOT MERISTEMLESS1/CADMIUM SENSITIVE2 gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation und maintenance of cell division during postembryonic root development. *Plant Cell* 12, 97-110.
- Vincent, R.D., Hofmann, T.J., und Zassenhaus, H.P. (1988). Sequence und expression of NUC1, the gene encoding the mitochondrial nuclease in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 16, 3297-3312.
- Voehringer, D.W. (1999). BCL-2 und glutathione: alterations in cellular redox state that regulate apoptosis sensitivity. *Free Radic Biol Med*, 27, 945-950.
- Vogt, K.C. (1842). Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*). Jent & Gassmann, Solothurn.
- Warringer, J., Anevski, D., Liu, B., und Blomberg, A. (2008). Chemogenetic fingerprinting by analysis of cellular growth dynamics. *BMC Chem Biol* 8, 3.
- Waters, C.M., und Bassler, B.L. (2005). QUORUM SENSING: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 319-346.
- Weber, N.D., Andersen, D.O., North, J.A., Murray, B.K., Lawson, L.D., und Hughes, B.G. (1992). In vitro virucidal effects of *Allium sativum* (garlic) extract und compounds. *Planta Med* 58, 417-423.
- Weigel, D., Ahn, J.H., Blázquez, M.A., Borevitz, J.O., Christensen, S.K., Fankhauser, C., Ferrándiz, C., Kardailsky, I., Malancharuvel, E.J., Neff, M.M., *et al.* (2000). Activation tagging in Arabidopsis. *Plant Physiol* 122, 1003-1013.
- Wilfinger, W.W., Mackey, K., und Chomczynski, P. (1997). Effect of pH und ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques* 22, 474-476.
- Willingham, S., Outeiro, T.F., DeVit, M.J., Lindquist, S.L., und Muchowski, P.J. (2003). Yeast genes that enhance the toxicity of a mutant huntingtin fragment or alpha-synuclein. *Science* 302, 1769-1772.
- Wills, E.D. (1956). Enzyme Inhibition by Allicin, the Active Principle of Garlic. *Biochem J* 63, 514-520.
- Wilson, D., Fiori, A., Brucker, K.D., Dijck, P.V., und Stateva, L. (2010). *Candida albicans* Pde1p und Gpa2p comprise a regulatory module mediating agonist-induced cAMP signalling und environmental adaptation. *Fungal Genet Biol* 47, 742-752.
- Wilson, P., und Cutler, R.R. (2004). Antibacterial activity of a new, stable, aqueous extract of allicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Br J Biomed Sci* 61, 71-74.

- Winiarska, K., Szymanski, K., Gorniak, P., Dudziak, M., und Bryla, J. (2009). Hypoglycaemic, antioxidative und nephroprotective effects of taurine in alloxan diabetic rabbits. *Biochimie* 91, 261-270.
- Winterbourn, C.C. (2014). The challenges of using fluorescent probes to detect and quantify specific reactive oxygen species in living cells. *Biochim Biophys Acta* 1840, 730-738.
- Winterbourn, C.C., und Brannen, S.O. (1997). Characterization of the oxidation products of the reaction between reduced glutathione and hypochlorous acid. *Biochem J* 326, 87-92.
- Wisdom, R., Johnson, R.S., und Moore, C. (1999). c-Jun regulates cell cycle progression und apoptosis by distinct mechanisms. *EMBO J* 18, 188-197.
- Wissing, S., Ludovico, P., Herker, E., Büttner, S., Engelhardt, S.M., Decker, T., Link, A., Proksch, A., Rodrigues, F., Corte-Real, M., *et al.* (2004). An AIF orthologue regulates apoptosis in yeast. *J Cell Biol* 166, 969-974.
- Wittinghofer, A., und Waldmann, H. (2000). Ras—A Molecular Switch Involved in Tumor Formation. *Angew Chem Int Edit* 39, 4192-4214.
- Wood, M.J., Storz, G., und Tjandra, N. (2004). Structural basis for redox regulation of Yap1 transcription factor localization. *Nature* 430, 917-921.
- Woodward, A.W., und Bartel, B. (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann Bot* 95, 707-735.
- Wu, A.L., und Moye-Rowley, W.S. (1994). GSH1, which encodes gamma-glutamylcysteine synthetase, is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Mol Cell Biol* 14, 5832-5839.
- Wu, X.-J., Kassie, F., und Mersch-Sundermann, V. (2005). The role of reactive oxygen species (ROS) production on diallyl disulfide (DADS) induced apoptosis and cell cycle arrest in human A549 lung carcinoma cells. *Mutat Res* 579, 115-124.
- Wu, X.-Z., Chang, W.-Q., Cheng, A.-X., Sun, L.-M., und Lou, H.-X. (2010). Plagiochin E, an antifungal active macrocyclic bis(bibenzyl), induced apoptosis in *Candida albicans* through a metacaspase-dependent apoptotic pathway. *Biochim Biophys Acta* 1800, 439-447.
- Wu, X., Guan, Y., Wei, G., und Wang, H.Y. (1990). Theoretical equations for agar-diffusion bioassay. *Ind Eng Chem Res* 29, 1731-1734.
- Yamada, Y., und Azuma, K. (1977). Evaluation of the In Vitro Antifungal Activity of Allicin. *Antimicrob Agents Chemotherap* 11, 743-749.
- Yamasaki, H. (2005). The NO world for plants: achieving balance in an open system. *Plant Cell Environ* 28, 78-84.
- Yan, C., Lee, L.H., und Davis, L.I. (1998). Crm1p mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor. *EMBO J* 17, 7416-7429.
- Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, J., Peng, T.I., Jones, D.P., und Wang, X. (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275, 1129-1132.
- Ye, H., Cande, C., Stephanou, N.C., Jiang, S., Gurbuxani, S., Larochette, N., Daugas, E., Garrido, C., Kroemer, G., und Wu, H. (2002). DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat Struct Biol* 9, 680-684.
- Yin, Q., Park, H.H., Chung, J.Y., Lin, S.C., Lo, Y.C., da Graca, L.S., Jiang, X., und Wu, H. (2006). Caspase-9 holoenzyme is a specific and optimal procaspase-3 processing machine. *Mol Cell* 22, 259-268.
- Yoshida, S., Kasuga, S., Hayashi, N., Ushiroguchi, T., Matsuura, H., und Nakagawa, S. (1987). Antifungal activity of ajoene derived from garlic. *Appl Environ Microbiol* 53, 615-617.
- Yoshida, S., Tamaoki, M., Ioki, M., Ogawa, D., Sato, Y., Aono, M., Kubo, A., Saji, S., Saji, H., Satoh, S., *et al.* (2009). Ethylene and salicylic acid control glutathione biosynthesis in ozone-exposed *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* 136, 284-298.
- Yu, L., Guo, N., Meng, R., Liu, B., Tang, X., Jin, J., Cui, Y., und Deng, X. (2010). Allicin-induced global gene expression profile of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 88, 219-229.

- Yuan, X.-k., Chen, X.-q., Jiang, X.-y., und Nie, Y.-l. (2006). Synthesis, characterization und bioactivity evaluation of diallyl disulfide. *J Cent South Univ Technol* 13, 515-518.
- Yun, D.J., Bressan, R.A., und Hasegawa, P.M. (1997a). Plant Antifungal Proteins. In: *Plant Breeding Reviews*, J. Janick,(Edit.) Wiley, New York.
- Yun, D.J., Zhao, Y., Pardo, J.M., Narasimhan, M.L., Damsz, B., Lee, H., Abad, L.R., D'Urzo, M.P., Hasegawa, P.M., und Bressan, R.A. (1997b). Stress proteins on the yeast cell surface determine resistance to osmotin, a plant antifungal protein. *Proc Nat Acad Sci U S A* 94, 7082-7087.
- Zaffagnini, M., Bedhomme, M., Marchand, C.H., Morisse, S., Trost, P., und Lemaire, S.D. (2012). Redox Regulation in Photosynthetic Organisms: Focus on Glutathionylation. *Antioxid Redox Sign* 16, 587-586.
- Zhang, D.D., Lo, S.-C., Cross, J.V., Templeton, D.J., und Hannink, M. (2004). Keap1 Is a Redox-Regulated Substrate Adaptor Protein for a Cul3-Dependent Ubiquitin Ligase Complex. *Mol Cell Biol* 24, 10941-10953.
- Zhang, W., Ha, M., Gong, Y., Xu, Y., Dong, N., und Yuan, Y. (2010). Allicin induces apoptosis in gastric cancer cells through activation of both extrinsic und intrinsic pathways. *Oncol Rep* 24, 1585-1592.
- Zheng, M., Aslund, F., und Storz, G. (1998). Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science* 279, 1718-1721.
- Zou, H., Li, Y., Liu, X., und Wang, X. (1999). An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 274, 11549-11556.

6 Danksagung

Leider läßt sich eine wahrhafte Dankbarkeit mit Worten nicht ausdrücken.

(J.W. v. Goethe)

Wenn ich auf diese Arbeit als „Produkt“ und die Zeit ihrer Entstehung blicke, fällt mir vor allem „Dankbarkeit“ ein, aber auch Freude, die es gemacht hat.

Danken möchte ich zunächst und besonders Herrn Prof. Alan Slusarenko, vor allem dafür, mir die Möglichkeit zu geben, an diesem faszinierenden Thema zu arbeiten und mir so viele Freiheiten zu lassen, neue Ideen auszuprobieren, andere Richtungen einzuschlagen und sie auch mitzugehen, für Vertrauen und unendlich viele Ideen.

Herrn Prof. Dr. Lothar Rink danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und sein Interesse für das Thema Allicin, für anregende Diskussionen, so dass uns das Feld der Säugetierzellen zugänglich war.

Herrn PD Dr. Nikolaus Schlaich danke ich ebenso für viele Gespräche und für die Vielzahl wirklich guter Ideen, für viel konstruktive Kritik, aber auch für Lob und Anerkennung.

Besonderer Dank geht an Frau Ulrike Noll, die mir mit teils aufmunternden, teils ermahnenden Worten immer wieder weitergeholfen hat, mit wachen Blick auf Labor und Leute mich auf vieles aufmerksam machte, das ich anders nicht wahrgenommen hätte. Ich kann sagen, dass die vergangenen Jahre für mich eine „Schule für’s Leben“ waren, von der ich sehr profitiert habe. Natürlich auch herzlichen Dank für die Hilfe bei vielen Experimenten und besonders für das Korrekturlesen der Arbeit, wenn ich wieder halbe Sätze produziert habe. Für all das: Danke!

Die Zusammenarbeit mit Menschen hat diese Zeit und mich selbst auch geprägt:

Meinen Mit-Doktoranden in der gemeinsamen Arbeitsgruppe Slusarenko/Schlaich danke ich herzlich für Diskussionen, Unterstützung und das gute Miteinander: Ifeanyi Nwachukwu für drei sehr spannende Jahre hier, Dr. Alexandra Thoenessen, Dr. Jan Wunderle, Frank Albrecht und Jan Borlinghaus.

Jetzt kommt eine lange Liste von Bachelor-, Master-, und Diplomstudenten. Ich hatte die Freude, Euch in Euren Projekten zu begleiten und es hat mir wirklich Spaß und Freude gemacht. Zu jedem einzelnen von Euch könnte ich etwas schreiben, das aber würde den Rahmen sprengen. Wenn ihr also Euren Namen hier lest, seid Euch meines Dankes bewußt. So danke ich für die Zeit im Bachelor Jan Behr, Christopher Mertes, Ivan Schlembach, Florian Schmidt, Niklas Steffens, Markus Kamps, Peter Gollwitzer und den drei „aktuellen“ Bachelor-Studenten Elisabeth Wosnitza, Andreas Uebachs und Christian Kirsch, für die Zeit als Forschungspraktikanten Miriam Schreiber, Gordon Cameron, Ivan Schlembach und Markus Kamps. Auch einige Masterarbeiten sind entstanden und es war eine Freude, mit Euch, Miriam

Schreiber, Gordon Cameron, Markus Nöllen und Christopher Mertes, die Themen zu bearbeiten, wie auch mit den Diplomanden Frank Albrecht, Manuel Petersen und Claudia Hambloch.

Auch die Mitglieder der Arbeitsgruppe Rauschen (Dr. Stefan Rauschen, Dr. Eva Schultheis, Dr. Mechthild Schuppener) möchte ich nicht unerwähnt lassen; viele Diskussionen und Kaffeerunden haben interessante Aspekte hervorgebracht.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Biologie III danke ich für Hilfe bei verschiedenen Fragen, manches nette Wort und eine gute Zeit.

Herzlichen Dank auch Herrn Prof. Frederic Batteux, Frau Dr. Carole Nicolle, Institut für Immunologie, Universität Paris V, Herrn Dr. Awais Anwar, University of Eastern Anglia, Norwich für viele chemische Tricks und Kniffe, insbesondere bei der Allicin-Synthese, Herrn PD Dr. Hajo Haase, Institut für Immunologie, UK Aachen sowie Herrn Prof. Dr. Claus Jacob und Herrn Dr. Torsten Burkholz, Universität des Saarlandes für regen Austausch und fruchtbare Zusammenarbeit.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Gruhlke, Martin Clemens Horst

Adresse Röher Hütte 16
52249 Eschweiler
Tel.: (0 24 03) 2 60 70
Dienstlich: (0241) 80-26668
E-Mail: Martin.Gruhlke@rwth-aachen.de

Geburtsdatum 10. Juni 1983

Geburtsort Heidelberg

Familienstand Ledig, keine Kinder

Nationalität Deutsch

Konfession Römisch-katholisch

Ausbildung

September 1989 – Juni 1993 Katholische Grundschule, Eschweiler-Röhe

September 1993 – Juni 2002 Heilig-Geist Gymnasium, Würselen-Broichweiden

Oktober 2002 – September 2009 Studium der Biologie (Diplom), Hauptfach: Pflanzenphysiologie & Biochemie, Nebenfächer: Phytopathologie, Botanik, Umweltschutz & Umwelthygiene. Note: Sehr gut

April 2005 Vordiplom Biologie

Januar 2009 – September 2009 – Diplomarbeit, Institut III für Biologie, Thema: „Untersuchung der Redoxwirkung des im Knoblauchsaff vorkommenden Allicins“. Note: Sehr gut.

Oktober 2009- April 2013 Promotionsprojekt: Untersuchungen zu zellulären Effekten von Allicin, einem physiologisch aktiven Vertreter Reaktiver Schwefelspezies, aus Knoblauch (*Allium sativum* L.), in verschiedenen biologischen Systemen.

Tätigkeiten

Oktober 2009 - Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biologie III (Pflanzenphysiologie), RWTH Aachen

Februar 2006 Studentische Hilfskraft am Institut für Biologie III und (Pflanzenphysiologie), RWTH Aachen

Februar 2007

April 2004 –

Juni 2004 Studentische Hilfskraft am Institut I für Biologie (Botanik), RWTH Aachen
Und August 2004

Publikationen:

Teile der folgenden Publikationen sind in diese Dissertation eingeflossen:

1. Gruhlke, M.C.H., Portz, D., Stitz, M., Anwar, A., Schneider, T., Jacobm C., Schlaich, N.L. and Slusarenko, A.J. (2010) **Allicin disrupts the cell's electrochemical potential and induces apoptosis in yeast**. Free Radical Biology and Medicine. 49, 1916-1924
2. Doering, M., Diesel, B., Gruhlke, M.C.H., Viswanathan, U. M., Burkholz, T., Slusarenko, A.J., Kiemer, A.K., Jacob, Claus (2012) **Selenium and Tellurium Containing Redox Modulators With Cytotoxicity Against Macrophages: Possible Implications For The Treatment of Inflammatory Diseases** Tetrahedron 68: 10577-10585

Weitere Publikationen, die nicht in diese Arbeit eingeflossen sind:

1. Haase, H., Hieke, N., Plum, L.M., Slusarenko, A.J., Gruhlke, M.C.H., Rink, L (2012) **Impact of Allicin on Macrophage Activity**. Food Chemistry 134: 141-148
2. Perello, A. E., Gruhlke, M.C.H., Slusarenko, A.J. (2013) **Effect of Garlic Juice on Seed-borne Fungi of Wheat: Seed Germination, Seedling Health and Vigour** *submitted*

Reviews.

1. M.C. Gruhlke, I. Nwachukwu, M. Arbach, A. Anwar, U. Noll, A.J. Slusarenko, **Allicin from Garlic, Effective in Controlling Several Plant Diseases, is a Reactive Sulfur Species (RSS) that Pushes Cells into Apoptosis**, *Proceedings of the 16th International Reinhardsbrunn Symposium, "Modern Fungicides and Antifungal Compounds VI"* (2011)
2. M.C. Gruhlke, D. Portz, A.J. Slusarenko, **A Putative Pathway of Apoptosis-Induction by Allicin from Garlic (*Allium sativum* L.)**, *Proceedings of the 16th International Reinhardsbrunn Symposium, "Modern Fungicides and Antifungal Compounds VI"* (2011)
3. Nwachukwu, I.D., Slusarenko, A.J., Gruhlke, M.C.H., (2012) **Sulfur and Sulfur Compounds in Plant Defense**. Natural Compound Communications. 7:1-6
4. M.C. Gruhlke and A.J. Slusarenko **The Biology of Reactive Sulfur Species**. Plant Physiology and Biochemistry, 59: 98-107

Buchkapitel

1. M.C. Gruhlke and A.J. Slusarenko (2012) The Thiol-Stat as Emerging Target of Secondary Metabolites. *In press*

Abstracts

1. Gruhlke, M.C. and Slusarenko, A.J. (2011) **Glutathione Mediates Protein-Kinase A dependent Fungal Apoptosis Induced by the Phytoanticipin Allicin From Garlic.** Journal of Plant Diseases and Protection. 118: 226
2. Schreiber, M.; Thönnessen, A., Gruhlke, M.C., Meyer, A.J., Slusarenko, A.J. (2011) **In vivo monitoring of the cellular redox state using a redox sensitive GFP during plant-pathogen and plant-herbivore interaction.** Journal of Plant Diseases and Protection. 118: 232
3. Slusarenko, AJ; Gruhlke, M.C.H (2012) **Physiological effects of the Reactive Sulphur Species (RSS) Allicin from Garlic.** Free Radicals in Biology and Medicine, 53 Suppl. 1, S159-160.

Posterbeiträge auf internationalen Kongressen

1. Heidrich, S., Langen, B., Gruhlke, M., Schervan, T., Derz, U., Nölke, D. (2005) **Design Of A Mars Habitat By An Interdisciplinary Working Group-Basic Concepts For Structure And Life Support System.** 56th International Astronautical Congress, Fukuoka, Japan.
2. Gruhlke, M., Langen, B., Nölke, D. (2006) **Design of a mars habitat by an interdisciplinary working group – basic concepts for a life support system.** 57th International Astronautical Congress, Valencia, Spanien (Finanziell unterstützt durch die Europäische Raumfahrtagentur ESA)
3. Bogdahn, I., Gruhlke, M., Langen, B. (2007) **Metabolite recycling in a closed biological life support system: systemic refinements and acquisition of radioresistance of its key agent *Spirulina plantensis*.** 58th International Astronautical Congress, Hyderabad, Indien
4. Ifeanyi Nwachukwu, Martin Gruhlke, Miriam Arbach and Alan Slusarenko (2010) **Allicin from garlic: nature's "magic" bullet against pathogenic microbes.** 3rd international symposium "Crossroads in Biology" Cologne, Germany.
5. MPMI
6. Gruhlke, M.C.H., Slusarenko, A.J. (2011) **The Defence Substance Allicin Disrupts The Cell's Electrochemical Potential And Induces Apoptosis.** International Symposium "Communication in Plants and their Responses to the Environment. 19-22. Mai, Halle (Saale) Germany.
7. Gruhlke, M.C.H., Mertes, C., Schreiber, M., Wunderle, J., Noll, U., Slusarenko, A.J (2011) **Allicin from Garlic, a Prooxidant Natural Product with Several Cellular Effects.** 10th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen-Species in Plants. 5-8. Juli, Budapest, Ungarn.
8. Schreiber, M., Thönnessen, A., Gruhlke, M.C.H., Meyer, A., Slusarenko, A.J. (2011) **In vivo monitoring of cellular redox potential in *Arabidopsis* during host-pathogen and herbivore interactions using redox-sensitive Green Fluorescent Protein (roGFP).** 10th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen-Species in Plants. 5-8. Juli, Budapest, Ungarn.

9. Martin C. H. Gruhlke, Ulrike Noll, Nikolaus L. Schlaich, Alan J. Slusarenko (2012) **Protein-Kinase A is a Central Regulator of Allicin-Induced Cell Death in *Saccharomyces cerevisiae***. 9th International Congress on Yeast Apoptosis. 16.-20.September 2012, Rom, Italien.

7 Anhang

7.1 Ergänzungen zur Einleitung

7.1.1 Cystein-Metallkomplexe als Redoxtargets: Metall-Nanoswitches von Zink und Eisen.

Die Metallbindeaktivität von Cysteingruppen spielt in zinkhaltigen Proteinen (z.B. Zink-Finger-Proteine, die DNA zu binden in der Lage sind und somit häufig als Transkriptionsfaktoren fungieren) eine Rolle. Die s.g. Thiolat-Zink(II)-Brücke kann angesehen werden als eine Substitution der Disulfidbrücke, ist somit also unter den reduzierenden Bedingungen des Cytoplasmas nur schwer zu etablieren und bedarf deshalb einer enzymatischen Katalyse für die Ausbildung dieser Strukturen (Kröncke und Klotz, 2009). Wie bedeutsam die Komplexierung von Zink ist, wird deutlich durch den Umstand, dass üblicherweise Zink in eukaryoten Zellen in einem Konzentrationsbereich von etwa 200 μM vorliegt, die Konzentration an „freiem“ (d.h. nicht gebundenem) Zink unter normalen physiologischen, d.h. nicht gestressten Bedingungen, im piko- bis niedrigen nanomolaren Bereich vorliegt (Krezel und Maret, 2006; Palmiter und Findley, 1995). Verschiedentlich wurde gezeigt, dass die Gabe von Oxidantien zu Zellen zu einem raschen Anstieg des freien intrazellulären Zinkgehaltes führt (Kröncke, 2007), so dass Zink aus der Proteinbindung unter oxidativen Bedingungen freigesetzt wird. So führt beispielsweise eine Behandlung mit Diamid, das Thiole oxidiert, zu einer starken und schnellen transienten Freisetzung von Zink aus seinen Komplexen (Pirev et al., 2008).

Eine weitere Form von bedeutenden Cystein-vermittelten Enzymkofaktoren, die eine Rolle spielen für die Funktionalität von Enzymen, sind s.g. Eisen-Schwefel Cluster (*Iron-Sulfur-Cluster*) (Lill und Mühlenhoff, 2006). In diesen Strukturen sind 2-4 Eisenatome durch Cystein bzw. gemeinsam durch Cystein-Histidin-Reste komplexiert; für die Synthese sind Glutathion und Glutaredoxine bedeutsam (Lill und Mühlenhoff, 2006; Rouhier et al., 2008), so dass die Biogenese der Iron Sulfur Cluster vom Redoxzustand des Glutathions abhängt.

7.1.2 Aufoxidation des Disulfids zu höheren Oxidationsstufen

Neben der Ausbildung von Disulfidbrücken sind Cysteingruppen in der Lage, eine Vielzahl weiterer Oxidationszustände einzunehmen. Dabei ist zu unterscheiden zwischen Oxidationszuständen, in die zwei Cysteingruppen involviert sind („Aufoxidierung“ des Disulfids) und denen, die nur einen einzelnen Cysteinrest modifizieren. Diese Redoxzustände des Schwefels sind auch für die Betrachtung der reaktiven Schwefelspezies (siehe Kapitel 1.1.6.1) von großer Bedeutung.

Eine Oxidation eines einzelnen Thiols, beispielsweise durch Einwirkung von ROS, führt zu verschiedenen Oxidationsstufen, beginnend bei der Sulfensäure (R-SOH), über Sulfinsäure ($\text{R-SO}_2\text{H}$), über Sulfonsäure ($\text{R-SO}_3\text{H}$), bis hin zur Sulfoninsäure ($\text{R-SO}_2\text{SO}_2\text{H}$).

SO₂H) hin zur Sulfonsäure (R-SO₃H); während die Sulfensäure von Cysteinresten leicht durch Thioredoxine reduziert wird, können Sulfinsäuren durch Sulfiredoxine reduziert werden (Biteau et al., 2003; Jacob et al., 2006); der Mechanismus der Sulfinsäurereduktion ist vornehmlich für die Regeneration von Peroxiredoxinen von zentraler Bedeutung (Jönsson und Lowther, 2007). Im Gegensatz dazu ist nach gegenwärtigem Kenntnisstand die Bildung von Sulfonsäuren irreversibel (Gruhlke und Slusarenko, 2012).

Auch eine höhere Oxidation von Disulfiden ist denkbar. Wie bereits angesprochen, sind für die Reduktion von Disulfiden (sowohl intra- wie intermolekular) Thioredoxine bzw. Glutaredoxine bedeutsam. Durch Einwirkung von ROS entstehen als höhere Oxidationsprodukte des Disulfids Disulfid-S-monoxid bzw. Disulfid-S-dioxid¹.

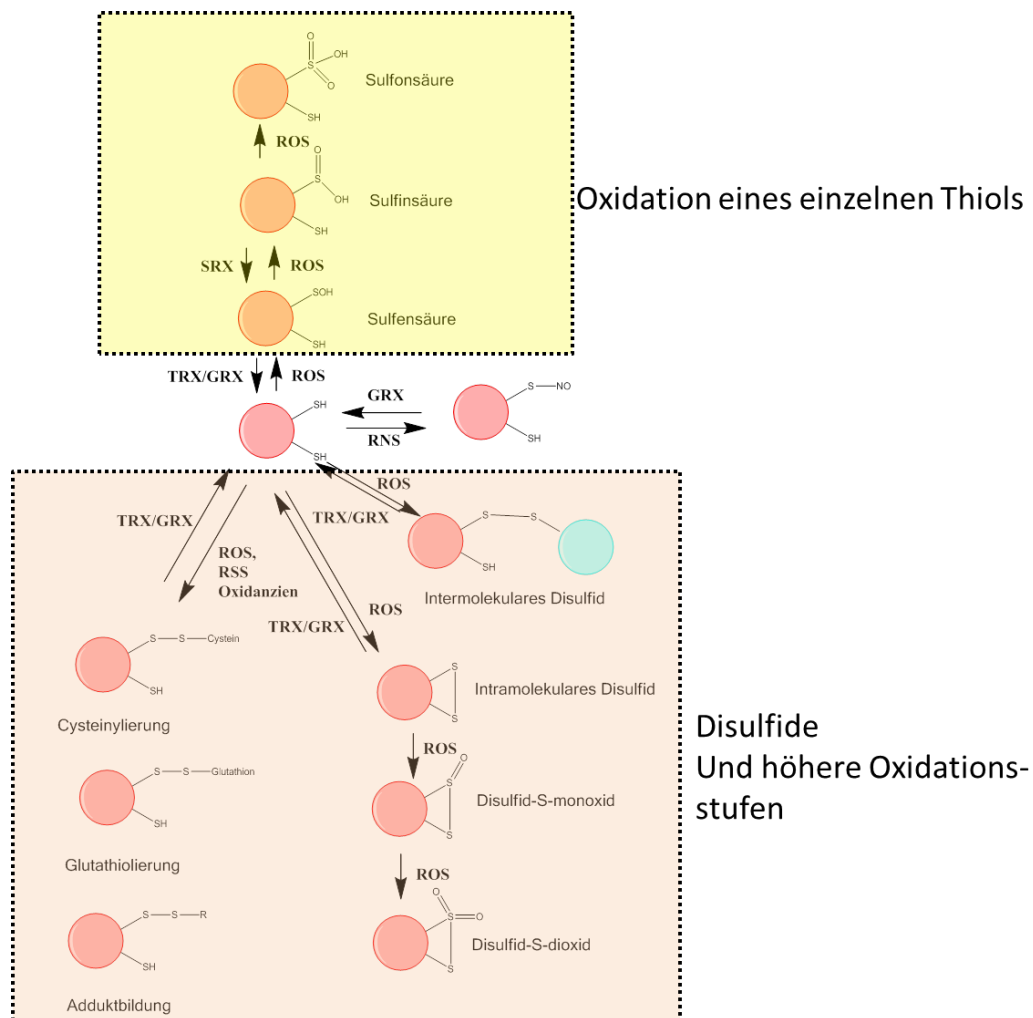


Abbildung 66: Oxidationsprodukte der Oxidation von Proteinthiolen.

Ausgehend von Proteinthiolen, sind Oxidationen denkbar, die entweder ein- oder zwei Thiole mit einbeziehen. Ein einzelnes Thiol (oberer, gelber Kasten) wird oxidiert zu Sulfensäure; dieser Prozess ist reversibel durch das Thioredoxin- bzw. Glutaredoxinsystem. Eine weitere Oxidation zur Sulfinsäure ist reversibel durch das Sulfiredoxinsystem. Die maximale Oxidation zur Sulfonsäure ist

¹ Zwar entsprechen diese Komponenten hinsichtlich der Summenformel von Struktur Thiosulfonaten bzw. Thiosulfonaten, allerdings sind diese Verbindungen durch Oxidation des Disulfids entstanden und nicht durch Kondensation von zwei Sulfensäuremolekülen (was zur Bildung eines Thiosulfonates führt) bzw. eines Sulfensäure- und eines Sulfinsäuremoleküls, was zur Bildung eines Thiosulfonates führt.

nicht reversibel.

Verschiedene Oxidationsprodukte sind bei den Disulfiden zu finden. Neben den Mischdisulfiden, wozu die Bildung von Protein- Glutathion bzw. Protein-Cysteinmischdisulfiden zählt, ist eine Erhöhung der Oxidationsstufe von intramolekularen Disulfiden zu Disulfid-S-monoxid bzw. Disulfid-S-dioxid möglich, die wiederum die Struktur und damit Funktion von Proteinen beeinflussen können.

Wird in die Oxidationsreaktion lediglich ein einzelnes Thiol mit einbezogen, entstehen verschiedene Oxidationsstufen (Sulfensäure, Sulfinssäure und Sulfonsäure), wobei Sulfinssäure durch Sulfiredoxine, Sulfensäure durch Thioiredoxine oder Glutaredoxine reduziert wird (Michelet et al., 2006).

7.1.3 Geschichte der Entdeckung des Glutathions und Abwandlungen des Glutathions in verschiedenen Organismen.

Glutathion ist hinsichtlich seiner Konzentration die bedeutendste nicht-proteingebundene Thiolkomponente der Zelle. Dabei hat Glutathion in der Zelle eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionen; so dient Glutathion als Cosubstrat für Glutathion-S-transferasen (GSTs) und ist in diesem Zusammenhang bei der Detoxifizierung von Xenobiotika von Bedeutung. Ferner ist Glutathion in der Redoxregulation, entweder als Elektronendonator für Glutaredoxine oder durch direkte Reaktion mit den Oxidantien.

Glutathion ist ein Tripeptid bestehend aus den Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin. Erstmalig beschrieben wurde Glutathion 1921 als eine autooxidierbare, glutaminsäure- und cysteinhaltige Substanz (Hopkins, 1921), wobei die endgültige Zusammensetzung einige Jahre später geklärt wurde (Hopkins, 1929). Obwohl die Struktur des Glutathions geklärt war, war über die Funktion wenig bekannt; in Kohlgewebe berichtete Albert Szent-Györgyi, dass das Gewebe in der Lage ist, oxidiertes Vitamin C (Dehydroascorbat) zu reduzieren, wobei es gleichzeitig zu einer Oxidation von Glutathion kommt (Szent-Györgyi, 1931).

Auffällig beim Glutathion ist der Umstand, dass die Verbindung des Glutamats zum Cystein nicht über die α -Carboxygruppe (was für Peptidbindungen typisch ist), sondern über die γ -Carboxygruppe mit Cystein verbunden ist. Weil die Bindung nicht dem typischen kanonischen Aufbau einer Peptidbindung entspricht, kann diese Bindung als ein Pseudopeptid bezeichnet werden; Glutathion wird daher gelegentlich als **Pseudotripeptid** benannt (Rouhier et al., 2008). Es wird angenommen, dass diese veränderte Bindung zur Stabilität des Moleküls beiträgt, indem es nur den Abbau über spezifische Aminosäuretransferasen erlaubt (Noctor et al., 2011).

Glutathion wird in den meisten Organismen gefunden (*ibd.*), allerdings kann in manchen Organismen Glutathion ersetzt oder ergänzt werden durch andere thiolhaltige Redoxpuffer, so durch Thiosulfate in Halobakterien (Newton und Javor, 1985). In einigen grampositiven Bakterien, insbesondere der Gattung *Bacillus* findet sich ein Cystein-Glycosid (eine Verbindung aus L-cysteinyl-D-glucosamin und Maleinsäure), das in diesen Organismen die Funktion von Glutathion ersetzen kann (Newton et al., 2009). In einigen parasitischen Trypanosomenarten

kommt eine Modifikation des Glutathions vor, die **Trypanothion** (N,N-Bis(glutathionyl)-spermidin) genannt wird (Fairlamb et al., 1985).

In Pflanzen gibt es verschiedene Abwandlungen des Glutathions, so in Vertretern der *Poaceae*, wozu auch bedeutende Agrarpflanzen wie Weizen, Mais oder Gerste gehören, bei dem das endständige Glycin des Glutathions durch Serin ersetzt ist (γ -Glutamylcysteinserine) (Klapheck, 1992). In der Familie der *Leguminaceae* wiederum wird neben Glutathion **Homogluthation** (γ -Glutamylcystein- β -Alanin) gefunden, das aber von unterschiedlichen Genprodukten als denen der Glutathionbiosynthese produziert wird (Klapheck, 1988; MacNicol, 1987). In der Modellpflanze *Arabidopsis* ist bislang kein Derivat des Glutathions gefunden worden (Noctor et al., 2011).

7.1.4 Details zur Biosynthese des Allicins in Knoblauch

Allicin entsteht aus einer biologisch inerten Vorstufe, der nichtproteinogenen Aminosäure Alliin, dessen Struktur 1951 aufgeklärt worden ist (Stoll und Seebeck, 1951) und sich von der Aminosäure Cystein ableitet. Als Biosynthese-Wege des Alliins werden ein, von der Aminosäure Serin ausgehender sowie ein auf Glutathion beruhender Biosyntheseweg postuliert (Granroth, 1970; Lancaster und Shaw, 1989). Dabei ist die Herkunft der Allylgruppe bis heute ungeklärt.

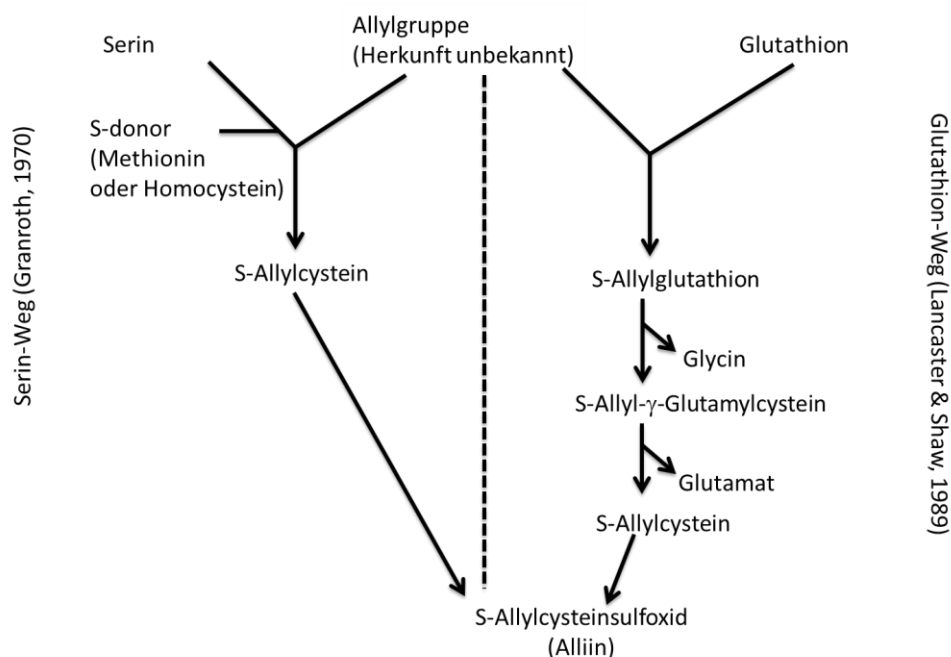


Abbildung 67: Postulierte Biosynthesemechanismen des Allicins

Für die Biosynthese des Alliins werden zwei unterschiedliche Biosynthese-Wege vorgeschlagen; einer beginnend mit Serin (Granroth, 1970), das über Reaktion mit einem Schwefeldonor (Homocystein oder Methionin) unter Reaktion mit einer Allylgruppe unbekannter Genese zu Allylcystein reagiert, das in einem nächsten Schritt zu S-Allylcysteinsulfoxid (Alliin) oxidiert wird.

Der zweite, von Lancaster und Shaw (1989) postulierte Biosyntheseweg geht von einer Reaktion der Allylgruppe mit Glutathion aus – es entsteht S-Allylglutathion, von dem in einem zweiten Schritt zuerst Glycin, dann Glutamat abgespalten werden, sodass S-Allylcystein entsteht, das ebenfalls zu S-

Allylcysteinsulfoxid oxidiert wird (Abbildung verändert nach (Jones et al., 2007)).

Das Substrat Alliin reagiert in einer enzymkatalysierten Reaktion unter Abspaltung von Dehydroalanin zu Allylsulfensäure, die in einem zweiten Schritt spontan zu Allicin kondensiert; das die Reaktion katalysierende Enzym heißt Alliinase (=Alliin-Lyase; E.C. 4.4.1.4) Weil es sich dabei um eine Kondensationsreaktion handelt (und somit um die Bildung eines Anhydrids aus zwei Sulfensäuremolekülen (Kice et al., 1969)) und nicht um eine Oxidation des Disulfids, spricht man von Diallylthiosulfinat. Dabei wird angenommen, dass Substrat und Enzym subzellulär räumlich voneinander getrennt sind – während Alliin im Cytoplasma vorliegt, dürfte die Alliinase vakuolär lokalisiert sein, was für Zwiebel (*Allium cepa* L.) gezeigt worden ist (Lancaster und Collin, 1981). Zweifelsfrei gezeigt ist jedoch eine Kompartimentierung auf Gewebeebene – während in Mesophyllzellen nur wenig Alliinase (gezeigt durch Immunofärbung) zu finden ist, ist ein starkes Signal in Bündelscheidezellen des Phloems zu finden (Ellmore und Feldberg, 1994) – was in ähnlicher Weise auch für die Lokalisierung der Myrosinase in *Brassicaceae* gilt (Thangstad et al., 1991).

7.1.5 Einige Anmerkungen zu Abbauprodukten des Allicins

Allicin zeigt eine hohe Reaktivität, nicht nur gegenüber Thioispezies (Block, 1992). Eine große Anzahl von Abbauprodukten entsteht aus Allicin, abhängig von den jeweiligen Bedingungen, die ihrerseits eine Vielzahl physiologischer Aktivitäten zeigen, die teils zu denen des Allicins redundant, teils aber auch völlig unterschiedlich sind (Jacob und Anwar, 2008). Eine zentrale Bedeutung für die Abbauprodukte des Allicins spielt die als Intermediat der Allicinbiosynthese bereits erwähnte Allylsulfensäure, die in wässrigem Milieu durch Hydrolyse spontan (als Rückreaktion der Kondensationsreaktion zum Allicin) entsteht. Dabei ist zu bedenken, dass Allylsulfensäure sowohl als Oxidations- wie als Reduktionsmittel wirkt (Giles und Jacob, 2002). Einerseits ist Allylsulfensäure in der Lage, Thiole zu Disulfiden zu oxidieren (vgl. die Reaktion von Allylsulfensäure mit Allicin), in Abhängigkeit von der Umgebung können Sulfensäuren im Allgemeinen aber sowohl nucleophile- wie elektrophile Eigenschaften haben (Allison, 1976). Dieser Umstand dürfte auch die zentrale Bedeutung von Allylsulfensäure für die Entstehung biologisch bedeutender Allicin-Abbauprodukte erklären.

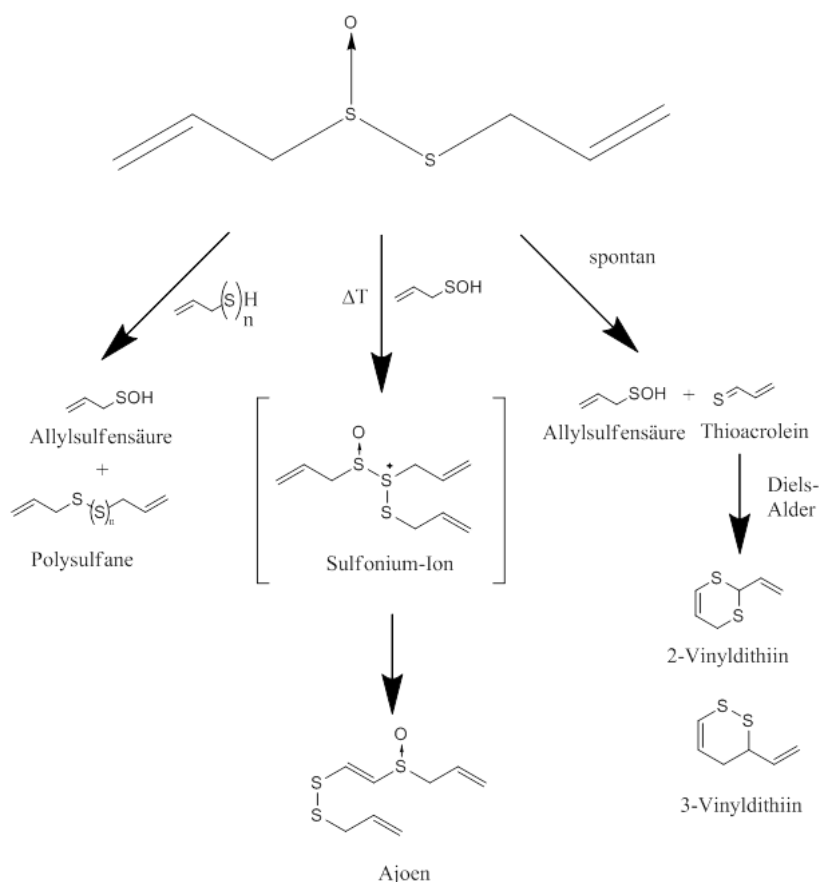


Abbildung 68: Schematische Übersicht über die bedeutendsten Abbauprodukte des Allicins

Bei der Biosynthese von Diallylpolsulfanen (mit unterschiedlich langer Schwefelkette) reagiert Allicin mit 1-Allylsulfanen, die als Reaktionsprodukte von Thiolen mit Allicin entstehen. Aus der Reaktion solcher 1-Allylsulfane mit Allicin entsteht ein Polysulfan und Allylsulfensäure; im einfachsten Fall ist das Allylsulfan Allylmercaptan und führt bei der Reaktion mit Allicin zur Bildung von Diallyldisulfid (DADS).

Ein weiteres bedeutendes, biologisch aktives Molekül ist Ajoen, das bei hohen Temperaturen durch die Reaktion von Allicin mit Allylsulfensäure über ein Sulfonium-Ion als Intermediat entsteht.

Zerfällt Allicin spontan zu Allylsulfensäure und Thioacrolein, kann in einem zweiten Schritt das hochreaktive Thioacrolein in einem Diels-Alder-Mechanismus, bei dem Thioacrolein sowohl als Dien wie auch als Dienophil fungiert, zu Vinyldithiinen (2- bzw. 3-Vinyldithiin) reagieren.

Die Gruppe der Diallylpolsulfane² gehört, neben Allicin, zu den am besten erforschten Metaboliten des Knoblauchs. Generell werden Polysulfane als Substanzen definiert, die die chemische Formel RS_xR aufweisen, wobei $x > 3$ und $R \neq H$ (Schneider et al., 2011).

Auch Polysulfane zeigen, wie Allicin eine breite, antimikrobielle Aktivität, wobei die Aktivität mit zunehmender Kettenlänge des Schwefels ansteigt; so ist generell Diallyldisulfid (DADS)

² Diallylpolsulfane werden in der Literatur gelegentlich als auch „Polysulfide“ bezeichnet, wobei der Name Polysulfane als Reaktionsprodukt von Sulfanen (also vom H_2S abgeleiteten Verbindungen) richtiger ist als Sulfide (beispielsweise Na_2S), wodurch sich der Name Polysulfane in den letzten Jahren zunehmend durchsetzt.

weniger antimikrobiell aktiv als es Diallyltetrasulfid (DATTS) (Inouye et al., 2001; O'Gara et al., 2000; Tsao und Yin, 2001) ist.

Dabei zeigt sich, dass offenbar die Induktion von oxidativem Stress indirekt durch die Bildung Reaktiver Sauerstoffspezies geschieht (Lemar et al., 2007). Ein vorgeschlagener Mechanismus dabei ist, dass Perthiole ($R-(S)_nSH$) als Abbauprodukte von Polysulfanen durch die Reaktion mit O_2 oder mit Porphyringruppen (z.B. des Hämoglobins) zur Bildung von Superoxid (O_2^-) führen können (Chatterji et al., 2005; Munday et al., 2003).

Auf diese Eigenschaft wird auch die Wirksamkeit gegenüber Krebszellen zurückgeführt, die in einer Anzahl von Studien in verschiedenen Systemen belegt worden ist; auch hier scheint zu gelten, dass die Anzahl der Schwefelatome im Polysulfid (Busch et al., 2010; Jacob et al., 2011; Montenarh und Saidu, 2012; Münchberg et al., 2007; Schneider et al., 2011; Steudel, 2002), wenngleich auch ROS unabhängige Mechanismen der Polysulfan-Toxizität beschrieben sind (Kelkel et al., 2012). Die Akkumulation von ROS kann jedoch, wie im Falle von Allicin beschrieben, in Humanzellen das NRF2/ARE-System induzieren (Saidu et al., 2013).

Eine weitere bedeutende Funktion von Polysulfanen ist ihre Fähigkeit, Blutgefäße zu erweitern und somit blutdrucksenkend zu wirken, wobei dabei offenbar die Eigenschaft, dass Polysulfane zu H_2S metabolisiert werden, von großer Wichtigkeit ist (Benavides et al., 2007).

Biologisch ebenfalls von mannigfaltiger Funktion ist das Allicin-Abbauprodukt Ajoen; der Name als auch Aussprache des Wortes ($/\text{'a:hoo.i:n}$) rührt vom spanischen Wort für Knoblauch (ajo) her; erstmalig beschrieben wurde Ajoen 1984 (Block et al., 1984). Die Reaktion zum Ajoen läuft vornehmlich bei erhöhten Temperaturen unter lipophilen Bedingungen ab (*ibid*). Die biologischen Eigenschaften des Ajoens machen es für medizinische Anwendungen interessant; so wirkt Ajoen antithrombotisch (bereits 1983 beschrieben, wobei die Wirkung damals einer unbekannten Substanz zugeordnet wurde, die 1984 durch Block *et al.* zweifelsfrei als Ajoen identifiziert werden konnte) (Apitz-Castro et al., 1983), wobei Daten nahelegen, dass eine Gabe von 20 mg/kg Körpergewicht bei Kaninchen eine vollständige Unterdrückung der Collagen-induzierten Blutplättchenaggregation für eine Periode von 24 h nach Fütterung (Block et al., 1984). Neben vielfältigen antiviralen Eigenschaften (Tatarintsev et al., 1992; Weber et al., 1992) wirkt Ajoen antimikrobiell gegen verschiedene Pilze (Singh et al., 1990; Yoshida et al., 1987) und Bakterien (Naganawa et al., 1996), wobei Ajoen auch auf Genexpression in Bakterien einwirkt, die durch das s.g. *quorum sensing* (ein Mechanismus, der es Einzellern erlaubt, mittels sekretierter chemischer Substanzen auf die Zellzahl in der Population zu schließen und so Zellteilung und physiologischen Status [beispielsweise in Biofilmen] zu regulieren (Waters und Bassler, 2005) reguliert werden, so dass eine weitere Teilung der Bakterien unterbleibt (Jakobsen et al., 2012).

Die dritte bedeutende Substanzklasse biologisch aktiver Abbauprodukte des Allicins sind die Vinyl-dithiine, die durch eine Reaktion von Allylsulfensäure und Thioacrolein in einem Diels-Alder-Mechanismus miteinander reagieren. Ähnlich wie Ajoen wirken auch die Vinyl-dithiine auf die ADP-abhängige Aggregation von Blutplättchen (Rahman und Billington, 2000). Eine

detaillierte Studie zu antimikrobieller Aktivität von Vinyldithiinen scheint bislang nicht erfolgt zu sein.

7.1.6 Detaillierte Diskussion der Chemie Reaktiver Schwefelspezies (RSS)

Bei der Betrachtung sind große Ähnlichkeiten zu den bereits diskutierten Cystein-modifikationen zu beobachten, so dass auch in der Tat Cysteingruppen in Proteinen zu der Klasse der Reaktiven Schwefelspezies gezählt werden können (*ibid.*).

Wie bereits bei den Proteinmodifikationen erwähnt, ist für das reaktive Schicksal von oxidierten Schwefelgruppen entscheidend, ob andere Schwefelgruppen verfügbar sind, unter deren Zuhilfenahme Disulfide, Thiosulfinate oder Thiosulfonate gebildet werden können. Es ist dabei zu beachten, dass – obwohl hinsichtlich ihrer Konstitution und Summenformel gleich – Disulfid-S-monoxid bzw. Thiosulfinat und Disulfid-S-dioxid bzw. Thiosulfonat aufgrund ihrer Genese voneinander zu unterscheiden sind: Formal sind Thiosulfinat und Thiosulfonat Anhydride der Sulfensäure bzw. Sulfinsäure mit Sulfensäure (Kice et al., 1967), wohingegen die Disulfid-S-monoxid und –dioxid als Oxidationsprodukte des Disulfids zu betrachten sind.

Steht unter oxidierenden Bedingungen dem Schwefel kein weiteres Schwefelatom zur Verfügung, führt die Oxidation über Sulfen- und Sulfinsäure zur Sulfonsäure als am stärksten oxidierte Modifikation des Schwefels. Interessanterweise sind Sulfonsäure (wie übrigens auch Thiosulfonate) reaktionsträge und somit chemisch relativ inert. Ein Beispiel für ein biologisch bedeutsames Sulfonat ist Taurin, das nicht mit der Induktion von oxidativem Stress in Verbindung gebracht wird, sondern vielmehr antioxidative Eigenschaften aufweist (Aruoma et al., 1988; Winiarska et al., 2009). Für Sulfonate allerdings wurde gezeigt, dass sie mit primären Aminen unter Bildung von Sulfonamiden zu reagieren in der Lage sind; ein bedeutendes Beispiel ist das Glutathionsulfonamid, das aus Glutathion-sulfonat entsteht (Harwood et al., 2008; Winterbourn und Brannen, 1997). Im Gegensatz dazu können die übrigen oxidativen Modifikationen der Thiolgruppe reaktiv gegenüber Thiolen und auch Sulfensäuren (Gruhlke und Slusarenko, 2012). Neben der Reaktivität gegenüber Thiolen können RSS aber auch mit Hydroxygruppen reagieren (im Falle von Sulfensäuren beispielsweise unter Bildung eines Sulfoxids); ebenfalls bedeutend ist die Reaktion von Sulfensäuren mit Aminogruppen zu Sulfenylamiden (R-S-N-R): es konnte gezeigt werden, dass die Reaktion einer Sulfensäure mit katalytisch bedeutsamen Aminogruppen ein Mechanismus der Redoxregulation der Protein-Tyrosin-Phosphatase (Sivaramakrishnan et al., 2010). Damit zeigt sich, dass RSS nicht nur durch ihre Reaktivität gegenüber Thiolen, sondern auch anderen funktionellen Gruppen auf die Biochemie und Physiologie der Zelle einzuwirken in der Lage sind.

Oxidationszustand des Schwefels

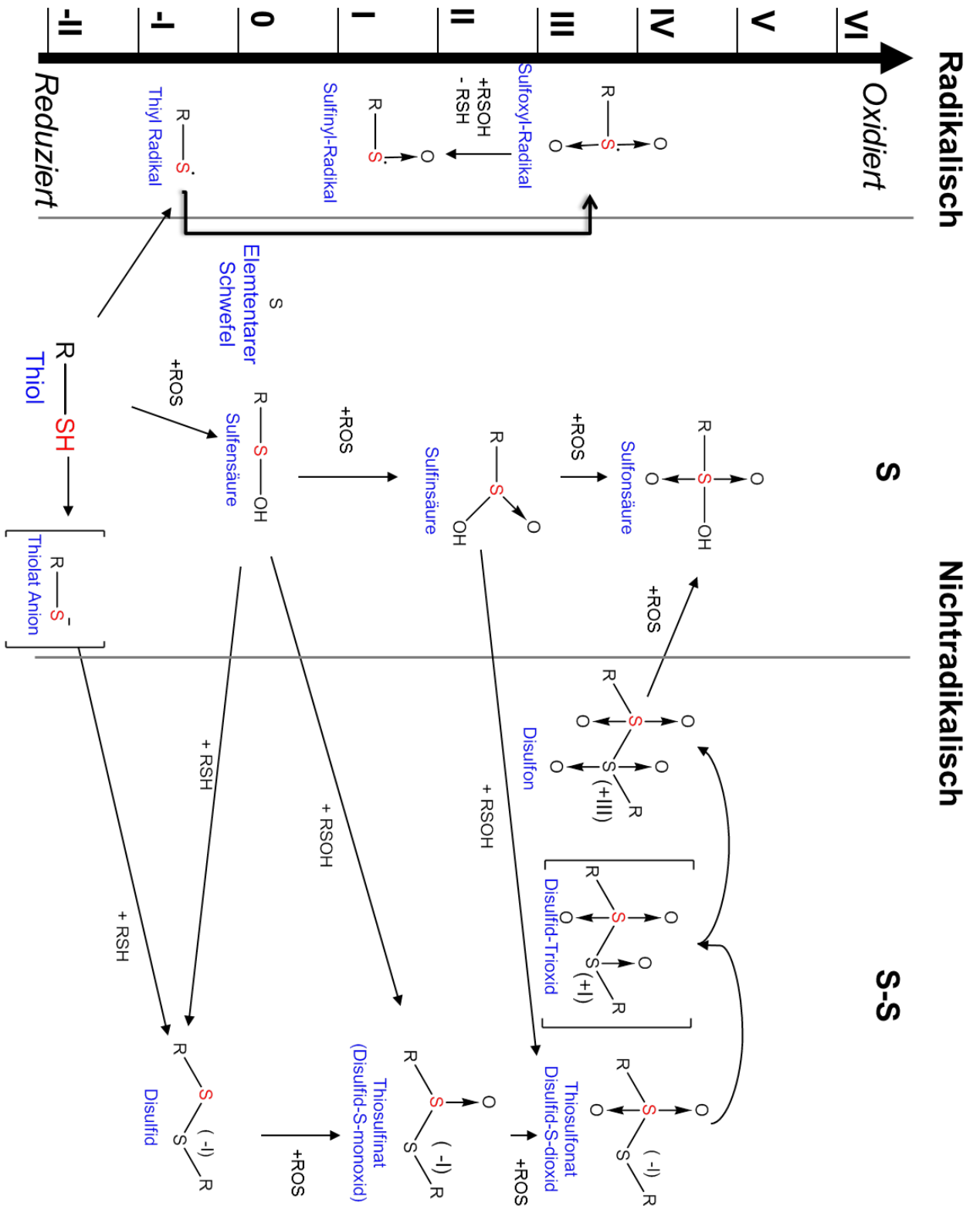


Abbildung 69: Übersicht über chemische Natur und Entstehung Reaktive Schwefelspezies

Ausgehend von Thiolen als am stärksten reduzierte Verbindungen werden verschiedene RSS gebildet. Durch Einwirkung von ROS auf ein Thiol entsteht Sulfensäure, die entweder mit einem weiteren Thiol zu einem Disulfid reagiert oder weiter zu Sulfin- bzw. Sulfonsäure oxidiert wird. Auch zur Bildung eines Disulfids kommt es bei der Reaktion eines thiol-abgeleiteten Thiolat-Anion mit einem Thiol zur Bildung eines Disulfids. Disulfide können ebenfalls oxidiert werden zu Disulfid-S-monoxid bzw. Disulfid-S-dioxid. Hinsichtlich ihrer Summenformel gleich sind Thiosulfinate bzw. Thiosulfonate, die formal aber Anhydride von Sulfen- bzw. Sulfinsäuren mit Sulfensäure darstellen. Eine weitere Oxidation von Thiosulfonaten (bzw. Disulfid-S-dioxiden) zu Disulfid-trioxid und Disulfon, das unter Einwirkung von weiteren ROS zu zwei Molekülen Sulfonsäure zerfällt. Neben diesen nichtradikalischen Vertretern gibt es auch radikalische RSS, wobei ausgehend vom Thiol durch Reaktion mit anderen Radikalen (z. B. dem Hydroxylradikal $\text{OH}^\bullet$) das Thiylradikal gebildet wird, das durch Reaktion mit elementarem Sauerstoff in ein Sulfoxylradikal überführt wird. Durch Reaktion mit einem Sulfensäuremolekül entsteht unter Abspaltung von O_2 ein Sulfinyl-Radikal.

Die jeweils betrachteten Schwefelatome sind rot markiert. Diese Abbildung ist verändert und ergänzt nach (Gruhlke und Slusarenko, 2012; Jacob et al., 2004)

Die Vielzahl von gezeigten Substanzklassen, die als Reaktive Schwefelspezies definiert werden können, können in den bereits diskutierten Verbindungen des Knoblauchs wiedergefunden werden. So ist Allicin als Thiosulfinat ebenso wie Allylsulfensäure oder DADS der Substanzklasse der Reaktiven Schwefelspezies zuzuordnen. Darüber hinaus belegen diese Substanzen, dass die Entstehung von RSS, wie im Falle von Allicin und den daraus resultierenden Verbindungen, ohne das Zutun Reaktiver Sauerstoffspezies erfolgen kann. Aufgrund der guten Zellgängigkeit von Allicin ($\text{LogP} = 1,52 \pm 0,8$ (Slusarenko et al., 2008)) und seiner bekanntermaßen hohen Reaktivität kann Allicin als eine Modellsubstanz eingesetzt werden, um die zellulären Effekte, die RSS bedingen, näher zu verstehen (Gruhlke et al., 2011; Gruhlke und Slusarenko, 2012).

Während bislang nur RSS Vertreter nichtradikalischer Natur diskutiert worden sind, darf nicht verschwiegen werden, dass – in Analogie zu ROS und RNS – auch radikalische RSS existieren. Von besonderer Bedeutung dabei ist das Thiyl-Radikal: Thiylradikale sind aufgrund ihrer hohen Reaktivität auch für Stoffwechselprozesse (z. B. für die Biosynthese von DNA-Nucleotiden (Stubbe et al., 2003)) von Bedeutung. Im Zuge von oxidativem Stress entstehen Thiylradikale entweder durch radikalische Kettenreaktionen, wobei die Genese ausgehend vom Hydroxylradikal von vorrangiger Bedeutung ist (Kalyanaraman et al., 1996).

Thiylradikale können dabei in einer radikalischen Kettenreaktion das Radikal auf andere Komponenten übertragen, so dass diese Schäden an Biomolekülen (z.B. DNA oder Proteinen) entstehen können. Eine Vielzahl von Folgereaktionen, die Thiylradikale involvieren, sind beschrieben worden: Die Reaktion mit einem anderen Thiylradikal führt zu einem Quenching der Radikale unter Bildung eines Disulfids (Kooyman, 1967). Weitere bedeutsame Produkte der Reaktion mit Thiylradikalen sind glutathionylierte Proteine (aufgrund des Radikalmechanismus spricht man hier von glutathionylierten und nicht von glutathiolierten Proteinen wie im Falle von nicht-radikalischen Bildungsformen), Sulfoxyl-Radikale und Sulfinat (Nauser et al., 2004).

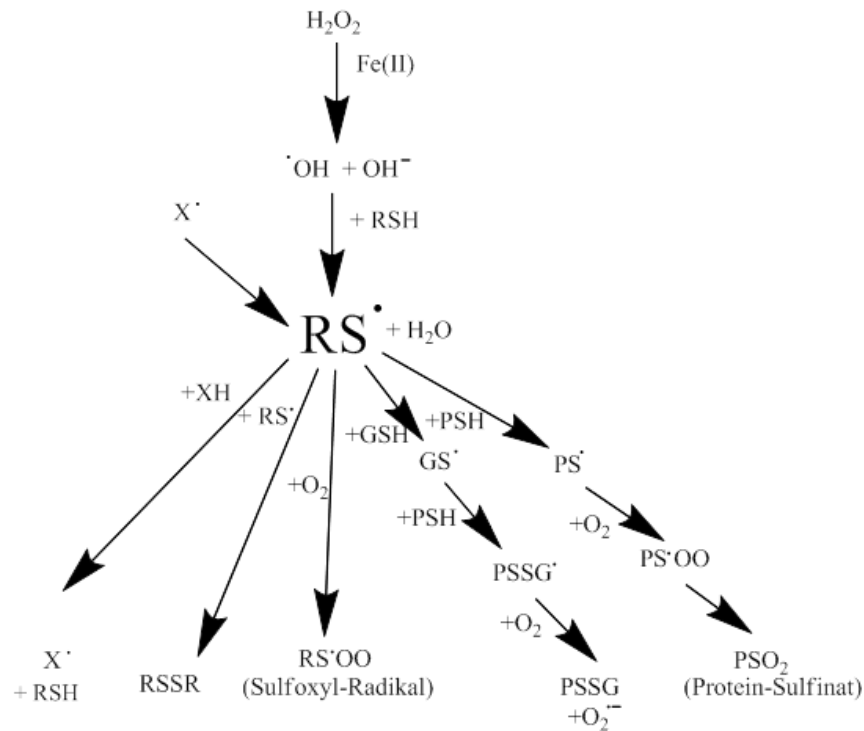


Abbildung 70: Entstehung und Reaktionen des Thiylradikals

Das Thiylradikal wird gebildet durch die Reaktion eines Thiols mit einem anderen Radikal (radikalischer Kettenmechanismus), wobei das Hydroxylradikal von besonderer Wichtigkeit ist, das bei der Umsetzung von Wasserstoffperoxid in Anwesenheit von Fe(II) entsteht (Fenton-Chemie). Die Reaktionsmöglichkeiten des Thiylradikals sind vielfältig; in einer Kettenreaktion kann das Radikal auf einen Reaktionspartner (XH) übertragen werden. Bei einer Reaktion mit einem anderen Thiylradikal kommt es zu einer Terminierungsreaktion unter Ausbildung eines Disulfids. Bei der Reaktion eines Thiylradikals mit molekularem Sauerstoff kommt es zur Bildung von Sulfoxyl-Radikalen, die weitere Radikalreaktionen eingehen können. Wird das Radikal auf Glutathion übertragen unter Bildung eines Glutathionyl-Radikals, kann dieses mit einem Proteinthiol reagieren, was in der Glutathionylierung (aufgrund des radikalischen Mechanismus spricht man hier nicht von Glutathiolierung); bedeutsam ist hierbei, dass als Intermediat ein Proteinglutathionylradikal entsteht, das bei Reaktion mit Sauerstoff zur Bildung von Superoxid führt. Schließlich führt die direkte Reaktion mit einem Proteinthiol zu einem Proteinthiylintermediat, das über ein Proteinsulfoxylradikal zur Ausbildung eines nichtradikalischen Sulfinats führt (Abbildung verändert nach (Nauser et al., 2004)).

7.2 Ergänzungen zum Material und Methodenteil

7.2.1 Chemikalien

Acetonitril	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Agar	Applichem GmbH, Darmstadt
Agarose	Life Technologies, Darmstadt
Ameisensäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ampicillin	Applichem GmbH, Darmstadt
Ammoniumacetat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ammoniumhydrogencarbonat	Applichem GmbH, Darmstadt
Ammoniumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Ammoniumnitrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Calciumnitrat-Tetrahydrat	Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande
Chloroform	Applichem GmbH, Darmstadt Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Coomassie Blue	Applichem GmbH, Darmstadt
Complete Supplement Mixture (CSM)	Bio101 Inc., Vista CA, USA; ForMedium, Hunstanton, Vereinigtes Königreich
CSM Dropout – Ura	Bio101 Inc., Vista CA, USA; ForMedium, Hunstanton, Vereinigtes Königreich
CSM Dropout – His	Bio101 Inc., Vista CA, USA; ForMedium, Hunstanton, Vereinigtes Königreich
CSM Dropout – Met	Bio101 Inc., Vista CA, USA; ForMedium, Hunstanton, Vereinigtes Königreich
CSM Dropout – Leu	Bio101 Inc., Vista CA, USA; ForMedium, Hunstanton, Vereinigtes Königreich

4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Life Technologies, Darmstadt (vormals Molecular Probes)
Dichlormethan	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Diallylsulfid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dichlorofluorescein-Diacetat	Life Technologies, Darmstadt (vormals Molecular Probes)
Dimethylformamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Applichem GmbH, Darmstadt Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Di-Natriumhydrogenphosphat	Applichem GmbH, Darmstadt
5,5-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Diallyldisulfid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol (reinst)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Merck KGaA, Darmstadt
Formaldehyd (4% Lösung)	Applichem GmbH, Darmstadt
Galactose	Applichem GmbH, Darmstadt
Genitacin (G-418)	Applichem GmbH, Darmstadt
Glucose	Applichem GmbH, Darmstadt Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande
Glutathion (reduziert), GSH	Applichem GmbH, Darmstadt Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glutathion (oxidiert), GSSG	Applichem GmbH, Darmstadt Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glutathion-Ethylester	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glycerin	Applichem GmbH, Darmstadt
Hefeextrakt	Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande
Hexan	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

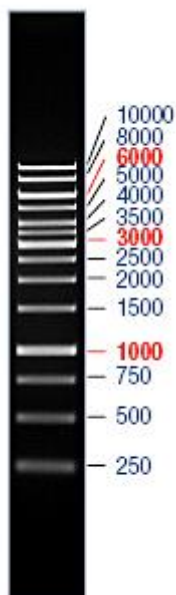
Isoamylalkohol	Merck KGaA, Darmstadt
Isopropanol	Applichem GmbH, Darmstadt
Kaliumacetat	Applichem GmbH, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumnitrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumpermanganat	Applichem GmbH, Darmstadt
Kupfersulfat	Merck KGaA, Darmstadt
Luciferin	Applichem GmbH, Darmstadt
Lucigenin (Bis- <i>N</i> -methylacridinium Nitrat)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Magnesiumsulfat (wasserfrei)	Merck KGaA, Darmstadt
Mangan(II)sulfat Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol (HPLC Grad)	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Monobromobiman	Life Technologies, Darmstadt (vormals Molecular Probes)
3-(<i>N</i> -morpholino)propanesulfonsäure (MOPS)	Applichem GmbH, Darmstadt
NADPH	Applichem GmbH, Darmstadt
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Applichem GmbH, Darmstadt
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriummolybdat (Monohydrat)	Merck KGaA, Darmstadt
Pepton	Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande
Phalloidin-Alexa 488	Biomol GmbH, Hamburg
Phenol (TRIS-gepuffert)	Biomol GmbH, Hamburg
Phosphorsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Plant Agar	Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande
Rubidiumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Sorbitol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

TRIS	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
TRIS-HCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Triton X 100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypton	Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
2-Vinylpyridin	Merck KGaA, Darmstadt
Wasserstoffperoxid	Merck KGaA, Darmstadt
Yeast Nitrogen Base mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	ForMedium, Hunstanton, Vereinigtes Königreich
Zinkchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

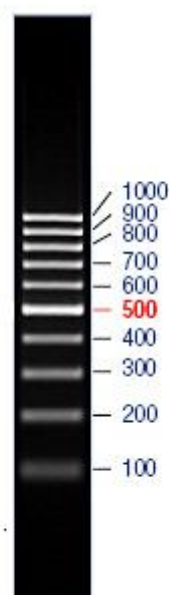
7.2.1.1 Enzyme

Glutathion-Reduktase von Hefe	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
RNase A	Thermo Scientific (Fermentas), St. Leon-Roth
DNase	Thermo Scientific (Fermentas), St. Leon-Roth
T4 Ligase	Thermo Scientific (Fermentas), St. Leon-Roth
KOD-Hotstart DNA Polymerase	Novagen (Merck-Millipore), Darmstadt

7.2.1.2 Größenmarker



1 kb Größenmarker (Thermo Fischer, vormals Fermentas, St. Leon-Rot)



100 bp Größenmarker (Thermo Fischer, vormals Fermentas, St. Leon-Rot)

7.2.1.3 Restriktionsenzyme

Enzymname	Erkennungssequenz	Hersteller	Verwendeter Puffer	Temperatur
AatII	5'...GACGT↓C...3' 3'...C↑TGCAG...5'	Thermo Scientific (Fermentas), St. Leon-Roth	1xTango (Fermentas)	37°C
BamHI	5'...G↓GATCC...3' (FastDigest) 3'...CCTAG↑G...5'	Thermo Scientific (Fermentas), St. Leon-Roth	1xFastDigest Buffer	37°C
EcoRI	5'...G↓AATTC...3' (FastDigest) 3'...CAATT↑C...5'	Thermo Scientific (Fermentas), St. Leon-Roth	1xFastDigest Buffer	37°C
KpnI	5'...GGTAC↓C...3' (FastDigest) 3'...C↑CATGG...5'	Thermo Scientific (Fermentas), St. Leon-Roth	1xFastDigest Buffer	37°C
NotI	5'...GC↓GGCCGC...3' (FastDigest) 3'...CGCCGG↑CG...5'	Thermo Scientific (Fermentas), St. Leon-Roth	1xFastDigest Buffer	37°C
StyI	5'...C↓CWWGG...3' (FastDigest) 3'...GGWWC↑C...5'	Thermo Scientific (Fermentas), St. Leon-Roth	1xFastDigest Buffer	37°C
XhoI	5'...C↓TCGAG...3' (FastDigest) 3'...GAGCT↑C...5'	Thermo Scientific (Fermentas), St. Leon-Roth	1xFastDigest Buffer	37°C

7.2.1.4 Kits

“Pure Link Quick Plasmid Miniprep Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific (Fermentas), St. Leon-Roth
Green Mix (PCR-Mastermix)	Thermo Scientific (Fermentas), St. Leon-Roth
Gel-Elutionskit	OLS Omni LifeScience GmbH&Co. KG, Bremen
SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

7.2.2 Verbrauchsmaterialien

Glasperlen 0,2 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glasvials für Autosampler der HPLC	Jasco GmbH Deutschland, Groß-Umstadt
Halbmikro-Küvetten	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Micropore™-Band	3M Health Care, Neuss
Parafilm™	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Petrischalen, rund 90/15 mm	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster

Petrischalen, rund 60/12 mm	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster
Petrischalen, quadratisch, 120/120 mm	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster
Pipettenspitzen weiß (bis 10 µL)	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster
Pipettenspitzen gelb (bis 200 µL)	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster
Pipettenspitzen blau (bis 1000 µL)	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster
PCR-tubes, 200 µL	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster
Reaktionsgefäße, 1,5 mL	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäße, 2,0 mL	Eppendorf AG, Hamburg
Rundfilter Rotilabo, 70 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Spritzenfilter Rotilabo, 0,2 µL Porengröße	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Spritzen, 1 mL	B. Braun AG, Melsungen
Zentrifugenfalcon, konisch, 15 mL	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster
Zentrifugenfalcon, konisch, 50 mL	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster

7.2.3 Software

HPLC-Steuerungsssoftware

Chrompass	Jasco GmbH Deutschland, Großumstadt
-----------	-------------------------------------

Mikroskopische Fotografie-Software

Diskus	Carl Hilgers Technisches Büro, Königswinter
Leica LSM Software	Leica Microsystems, Wetzlar, Germany

Geldokumentations-Software

Devision G	Decon ScienceTec GmbH, Hohengandern
------------	-------------------------------------

Primer Design

Saccharomyces Genome Database	www.yeastgenome.org
Primer 3	http://primer3.sourceforge.net/

Bildbearbeitung

ImageJ Version 1.42	National Institute of Health, Bethesda, USA
---------------------	---

Allgemeine Molekularbiologische Software

Gentle	http://gentle.magnusmanske.de/
--------	---

Statistische Auswertung

SigmaStat Version 3.2.

Aspire Software International, Ashburn, USA

Sequenzdatenbanken

Saccharomyces Genome Database (SGD)

Department of Genetics, School of Medicine,
Stanford University

www.yeastgenome.org

National Center for Biotechnology
Information (NCBI)

National Institute of Health, Bethesda, USA

www.ncbi.nlm.nih.gov

European Molecular Biology Laboratory
(EBI-EMBL-Datenbank)

European Bioinformatics Institute, Cambridge,
Vereinigtes Königreich

www.ebi.ac.uk/embl

Auswertung quantitative PCR

ABI PRISM 7000 SDS

Applied Biosystems, Foster City, USA

7.2.4 Geräte

Autoklaven

Systec V150

Systec GmbH, Wettenberg

Systec DX-65

Systec GmbH, Wettenberg

Zubehör für die Molekularbiologie

Agarose-Gelelektrophorese-Kammer

MWG Biotech AG, Ebersberg

Elektroporationseinheit

BioRad Laboratories GmbH, München

Elektroporationsküvetten

BioRad Laboratories GmbH, München

Eppendorf AG, Hamburg

DeVision G Geldokumentationseinheit

Decon Science Tec GmbH, Hohengandern

Spannungsgeber PPS200-1D

MWG Biotech, Ebersberg

Mikroskopie

Digitalkamera für Mikroskopie

(Digital Camera KY-F75U)

JVC Deutschland GmbH, Friedberg

Konfokales Laser-Scan Mikroskop

(TCS SP1)

Leica GmbH, Wetzlar

Licht-Mikroskop (DM-RBE)

Leica GmbH, Wetzlar

Photometer und Luminiszenzmessgeräte

Spektrophotometer DU® 530

Beckman Coulter GmbH, Krefeld

Spektrophotometer DU® 800

Beckman Coulter GmbH, Krefeld

Lumat LB9501

Berthold Technologies GmbH, Bad Wildbad

HPLC

Pumpenblock PU-980

Jasco GmbH Deutschland, Groß-Umstadt

UV-Detektor

Jasco GmbH Deutschland, Groß-Umstadt

Degasser DG-980-50

Jasco GmbH Deutschland, Groß-Umstadt

Gradienteneinheit LB-980-02

Jasco GmbH Deutschland, Groß-Umstadt

Vorsäule (Multohigh 100, RP18 5 µ)

CS-Chromatographie Service GmbH,
Langerwehe

ProntoSIL C18

Bischoff Chromatographie, Leonberg

PCR

ABI7300 Real-time

Applied Biosystems, Darmstadt

Thermocycler PTC-200

MJ Research

Zentrifugen

Kühlzentrifuge 5417 R

Eppendorf AG, Hamburg

Megafuge 1.0R

Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf

Tischzentrifuge 5415C

Eppendorf AG, Hamburg

Plate-reader

Plate-reader MRX

Dynatech Laboratories, Chantilly, USA

Sonstiges

Dampfdruckkochtopf

Fissler GmbH, Idar-Oberstein

Entsafter

Turmix AG, Zürich (CH)

Inkubationsschränke

Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach

Inkubationsschüttler I26

New Brunswick Scientific, Nürtingen

Inkubationsschüttler E25

New Brunswick Scientific, Nürtingen

Magnetrührer + Heizplatte

IKA GmbH & Co. KG, Staufen

Pipetten (bis 5000 µL)

Gilson Inc., Middleton WI, USA

	Eppendorf AG, Hamburg
pH Meter MP 220	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Thermomixer Comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Vakuumpumpe Diaphragm Vacuum	Vaccubrand GmbH & Co, Wertheim
Vortex V1 plus	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt
Wasseraufbereitungsanlage arium pro	
VG	Sartorius Stadim GmbH, Göttingen

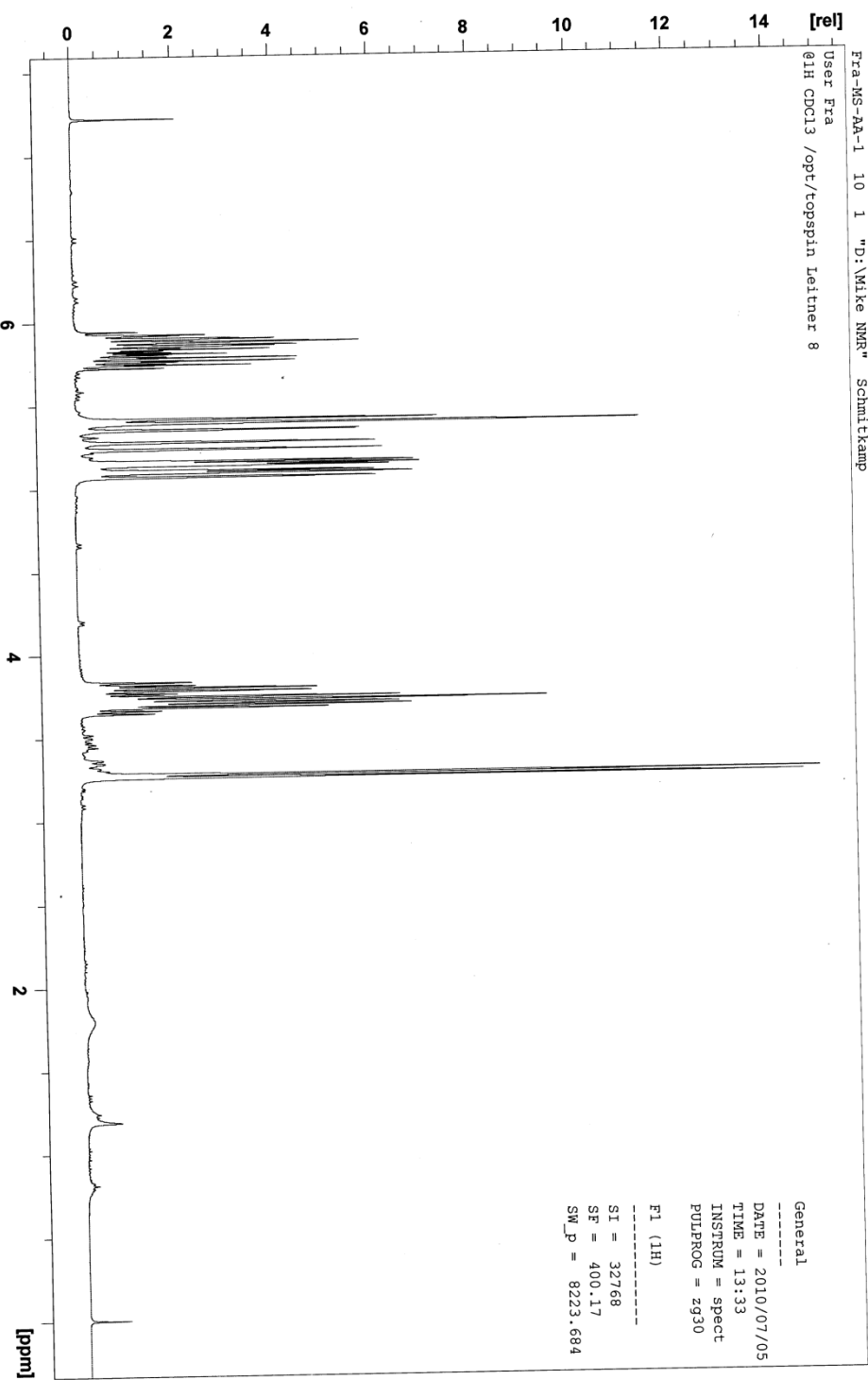
7.2.5 Oligonukleotide

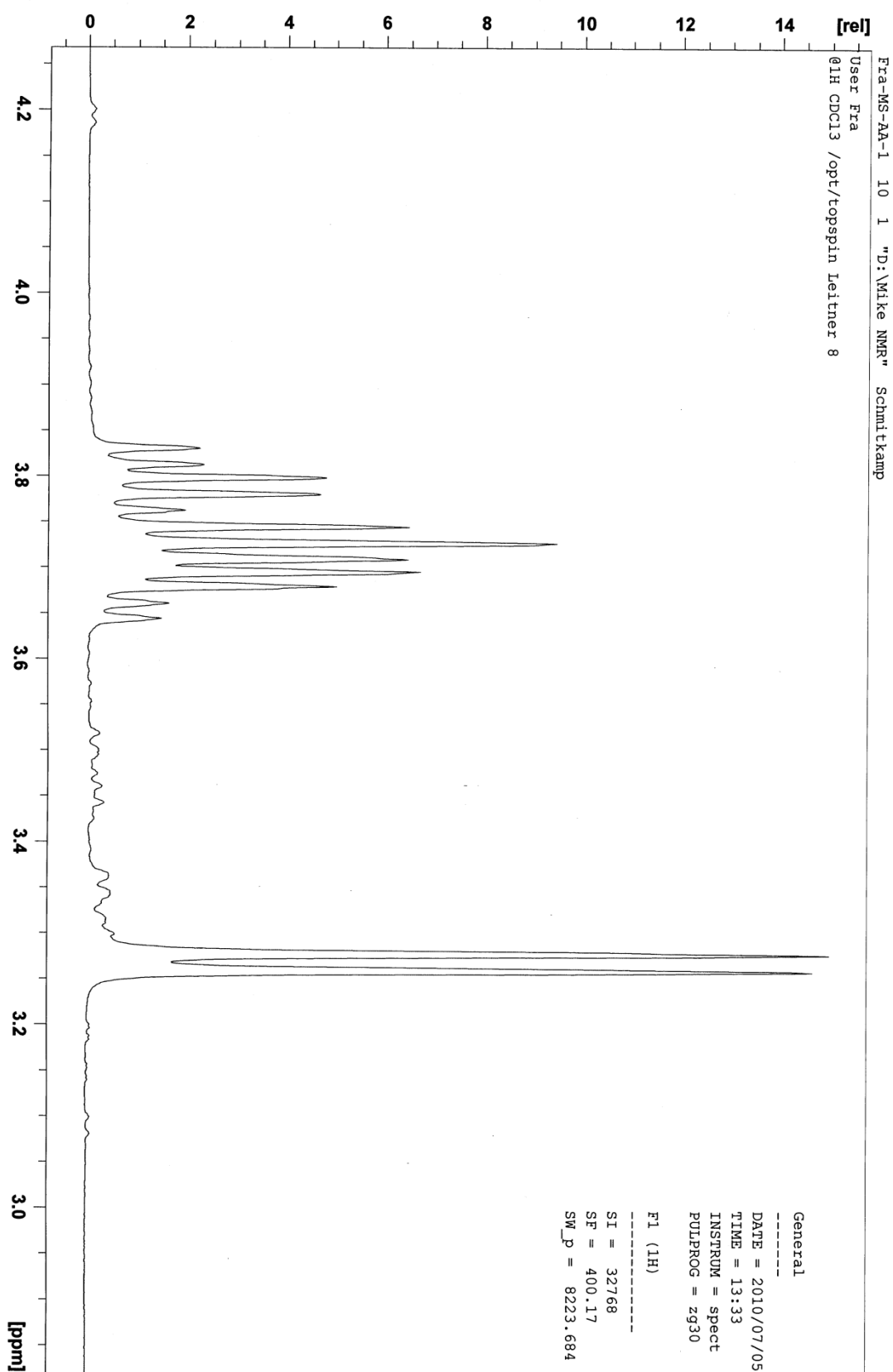
Alle Oligonukleotide wurden bezogen von Invitrogen GmbH, Karlsruhe. Die Darstellung erfolgt in 5' in 3' Richtung.

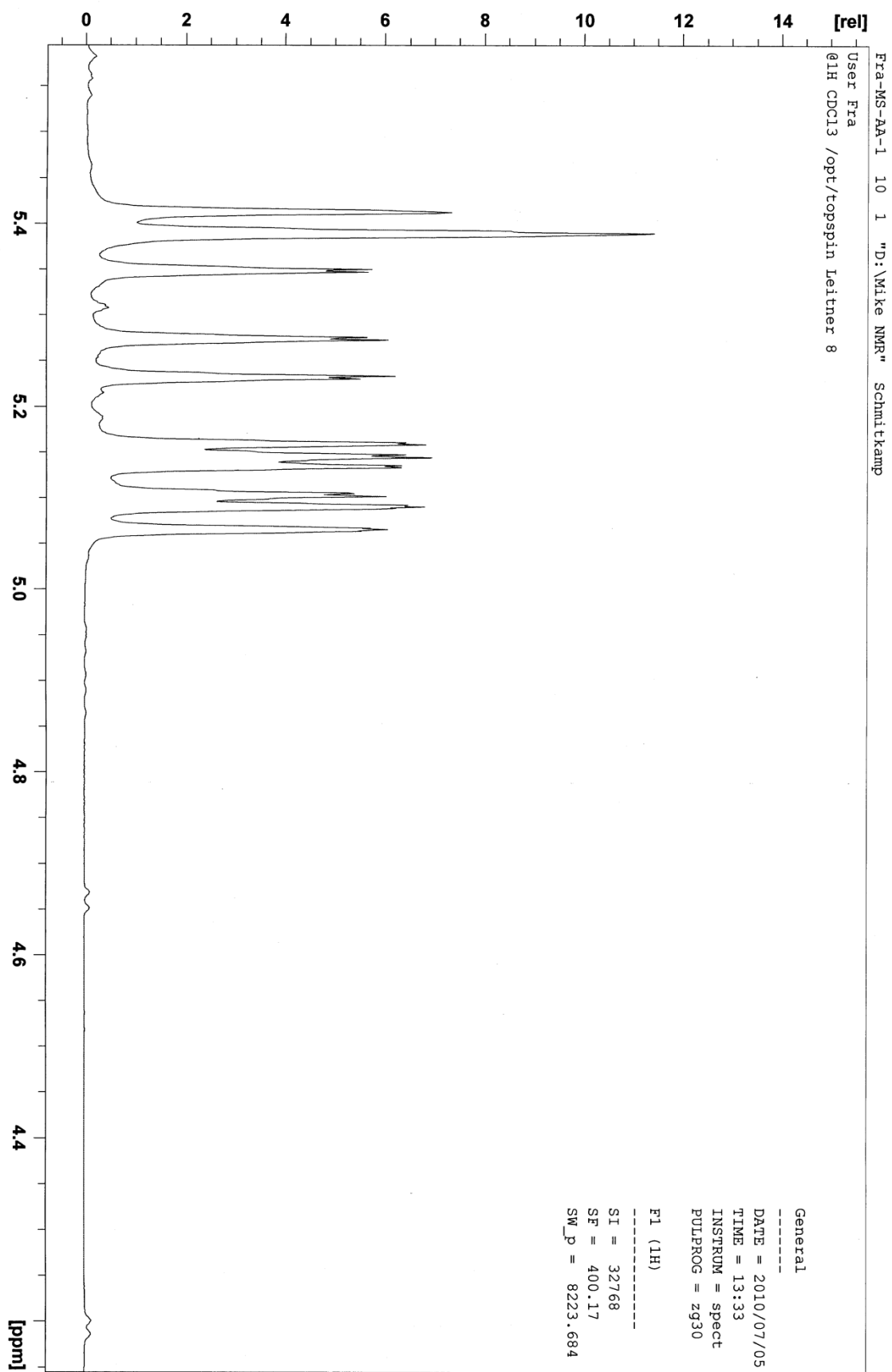
GAA TTC AAT GGG TGT CGC AGA T	ABP140 fwd (EcoRI)
CCT AGG AGG AAC GTC AAA CAC AGC TT	ABP140 rev C-terminal (BamHI)
GAG CTC GAG GTG GTA CTT GTC TCA GAA	ABP140 rev N-terminal (XhoI)
GAA TTC GAT ATC AAG CTT ATC GAT ACC GTC GAC AAT GAG TGT GTC TAC CGC CAA GAG G	YAP1 fwd (homologe Rekombination von YAP1 in pGREG)
GCG TGA CAT AAC TAA TTA GAC TCG AGG TCG ACT GCT TAT TCA AAG CTA ATT GAA CG	YAP1 rev (homologe Rekombination von YAP1)
GGG AAC AAAA AGC TGG AGC TCA TGG AAG ACG CCA AAAA ACA T	LuciPGreg576forw
AAT TAC ATG ACT CGA GCT TCT TGG CCT TAA TGA GAA	LuciPGreg576 rev
GGG AAC AAA AGC TGG AGC TCA TGA GAT TAG TAA TGC ATA GCG G	YKLpGREGLucfwd
TTT GGC GTC TTC CAT GAT CGA CTT TGT TTG CTT AGA ATTC	YKLpGREGLucrev
GGG AAC AAA AGC TGG AGC TCT GAG ATT AGT AAT GAG ATT AGT AAT GAG AAT AGT AAT GAG AAT AGT AAT G	YKL4xMultifwd
CAT TAC TAA TCT CAT TAC TAA TCT CAT TAC TAA TCT CAT TCA TAA TCT CAG AGC TCC AGA TTT TGT TCC C	YKL4xMultirev

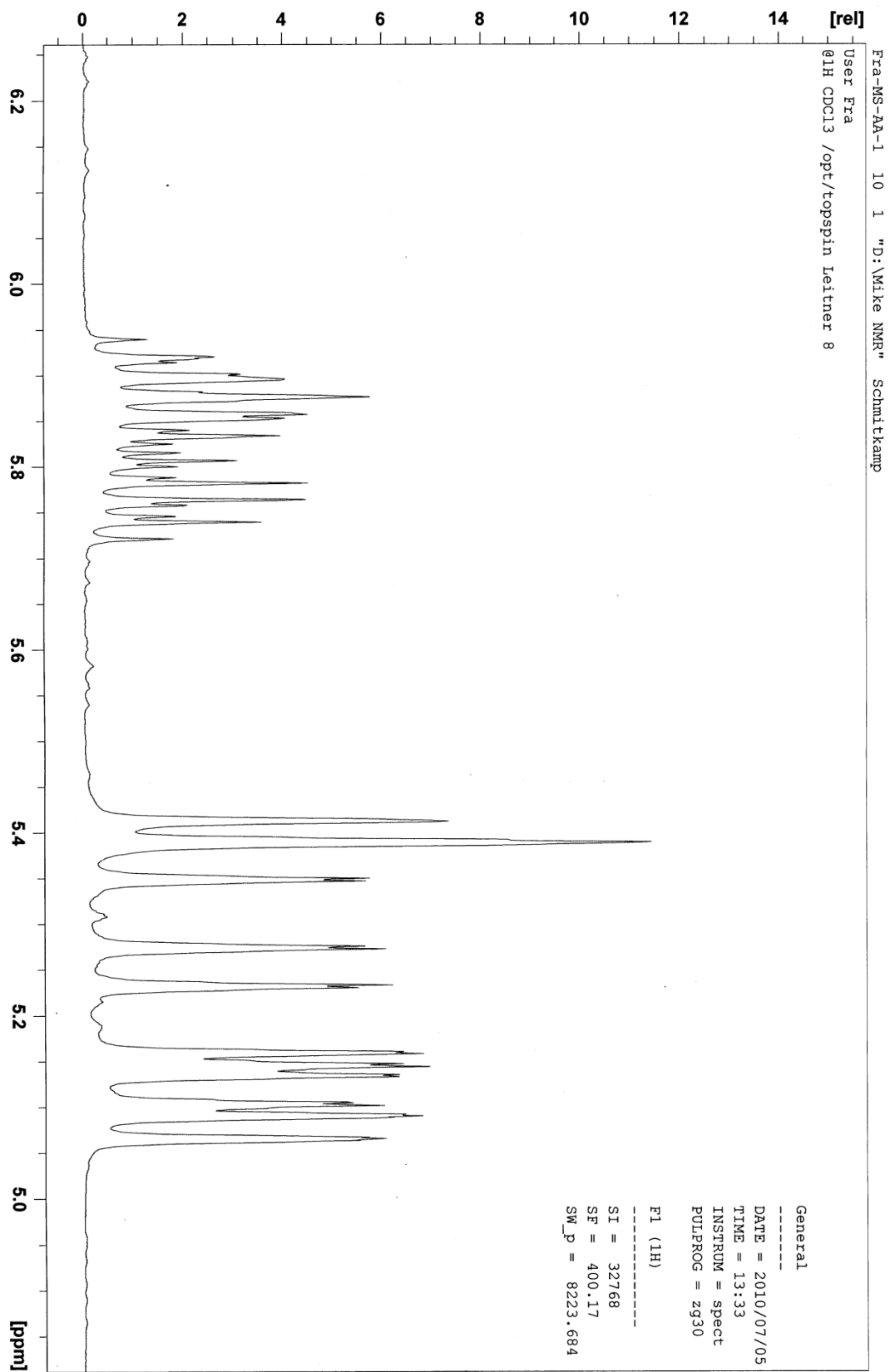
TCC AAC AAA GGC CCT GGC ACA	YBR044 fwd (qPCR)
CCT CTG GCT CCG TAT CGC CG	YBR044 rev (qPCR)
TCC AAC AAA GGC CCT GGC ACA	HRQ1 fwd (qPCR)
CCT CTG GCT CCG TAT CGC CG	HRQ1 rev (qPCR)
ACC AGA AGA AAG TGC CTC TGC GCT	YKL071w fwd (qPCR)
GAC GCC TTC GCT GCC GTC AT	YKL071w rev (qPCR)

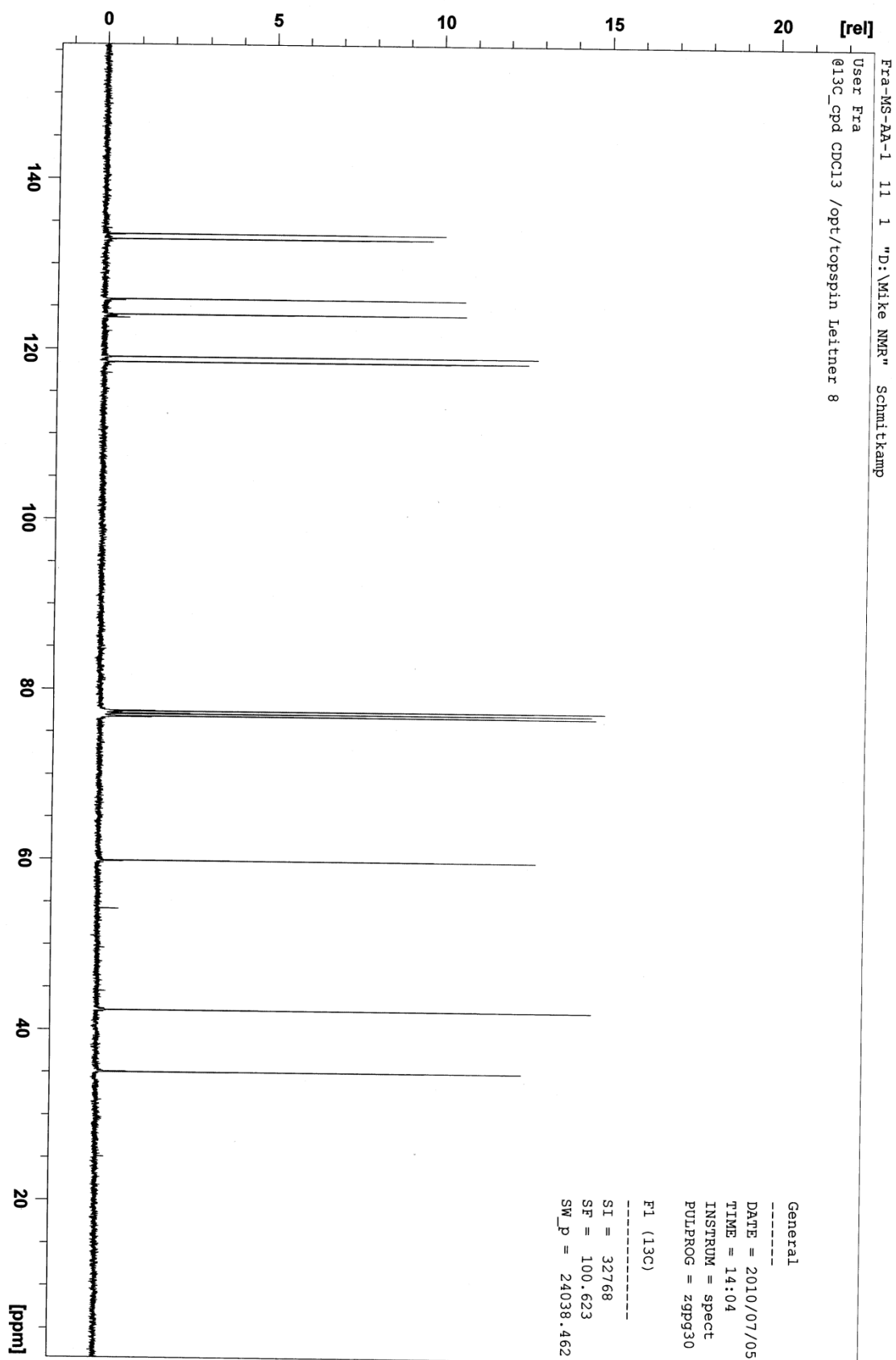
7.3 Referenz NMR-Daten von Allicin



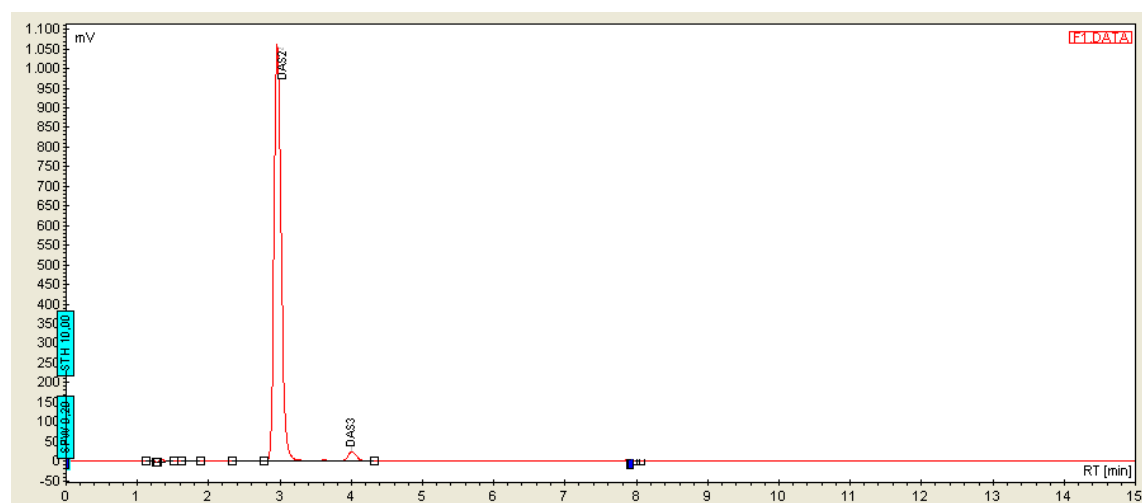








7.4 Reinheit von DADS



Exemplarische Darstellung der Reinheit von Diallyldisulfid nach Destillation