

**Untersuchung enzymatisch und nicht-enzymatisch gebildeter  
Oxylipine in *Arabidopsis thaliana* in der kompatiblen und der  
inkompatiblen Interaktion mit *Pseudomonas syringae***

**Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von  
Christoph Grun  
aus  
Wolfratshausen**

---

Würzburg 2006

**Eingereicht am:** .....

**Mitglieder der Promotionskommission:**

**Vorsitzender:** .....

**1. Gutachter:** **Prof. Dr. M. J. Müller**

**2. Gutachter:** **Prof. Dr. W. Hartung**

**Tag des Promotionskolloquiums:** .....

**Promotionsurkunde ausgehändigt am:** .....

*Für Claudia, Franziska und Johanna*

## Inhaltverzeichnis

<b>I.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
	1. <b>Abiotische und Biotische Stressfaktoren.....</b>	<b>1</b>
	2. <b>Pflanzliche Resistenzmechanismen.....</b>	<b>4</b>
	3. <b>Abwehrreaktionen der Pflanze.....</b>	<b>9</b>
	4. <b>Die Signaltransduktion bei der Pathogenabwehr.....</b>	<b>17</b>
	5. <b>Bildungsmechanismen von reaktiven Sauerstoffspezies.....</b>	<b>20</b>
	6. <b>Antioxidative Schutzmechanismen in Pflanzen.....</b>	<b>24</b>
	7. <b>Synthese von Hydroxy-Fettsäuren.....</b>	<b>27</b>
	7.1 Enzymatische Bildung von Hydroxy-Fettsäuren	28
	7.2 Bildung von Hydroxy-Fettsäuren über einen radikalischen Mechanismus	29
	7.3 Bildung von Hydroxy-Fettsäuren durch Singulett-Sauerstoff	31
	8. <b>Die Phytoprostane.....</b>	<b>33</b>
	9. <b>Hydroxy-Fettsäuren und F<sub>1</sub>-Phytoprostanen als Marker für die nicht-enzymatische Lipid-Peroxidation.....</b>	<b>35</b>
	10. <b>Ziele der vorliegenden Arbeit.....</b>	<b>36</b>
<b>II.</b>	<b>Material.....</b>	<b>38</b>
	1. <b>Chemikalien.....</b>	<b>38</b>
	2. <b>Standardsubstanzen.....</b>	<b>38</b>
	3. <b>Verbrauchsmaterial.....</b>	<b>39</b>

4.	<b>FrISChe Pflanzenorgane.....</b>	<b>39</b>
5.	<b>Geräte.....</b>	<b>39</b>
III.	<b>Methoden.....</b>	<b>43</b>
1.	<b>Medien und Antibiotika für die Anzucht von Bakterienkulturen.....</b>	<b>43</b>
2.	<b>Anzucht von <i>P. syringae</i>.....</b>	<b>43</b>
3.	<b>Infiltration und Ernte von <i>A. thaliana</i>.....</b>	<b>43</b>
4.	<b>Extraktion von <i>A. thaliana</i> und Bestimmung von Oxylipinen.....</b>	<b>44</b>
	4.1 Extraktion und Aufreinigung von Jasmonaten	44
	4.2 Analytik von Salicylsäure mittels „vapor phase extraction“-Methode	44
	4.3 Extraktion und Aufreinigung der freien Hydroxy-Fettsäuren aus <i>A. thaliana</i>	46
	4.4 Extraktion und Aufreinigung der freien und veresterten Hydroxy-Fettsäuren aus <i>A. thaliana</i>	46
	4.5 Extraktion und Aufreinigung von freien F <sub>1</sub> -Phytosteranen	47
	4.6 Extraktion und Aufreinigung von freien und veresterten F <sub>1</sub> -Phytosteranen	48
5.	<b>Chromatographische Methoden.....</b>	<b>48</b>
	5.1 Dünnschichtchromatographie	48
	5.2 Festphasenextraktion	48
	5.3 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie	49
	5.3.1 Präparative Isolierung von HODE und HOTE mittels RP-HPLC	49
	5.3.2 Präparative Isolierung von HETE mittels RP-HPLC	49
	5.3.3 Präparative Isolierung von Hydroxy-Fettsäure-Regioisomeren mittels NP-HPLC	50
	5.3.4 Quantifizierung von konjugierten Dienen	50
	5.4 Gaschromatographie	51
	5.4.1 Bestimmung der Responsefaktoren für die Gaschromatographie	53
6.	<b>Massenspektrometrie.....</b>	<b>55</b>
7.	<b>Derivatisierung von freien Fettsäuren und deren Derivaten.....</b>	<b>55</b>
	7.1 Derivatisierung von Hydroxy-Fettsäuren für die GC-MS-Analytik	55
	7.2 Derivatisierung von F <sub>1</sub> -Phytosteranen für die GC-MS-Analytik	56
	7.3 Herstellung von Diazomethan	56

7.4 Methylierung freier Carboxyl-Gruppen	56
7.5 Herstellung von Pentafluorbenzylestern	56
7.6 Herstellung von Tri-(methyl)-silyläthern	57
7.7 Katalytische Hydrierung	57
<b>8. Zuordnung einiger Isomere der F<sub>1</sub>-Phytosterane.....</b>	<b>57</b>
<b>IV. Ergebnisse.....</b>	<b>60</b>
<b>1. Herstellung von Hydroxy-Fettsäuren als Standardsubstanzen.....</b>	<b>60</b>
1.1 Herstellung von Hydroxy-Fettsäuren mittels Lipoxygenase	60
1.2 Nicht-enzymatische Herstellung von Hydroxy-Fettsäuren	62
1.3 Reinigung von Hydroxy-Fettsäuren mittels präparativer Dünnschichtchromatographie	62
1.4 Präparative Reinigung von Hydroxy-Fettsäuren mittels RP-HPLC	63
1.5 Präparative Reinigung von Hydroxy-Fettsäuren mittels NP-HPLC	65
1.6 Identifizierung von Hydroxy-Fettsäuren	67
1.7 Herstellung von 15(S)-Hydroxyeikosatetraensäure	73
<b>2. Bildung von Hydroxy-Fettsäuren in <i>A. thaliana</i> nach Kälteeinwirkung....</b>	<b>74</b>
<b>3. Entstehung von F<sub>1</sub>-Phytosteranen nach Einfrieren/Auftauen von <i>A. thaliana</i>.....</b>	<b>77</b>
<b>4. Vergleichende Untersuchung von Oxilipinen in <i>A. thaliana</i> in der kompatiblen und der inkompatiblen Interaktion nach Infektion mit <i>P. syringae</i>.....</b>	<b>80</b>
4.1 Analytik von Hydroxy-Fettsäuren in <i>A. thaliana</i>	81
4.2 Entstehung von freien und veresterten Hydroxy-Fettsäuren in der kompatiblen Interaktion	82
4.3 Entstehung von freien und veresterten Hydroxy-Fettsäuren in der inkompatiblen Interaktion	84
4.4 Entstehung von C <sub>16</sub> -Hydroxy-Fettsäuren in der kompatiblen und der inkompatiblen Interaktion	86
4.5 Entstehung von F <sub>1</sub> -Phytosteranen in der kompatiblen und der inkompatiblen Interaktion	89
4.6 Entstehung von 12-Oxo-Phytodiensäure und Jasmonsäure in der kompatiblen und der inkompatiblen Interaktion	91

4.7 Entstehung von Salicylsäure in der kompatiblen und der inkompatiblen Interaktion	95
<b>5. Entstehung von Hydroxy-Fettsäuren in der inkompatiblen Interaktion in Dunkelheit.....</b>	<b>97</b>
<b>6. Entstehung von Hydroxy-Fettsäuren in Blättern und Wurzeln von <i>A. thaliana</i>.....</b>	<b>100</b>
<b>7. Entstehung von Hydroxy-Fettsäuren und PPF<sub>1</sub> in <i>atrbohF</i>-, <i>atrbohD</i>-, <i>NahG</i>- und <i>Isd1</i>-Mutanten in der inkompatiblen Interaktion.....</b>	<b>103</b>
7.1 Entstehung von Hydroxy-Fettsäuren und PPF <sub>1</sub> in <i>NahG</i>	104
7.2 Entstehung von Hydroxy-Fettsäuren und PPF <sub>1</sub> in <i>Isd1</i>	106
7.3 Entstehung von Hydroxy-Fettsäuren und PPF <sub>1</sub> in <i>atrbohF</i> - und <i>atrbohD</i>	107
<b>V. Diskussion.....</b>	<b>109</b>
1. Oxylipin-Akkumulation in <i>A. thaliana</i> in der kompatiblen und in der inkompatiblen Interaktion mit <i>P. syringae</i> .....	109
2. Entstehung von Hydroxy-Fettsäuren in der inkompatiblen Interaktion in Dunkelheit.....	117
3. Vergleich der Hydroxy-Fettsäure-Muster in Wurzeln und Blättern von <i>A. thaliana</i> .....	120
4. Entstehung von Hydroxy-Fettsäuren und F <sub>1</sub> -Phytoprostanen in Mutanten von <i>A. thaliana</i> während der inkompatiblen Interaktion mit <i>P. syringae</i> .....	121
<b>VI. Zusammenfassung.....</b>	<b>125</b>
<b>VII. Summary.....</b>	<b>128</b>
<b>VIII. Anhang.....</b>	<b>131</b>
<b>IX. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>132</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

<i>Avr</i> -Gen	Avirulenzgen
BHT	2,6-Di-tert.-butyl-4-methyl-phenol
BSTFA	N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid
CI	Chemische Ionisation (engl.: Chemical Ionisation)
DC	Dünnschichtchromatographie
DHJA	Dihydrojasmonsäure
DIEA	N,N-Diisopropylethylamin
EI	Elektronenstoß (engl.: electron impact)
EPS	Extrazelluläre Polysaccharide
FG	Frischgewicht
GC	Gaschromatographie
GST	Glutathion-S-Transferase
HETE	Hydroxyeikosatetraensäure
HODE	Hydroxyoctadecadiensäure
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (engl.: High Performance Liquid Chromatography)
HPODE	Hydroperoxyoctadecadiensäure
HPOTE	Hydroperoxyoctadecatriensäure
HR	Hypersensitive Reaktion
JA	Jasmonsäure
KB-Medium	Kings Medium B
LOX	Lipoxygenase
LRR	(engl.: Leucin-Rich Repeat)
<i>m/z</i>	Masse/Ladungsverhältnis
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
NBS	Nukleotid-Bindungsstelle (engl.: Nucleotide Binding Site)
NICI	negative chemische Ionisation (engl.: Negative Ion Chemical Ionisation)
NP-HPLC	Normalphasen-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
OPDA	12-oxo-Phytodiensäure
p.a.	pro analysis (analytischer Reinheitsgrad)
PFB	2,3,4,5,6-Pentafluorbenzyl-
PFB-Br	$\alpha$ -Brom-pentafluortoluol (Pentafluorbenzylbromid)
PP	Phytoprostan



<i>Pst</i>	<i>Pseudomonas syringae pv.tomato</i>
R-Gen	Resistenzgen
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (engl.: Reactive Oxygen Species)
RP-HPLC	Umkehrphasen (engl.: Reversed Phase)-Hochleistungs- Flüssigkeitschromatographie
RT	Raumtemperatur
SA	Salicylsäure
SAR	systemisch erworbene Resistenz (engl.: Systemic Aquired Resistance)
SPE	Festphasenextraktion (engl.: Solid Phase Extraction)
TEA	Triethylamin
TG	Trockengewicht
TIR1	Toll/Interleukin-1-Rezeptor
TMS	Trimethylsilyl-
TPP	Triphenylphosphin
t <sub>R</sub>	Retentionszeit
TR	Trockengewicht
TTSS	HRP-Typ III Protein-Sekretionssystem
VPE	verwendete Methode zur Extraktion und Bestimmung von pflanzlichen Inhaltsstoffen (engl.: Vapor Phase Extraction)

## I. Einleitung

In der vorliegenden Arbeit sollten die Konzentrationen sowohl enzymatisch als auch nicht-enzymatisch gebildeter Oxylipine in *Arabidopsis thaliana* im Laufe einer Infektion mit *Pseudomonas syringae* untersucht werden. Die Infiltration mit virulenten und avirulenten Pathovaren von *P. syringae* ermöglicht die Differenzierung einer kompatiblen von einer inkompatiblen Wirts-Pathogen-Interaktion im Hinblick auf die untersuchten Oxylipine. Hierbei sollten die Gehalte von Jasmonaten und Salicylsäure (SA) als etablierte Phytohormone sowie von Hydroxy-Fettsäuren (OH-FS) und F<sub>1</sub>-Phytoprostane (PPF<sub>1</sub>) als Marker-Substanzen für eine verstärkte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) während des „oxidative burst“ bestimmt werden. OH-FS und PPF<sub>1</sub> sollten nachfolgend in *A. thaliana*-Mutanten bestimmt werden, um mögliche Zusammenhänge ihrer genetischen Defekte mit der ROS-Bildung offen zu legen. Im Folgenden soll zum einen auf die pflanzliche Resistenz gegenüber exogenen Stressfaktoren sowie auf mögliche Abwehrmechanismen von Pflanzen und zum anderen auf die unterschiedlichen Entstehungswege von ROS und Oxylipinen näher eingegangen werden.

### 1. Abiotische und Biotische Stressfaktoren

Höhere Pflanzen sind als sessile Lebewesen einer Vielzahl von verschiedenen abiotischen und biotischen Umwelteinflüssen ausgesetzt, denen sie durch entsprechende Abwehrmaßnahmen begegnen müssen (siehe Abbildung I.1).



Abbildung I.1: *A. thaliana* mit einer Auswahl an biotischen und abiotischen Stressfaktoren.

Wichtige abiotische Faktoren, die auf Pflanzen als photosynthese-aktive Lebewesen aus der Umwelt einwirken, sind vor allem Veränderungen von Lichtqualität und -quantität, Temperatur, Wasser- und Mineralstoffangebot, aber auch das Vorhandensein von Luftschadstoffen, wie beispielsweise Schwefeldioxid oder Ozon. Im Boden werden toxische Effekte vor allem durch Chemikalien, Schwermetalle und andere Xenobiotika wie Herbizide hervorgerufen.

Zu den biotischen Umweltfaktoren zählen Phytopathogene, Herbivore und Symbionten sowie benachbarte Pflanzen, die am Standort um die vorhandenen Ressourcen konkurrieren (Nürnberger *et al.*, 2001). Der Angriff von Pflanzenpathogenen kann unterschiedliche Krankheitssymptome auslösen. Dabei entstanden im Laufe der Evolution für jede Spezies spezifische Wege, um Wirtspflanzen zu befallen, die alle mit der exogenen Penetration durch das Pathogen beginnen. Im Anschluss an die Penetration der Pflanzenorgane erfolgt eine der drei hauptsächlich zu beobachtenden Nutzungsarten von pflanzlichem Gewebe als Substrat. Hierbei werden die nekrotrophe Lebensweise, bei der die Pflanzenzelle abgetötet wird, von einer biotrophen Strategie, bei der die Zellen überleben, voneinander differenziert. Im dritten Fall, der Hemibiotrophie, erhält das Pathogen die pflanzlichen Zellen vorerst am Leben und tötet sie erst in einem späteren Stadium der Pathogenese ab. Als Pathogenese wird der Prozess der Infektion, der Kolonisation und der Reproduktion des Pathogens bezeichnet.

Unter den Pflanzen-pathogenen Mikroorganismen nehmen die Pilze eine bedeutende Stellung ein. Beispielsweise produzieren einige nekrotrophe Spezies Zellwand-degradierende Enzyme oder wirtsspezifische Toxine, die nur in einigen Pflanzenarten aktiv sind. Biotrophe Pilze müssen dagegen einen hohen Grad der Spezialisierung auf eine bestimmte Pflanzenspezies aufweisen, da sie die lebende Pflanzenzelle für die eigene Nährstoffzufuhr nutzen. Auch konnte nachgewiesen werden, dass biotrophe Pilze eine Veränderung der hormonellen Balance innerhalb der befallenen Wirtspflanze bewirken können, um die Pflanzenzellen möglichst lange vor dem Absterben zu bewahren. Hemibiotrophe Pilze dagegen kombinieren eine biotrophe Phase ihrer Nahrungszufuhr mit einer ihr folgenden nekrotrophen Phase.

Viren werden ebenfalls zu den Pflanzenpathogenen gezählt. Es existieren mehr als 40 Familien von phytopathogenen DNA- und RNA-Viren. Die an den viral infizierten Pflanzen sichtbaren Symptome umfassen eine Gelbfärbung des Gewebes (Chlorosen), die Braunfärbung oder die Bildung von mosaikartigen Mustern, bis hin zu einer Verkrüppelung der gesamten Pflanze. Dabei sind Pflanzenviren biotroph und begegnen im Laufe der Pathogenese drei hauptsächlich Herausforderungen, um letztendlich die gesamte Pflanze zu besiedeln, der Replikation in einer infizierten Pflanzenzelle, der Ausbreitung durch den

Befall von benachbarten Zellen sowie des Apoplasten und der negativen Regulierung der Wirts-eigenen Abwehrmechanismen. Der Transport von Viruspartikeln zwischen Zellen findet (symplastisch) über Plasmodesmata statt. Im Falle von längeren Transportwegen dient das Phloem der Delokalisierung von Partikeln oder Nucleinsäuren viralen Ursprungs. Eine weitere biotische Quelle, von der Pflanzenkrankheiten ausgehen können, stellen die mehr als 20 unterschiedlichen Gattungen von Nematoden dar, die nahezu immer das Wurzelsystem der entsprechenden Pflanze infizieren. Hierbei sind sämtliche parasitäre Nematoden obligat biotroph und besitzen einen Pilus, mit dem sie die pflanzliche Zellwand sowie die Plasmamembran penetrieren können. Die Absonderung von Sekreten in die pflanzliche Zelle bewirkt eine erhebliche Veränderung des zelleigenen Metabolismus. Sobald die Nährstoffzufuhr über die Wirtszelle erfolgt, verlieren die Nematoden ihre Motilität und bleiben sesshaft. Gleichzeitig bewirkt die Anwesenheit der Nematoden eine partielle Auflösung der Zellwände bis hin zur Verschmelzung der Protoplasten zweier benachbarter Zellen.

Neben den Nematoden lebt und vermehrt sich eine große Anzahl von Insektenpezies auf Wirtspflanzen. Man kann diese grob in zwei Kategorien von Herbivoren einteilen, wobei die einen das Blattmaterial fressen und die anderen Flüssigkeit aus Pflanzen saugen. Hinzu kommt die indirekte Schädigung der Pflanzen durch die Übertragung von Pflanzenpathogenen Viren direkt in das vaskuläre Gewebe der Wirtspflanze. An den penetrierten Pflanzenorganen entstehen so bevorzugte Angriffsstellen für nekrotrophe Pilze und Bakterien.

Die in der vorliegenden Arbeit im Testsystem *A. thaliana* und *P. syringae* verwendeten Pflanzenpathogene gehören zu den Bakterien. Die meisten Pflanzen-pathogenen Bakterien sind gram-negative Stäbchen der Gattungen *Xanthomonas*, *Erwinia* und *Pseudomonas*. Die Pathogen-Wirts-Interaktion ist für den Fall einer bakteriellen Infektion von Pflanzen durch zwei Charakteristika gekennzeichnet. Zum einen besiedeln Bakterien die Interzellularräume der verschiedenen Pflanzenorgane sowie das Xylem und zum anderen bewirken sie an den befallenen Pflanzen Gewebekrosen, was zu sichtbaren Symptomen wie einer Braunfärbung, einer Dehydratisierung des pflanzlichen Gewebes und zu einer Bildung von Geschwüren führt. Dies erfolgt durch die Sekretion von Toxinen, extrazellulären Polysacchariden (EPS) oder Zellwand-degradierenden Enzymen während der Pathogenese. Eine die Bakterienkolonien vollkommen umhüllenden EPS-Schicht ist wichtig für die bakterielle Virulenz, indem die EPS-Ablagerungen die Interzellularen oder das Xylem blockieren. Die oben erwähnten pektolytischen Enzyme spalten die Polymere der pflanzlichen Zellwand entweder durch Hydrolyse (Polygalacturonasen) oder durch  $\beta$ -Elimination (Pectat- oder Pectin-Lyasen) und zählen auch zu den Virulenzfaktoren.

## 2. Pflanzliche Resistenzmechanismen

Die genetischen Grundlagen für eine induzierte Abwehrreaktion sollen hier zuerst im Allgemeinen behandelt und nachfolgend am Wirtspflanze-Pathogen-Interaktionssystem *A. thaliana* / *P. syringae* besprochen werden.

Ein pathogener Organismus, der zu einer Ausbildung von Krankheitssymptomen auf einer suszeptiblen Wirtspflanze führt, wird als virulent bezeichnet, die Pflanze-Pathogen-Interaktion ist demzufolge kompatibel (Somssich *et al.*, 1998). Die meisten Pflanzen sind allerdings gegen die Mehrzahl von Pathogenen resistent, da sie keine Wirte für diese darstellen. Die Pflanze ist demnach nicht suszeptibel und das Pathogen nicht virulent. Diese Resistenz wird als Nichtwirtsresistenz bezeichnet und besteht sowohl aus präformierten Abwehrbarrieren als auch aus induzierbaren Abwehrreaktionen (Mysore und Ryu, 2004). Einige Phytopathogene haben allerdings Mechanismen entwickelt, um die Basisresistenz durch so genannte Pathogenitätsfaktoren zu überwinden oder durch Suppressoren zu unterdrücken. Die Pflanzen wurden demnach zu Wirtspflanzen und koevolvierten im Gegenzug die Sorten-spezifische oder Wirtsresistenz (Heath *et al.*, 2000b; Rausher *et al.*, 2001). Die Wirtsresistenz wird nochmals in die horizontale (polygene) und vertikale (monogene) Resistenz unterteilt (Agrios *et al.*, 1997). Die horizontale Resistenz wird auch als generelle, unspezifische oder Feldresistenz bezeichnet. Dabei ist eine Wirtspflanze gegenüber allen Rassen eines Pathogens resistent, was sich in einer verringerten Infektionsrate und einem langsameren Wachstum des Pathogens zeigt. Die zweite Form der Wirtsresistenz ist die Rassen-spezifische vertikale Resistenz. Ein Modell für die spezifische Resistenz eines Wirtes gegen ein Phytopathogen liefert die „Gen-für-Gen“-Hypothese nach Flor (1971).

Die „Gen-für-Gen“-Hypothese beschreibt die genetischen Grundlagen von Anfälligkeit und Resistenz in einer Pflanzenart gegenüber Stämmen eines Pathogens. Sie wurde abgeleitet aus Untersuchungen des Wirts-Pathogen-Interaktions-Systems Flachs (*Linum usitatissimum*) mit dem Rostpilz (*Melampsora lini*, Fink *et al.*, 1990). Entsprechend der Hypothese wird eine spezifische Resistenz durch die Interaktion von pflanzlichen Resistenzgenprodukten mit den Avirulenzgenprodukten des Pathogens determiniert. Eine Rassen-spezifische Resistenz wird nur dann erreicht, wenn die Wirtspflanze zu dem jeweiligen dominant vererbten Avirulenzgen (*Avr*-Gen) des Pathogens das komplementäre ebenfalls dominant vererbte Resistenzgen (*R*-Gen) trägt. Mit anderen Worten sind Wirtslinie-Pathogen-spezifische Genpaare die Voraussetzung für die Auslösung einer Rassen-Spezifischen Resistenzreaktion. Die Interaktion zwischen einem avirulenten Pathogen und einer resistenten Wirtspflanze wird als inkompatibel bezeichnet. Im Gegensatz hierzu steht die kompatible Wirts-Pathogen-Interaktion, die durch das Fehlen eines oder beider Spezifität-vermittelnden Gene etabliert

wird. Eine direkte molekulare Interaktionen zwischen einem *R*- und dem korrespondierenden *Avr*-Genprodukt konnte beispielsweise zwischen AVR<sub>Pto</sub> aus *Pst* und dem von *Lycopersicon esculentum* gebildeten *R*-Genprodukt Pto, einer Serin-Threonin-Kinase, nachgewiesen werden (Tang *et al.*, 1996). Das Modell dieser direkten „Eins-zu-Eins-Korrespondenz“ zwischen *R*- und AVR-Proteinen gemäß einer Rezeptor-Liganden-Bindung konnte in den meisten Wirts-Pathogen-Interaktionen jedoch nicht bestätigt werden und gilt bereits als Ausnahme (Gomez-Gomez, 2004; van der Hoorn *et al.*, 2002). Ein alternativer indirekt ablaufender Mechanismus der Interaktion zwischen *R*- und AVR-Proteinen wird in der sogenannten „Guard“-Hypothese postuliert (Dangl und Jones, 2001). Gemäß der „Guard“-Hypothese erkennen *R*-Proteine die Aktivitäten mehrerer AVR-Proteine, welche auf ähnliche Weise mit derselben Bindungsstelle in der Pflanzenzelle interagieren (Alfano und Collmer, 2004; Gomez-Gomez, 2004; Quirino und Bent, 2003). Sie detektieren AVR-Protein-induzierte Veränderungen an dieser Bindungsstelle und vermitteln nach erfolgter Erkennung die Einleitung der hypersensitiven Reaktion (HR). Die „Guard“-Hypothese wird durch mehrere Untersuchungen von verschiedenen *R*-/AVR-Proteininteraktionen gestützt. Die Fähigkeit zur Produktion von *R*-Proteinen ist dabei eine Adaptation von Pflanzen auf den Selektionsdruck, den Pathogene über ihre AVR- und andere Effektorproteine auf die Wirtspflanzen ausüben (Alfano und Collmer, 2004). AVR-Proteine dienen den Bakterien zur Invasion in die Wirtszelle, zur Koloniebildung und zur Unterdrückung von Abwehrreaktionen. Auf diese Weise fungieren sie als Virulenzfaktoren (Gomez-Gomez, 2004). Demgegenüber erlangten Pflanzen parallel durch erfolgte Mutationen die Fähigkeit *R*-Proteine zu bilden, welche spezifische AVR-Proteine erkennen und so eine Schlüsselrolle bei der Ausbildung einer Rassen-spezifischen Resistenz spielen. Im Umkehrschluss bedeutet dieser Zusammenhang, dass ohne AVR-Proteine in der Wirtszelle keine Resistenz induziert werden kann. Demzufolge werden AVR- und *R*-Proteine auch als „bifunktionelle Signale“ bezeichnet (Kjemtrup *et al.*, 2000). *avr*- und *R*-Gene sind zum Teil in Genclustern lokalisiert (Staskawicz, 2001).

Zahlreiche *R*- und *avr*-Gene wurden in den letzten Jahren isoliert und charakterisiert (Thatcher *et al.*, 2005). Proteine pflanzlicher *R*-Gene werden aufgrund ihrer strukturellen Merkmale in fünf verschiedene Klassen eingeteilt (Cohn *et al.*, 2001; Bent *et al.*, 1996; de Wit *et al.*, 1997; Ellis *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 2003). Zu ihnen zählen die intrazellulären Proteinkinasen, rezeptorähnliche Proteinkinasen mit einer extrazellulären LRR-Domäne (engl.: Leucin-Rich Repeat), intrazelluläre LRR-Proteine mit einer Nukleotid-Bindungsstelle (engl.: Nucleotide Binding Site, NBS) und einem Leucin-Zipper-Motiv, intrazelluläre NBS-LRR-Proteine mit einer Region mit Ähnlichkeit zur cytoplasmatischen Toll/Interleukin-1-Rezeptor-Domäne (TIR) von Säugern und aus *Drosophila* sowie membrangebundene extrazelluläre LRR-Proteine (Martin, 1999). Die Mehrzahl der *R*-Gene besitzt drei strukturelle Gemeinsamkeiten, die LRR, die NBS und entweder eine TIR- oder eine Leucin-Zipper-

Domäne. Dabei können die LRR die Spezifität der Pathogenerkennung determinieren (Ellis *et al.*, 1998), während die NBS für die Signaltransduktion und die Leucin-Zipper- oder TIR-Domänen für Protein-Protein-Interaktionen zuständig sind (Martin, 1999). Das *A. thaliana*-Genom besitzt mehr als 150 für NBS-LRR-Proteine codierende Gene (Jones, 2001). Auf das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Wirts-Pathogen-Modell und die zugrunde liegende indirekt induzierte Abwehr wird im Folgenden näher eingegangen.

Das Pflanzenpathogen *P. syringae* pathovar *tomato* (*Pst*, Stamm DC3000) gehört zu den gram-negativen, aerob und heterotroph lebenden Bakterien und wird taxonomisch in die Gamma-Untergruppe der *Proteobacteria* eingeordnet. Ursprünglich wurde *Pst* als Verursacher der Fleckenkrankheit auf *L. esculentum* identifiziert. Die nach Infektion auftretenden Symptome sind braunschwarze, nekrotische Blattflecken, die in den meisten Fällen von einer chlorotischen Begrenzung umgeben sind. Auf den unreifen Früchten sind nekrotische Flecken zu beobachten, die mit einer verzögerten Fruchtreife einhergehen. Die Übertragung der Bakterien erfolgt im Allgemeinen über Aerosole und Wasser, wobei ihre Vermehrung im Apoplasten stattfindet. Als Saprophyten sind *Pst* im Stande, auch außerhalb von Pflanzen beispielsweise in der Erde oder auf Blattoberflächen zu überleben (Preston, 2000). *Pst* vermögen auch Pflanzen anderer Familien wie die der *Brassicaceae* und der *Poaceae* zu befallen. In der vorliegenden Arbeit wurde die als genetisches Modellsystem etablierte Ackerschmalwand, *A. thaliana* (*Brassicaceae*), als Wirtspflanze für *Pst* eingesetzt (Preston, 2000). Diese ist als Modellpflanze sehr gut geeignet, da sie über ein kleines diploides Genom, ein schnelles Wachstum und kurze Regenerationszyklen verfügt sowie leicht zu transformieren ist. Die aus diesem Modellsystem gewonnenen Untersuchungsergebnisse wurde mit anderen Wirts-Pathogen-Interaktionen verglichen und konnten zu einem Teil auf landwirtschaftlich genutzte Pflanzen übertragen werden (Anderson *et al.*, 2005).

Die Fähigkeit Wirtspflanzen zu infizieren und in ihnen eine Resistenzreaktion bzw. eine Erkrankung hervorzurufen beruht auf dem Vorhandensein eines Transportsystems, welches bakterielle Effektorproteine in die Pflanzenzelle transferieren kann. Hierbei gelangen bakterielle AVR-Proteine in den Apoplasten und anschließend durch die pflanzliche Zellwand sowie das Plasmalemma in das Cytoplasma der Wirtszelle. Bei diesem Proteinkomplex, der die innere und äußere Bakterienmembran durchspannt, handelt es sich um das HRP-Typ III Protein-Sekretionssystem (TTSS) (Alfano und Collmer, 1997). Neben den phytopathogenen Bakteriengenera *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Xanthomonas*, *Ralstonia* und *Pantoea* besitzen auch die Tier-pathogenen Genera *Salmonella*, *Yersinia*, *Shigella* und *Escherichia* ein TTSS. Das TTSS ist auch hier essentiell für die Virulenz in den verschiedenen Wirten, wobei Mutanten ohne ein Sekretionssystem normalerweise ihre Pathogenität verlieren (Petnicki-Ocwieja *et al.*, 2002; Alfano und Collmer, 2004). Die Injektion von Effektorproteinen in das Cytoplasma der Wirtszelle ist sowohl für die Virulenz als auch für die Induktion einer

Resistenz in Wirtspflanzen notwendig (Alfano und Collmer, 2004). In der vorliegenden Arbeit wurden *Pst* DC3000 zum einen als virulenter und zum anderen als avirulenter Stamm verwendet, wobei nur der avirulente Stamm *avrRPM1* über ein TTSS verfügt. Das Wirts-Pathogen-Interaktionssystem *A. thaliana* / *Pst* ist ein Beispiel für eine indirekte R-/AVR-Proteininteraktion, da eine Erkennung der Avirulenzgenprodukte AVRRpm1 und AVRb durch RPM1, einem pflanzlichen R-Protein, indirekt nach der „Guard“-Hypothese erfolgt. Dabei vermitteln AVRRpm1 und AVRb die Phosphorylierung von RIN4 (RPM1-interagierendes Protein) in *A. thaliana*. Vermutlich handelt es sich dabei um einen negativen Regulator der basalen Resistenz, welcher infolge der Phosphorylierung in seiner Aktivität verstärkt wird und die Unterdrückung der basalen Abwehrmechanismen bewirkt (Thatcher *et al.*, 2005). Ob die Phosphorylierung von RIN4 ausgelöst durch AVRRpm1 und AVRb direkt oder indirekt stattfindet ist unbekannt. RIN4 ist dabei essentiell für die RPM1-abhängige Abwehr, zu der die Restriktion der Bakterienvermehrung sowie die Ausbildung der HR gehören. Es wird vermutet, dass die Phosphorylierung von RIN4 in Abwesenheit von RPM1 die Empfänglichkeit der Pflanze für eine Infektion erhöht und dadurch die Virulenz von *P. syringae* verstärkt wirkt (Alfano und Collmer, 2004). Bei Anwesenheit von RPM1 jedoch wird die RIN4-Phosphorylierung gemäß der „Guard“-Hypothese detektiert, woraufhin Abwehrmechanismen wie die Einleitung der HR induziert werden (Quirino und Bent, 2003). Als Konsequenz der Erkennung der RIN4-Phosphorylierung durch RPM1 und dem daraus resultierenden Selektionsdruck evolvierten die Bakterien die Fähigkeit zur Synthese von AVRRpt2, einem AVR-Protein, welches phosphoryliertes RIN4 eliminiert (Alfano und Collmer, 2004). Auf diese Weise kann die indirekte Erkennung von AVRRpm1 und AVRb durch RPM1 blockiert werden. Die Pflanze passte sich nun ihrerseits durch Synthese eines R-Proteins an, welches die Abwesenheit von RIN4 detektieren kann, nämlich RPS2 (Quirino und Bent, 2003). Somit kann gesagt werden, dass das pflanzliche Protein RIN4 als Zielprotein für unterschiedliche Pathogen-Elicitoren fungiert und dabei von mehr als einem Protein („Guard“) überwacht wird. Die indirekte Erkennung von Avirulenzfaktoren durch RPM1 und RPS2 ist in der Abbildung I.2 dargestellt.



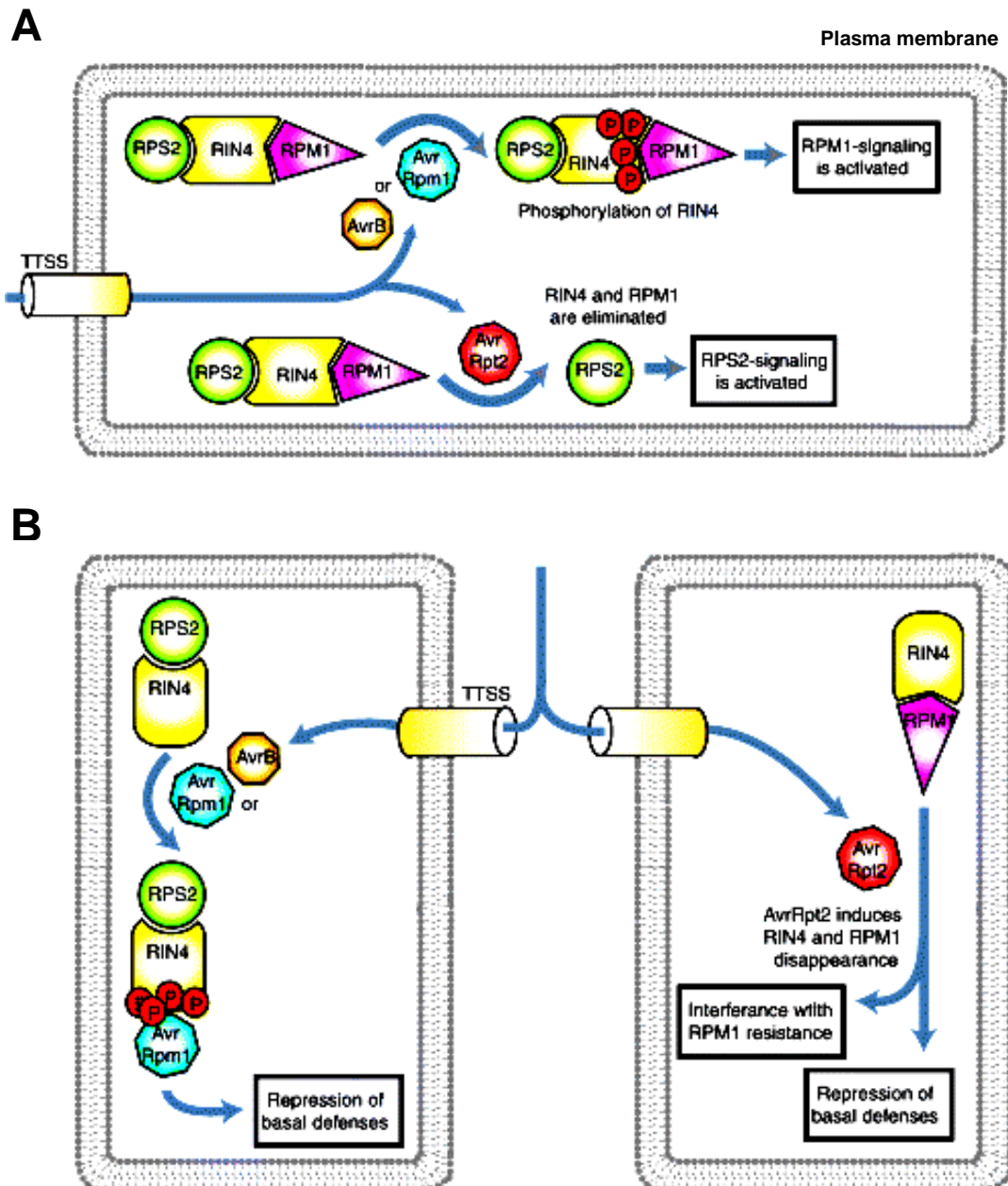


Abbildung I.2: Modell einer indirekten Erkennung von Avirulenzfaktoren durch RPM1 und RPS2. (A) Resistente  $RPM1^+/RPS2^+$ -Pflanze: Die Avirulenzfaktoren gelangen über ein Typ III Protein-Sekretionssystem (TTSS) in das pflanzliche Cytoplasma. AVR $Rpm1$  oder AVR $B$  phosphorylieren daraufhin RIN4. RPM1 detektiert diese Modifikation und aktiviert die RPM1-abhängige Abwehr. Bei Einschleusung von AVR $Rpt2$  eliminiert dieses das phosphorylierte RIN4. Der Vorgang wird von RPS2 detektiert, woraufhin die RPS2-abhängige Abwehr initiiert wird.

(B) Susceptible  $RPM1^-$ -Pflanze: Die Phosphorylierung von RIN4, welche nicht erkannt wird, verstärkt die Aktivität von RIN4 als negativer Regulator der basalen Abwehr, was die Empfänglichkeit der Wirtspflanze verstärkt. Susceptible  $RPS2^-$ -Pflanze: AVR $Rpt2$  hemmt die RPM1-abhängige Abwehr durch Degradierung von phosphoryliertem RIN4 (Quirino und Bent, 2003).

Ausgehend von der Pathogenerkennung in einer pflanzlichen Zelle werden bestimmte Gene über verschiedene Signaltransduktionswege transkriptionell aktiviert. Zusätzlich zu dieser räumlich begrenzten Aktivierung von Pathogen- und Stress-gekoppelten Genen reagieren viele Pflanzen auf die Interaktion mit Mikroorganismen mit einer langsam ablaufenden Aktivierung der Abwehr in nicht infizierten Pflanzenteilen (Dempsey und Klessig, 1994). Neben der lokalen Resistenz (engl.: local acquired resistance) kann es demnach zur Ausprägung einer systemisch erworbenen Resistenz (engl.: Systemic Acquired Resistance, SAR) oder induzierten Immunität kommen. Die Einleitung der SAR findet unabhängig davon statt, ob es sich um eine Nichtwirts- oder Rassen-spezifische Erkennung handelt. Sie ist allerdings an eine bereits erfolgte HR nach einem ersten Pathogenkontakt geknüpft. Die SAR bewirkt eine lang anhaltende systemische Resistenz gegenüber nachfolgenden Infektionen durch eine breite Anzahl von Pathogenen wie Bakterien, Pilze und Viren (Ryals *et al.*, 1996). Beispielsweise zeigen Pflanzen nach Primärinokulation mit einem avirulenten Pathogen eine sich systemisch ausbreitende Resistenz gegen Sekundärinfektionen mit virulenten Pathogenen. Somit ist die Ausbildung einer SAR vergleichbar mit der durch die angeborene Immunität vermittelten adaptiven Immunität bei Tieren.

Eine weitere Form der Resistenz stellt die induzierte systemische Resistenz dar (engl.: Induced Systemic Resistance, ISR). Im Unterschied zur SAR wird die ISR durch bestimmte Stämme von Rhizobakterien, die das Pflanzenwachstum fördern, ausgelöst. Für *A. thaliana* konnte gezeigt werden, dass eine Kolonisierung der Rhizosphäre mit *Pseudomonas fluorescens* des Stammes WCS417r eine nachfolgende Resistenz gegen *Pst* bewirkte, ohne dass typische SAR-Markergene induziert wurden (van Wees *et al.*, 1997; van Wees *et al.*, 1999). SAR-Markergene wurden erst nach einem erneuten Pathogenbefall exprimiert, hier aber schneller und stärker als in der Pathogen-induzierten Abwehrreaktion. Dabei erfolgt die Signaltransduktion SA-unabhängig, erfordert aber die Sensitivität für Jasmonsäure (JA) und Ethylen (Knoester *et al.*, 1999). Es wird angenommen, dass diese Art der Resistenz durch die Aufeinanderfolge von Jasmonat- und Ethylen-Signalen reguliert wird, da die ISR in *jar1*-Mutanten auch durch Ethylen induziert werden kann (Pieterse *et al.*, 1998).

### **3. Abwehrreaktionen der Pflanze**

Einer Vielzahl von Phytopathogenen stehen eine Reihe pflanzlicher Verteidigungsmechanismen gegenüber. Man unterscheidet hierbei die präformierte oder passive Abwehr von den induzierbaren Verteidigungsantworten (Thatcher *et al.*, 2005). Zur präformierten Abwehr zählen strukturelle Besonderheiten der Pflanzenabschlussgewebe. Durch diese wird eine Infektion, beispielsweise ausgelöst durch invasive Pathogene, erschwert. Mittels lipophiler Blattüberzüge, verstärkter lokaler Verholzung, einer entsprechenden Anzahl und Beschaffenheit von Stomata -welche die natürlichen Zugänge für Pathogene darstellen- oder

der Ausbildung von Trichomen begegnen die Pflanzen den entsprechenden Phytopathogenen. Eine weitere mechanische Barriere bietet die Anwesenheit von Substanzen wie Suberinen auf den Oberflächen pflanzlicher Organe oder auch im Inneren der Pflanzengewebe. Suberine sind außerdem antimikrobiell wirksam (Hammond-Kosack und Jones, 1996).

Die Voraussetzung für die Initialisierung von Signaltransduktionskaskaden, die zur Auslösung von Abwehrreaktionen führen, ist eine vorherige Erkennung von Elicitoren (Bonas und van den Ackerveken, 1999) durch pflanzliche Rezeptoren, die Plasmamembran-ständig oder im Cytosol lokalisiert sind (de Wit, 1997; Grant, 1999). Dabei werden Rassen-spezifische und generelle Elicitoren unterschieden. Die Rassen-spezifischen Elicitoren sind Produkte von *Avr*-Genen. Bei den generellen Elicitoren handelt es sich um strukturell verschiedenartige Substanzen (Scheel, 1998). Die generellen Elicitoren können weiterhin in sowohl exogene als auch endogene Elicitoren eingeteilt werden. Bei den exogenen Elicitoren handelt es sich zumeist um Oberflächenstrukturen der pathogenen Organismen (Hammond-Kosack und Jones, 1996) oder von einem phytopathogenen Organismus sekretierte Substanzen, die auch in die Pflanzenzellen eindringen können (Jia *et al.*, 2000). Die Hauptkomponenten dieser Sekrete bilden Oligosaccharide (Sharp *et al.*, 1984), Peptide (Nürnberg *et al.*, 1994), Glyko- oder Lipoproteine und auch Fettsäuren (Parker *et al.*, 1991). Ein Beispiel für einen bakteriellen Elicitor ist das Flagellin, der hauptsächliche Bestandteil der bakterieneigenen Flagellen (Felix *et al.*, 1999). Zu den endogenen Elicitoren zählen pflanzliche Zellwandbruchstücke, die durch hydrolytische Enzyme aus den Pflanzenorganen herausgelöst werden (Farmer *et al.*, 1991).

Zu den induzierbaren Mechanismen gehören alle Abwehrreaktionen, die durch Phytopathogene initiiert werden und in nicht befallenen Pflanzen daher nicht auftreten. Man unterscheidet sehr schnelle (innerhalb von Minuten ablaufende), schnelle (über Stunden andauernde) und langsame (Tage bis Monate anhaltende) Reaktionen einer Pflanze auf einen Pathogenbefall. Die Papillenbildung zählt beispielsweise als physikalisch wirkender Mechanismus am Eintrittsort des Pathogens zu den induzierbaren Abwehrreaktionen. Hierbei kommt es unmittelbar nach dem Pathogenbefall zu einer Kallosebildung und Einlagerung phenolischer Verbindungen wie Lignin und Suberin zwischen dem Plasmalemma und der Zellwand direkt an der Penetrationsstelle (Kauss, 1985). Zusätzlich werden die strukturellen Eigenschaften des pflanzlichen Abschlussgewebes verbessert, z.B. durch eine verstärkte Lignifizierung der Zellwände, durch die Einlagerungen von Glykoproteinen (Keller, 1993) oder die verstärkte Vernetzung der Zellwände durch Peroxidasen (Otte und Barz, 2000). Außerdem existieren Mechanismen, die in den Zellsaftvakuolen als Glykoside zwischengelagerte antimikrobielle Substanzen freisetzen, die erst nach dem Eindringen des Pathogens das biologisch aktive Aglykon abspalten, wie z.B.

Lactone, Phenole, Saponine, Cyanide, Schwefelverbindungen, Acetophenone und Stilbene (Osborn, 1996). Ebenso zu den induzierten Abwehrreaktionen gehören die Bildung von Phytoalexinen, die im Folgenden besprochene Generierung reaktiver Sauerstoff-Spezies (engl.: Reactive Oxygen Species, ROS) während des oxidativen „burst“, die Ausbildung einer HR und die verstärkte Expression von PR-Proteinen (engl.: Pathogenesis Related). Virulente und avirulente Pathogenstämme (s. o.) lösen ähnliche Abwehrmechanismen aus, letztere jedoch früher (Tao *et al.*, 2003). Die Ausbildung einer HR ist spezifisch für Infektionen mit avirulenten Pathogenen.

Eine häufige Folge einer *R*-Gen aktivierten Resistenzreaktion nach erfolgter Pathogenerkennung ist der zelluläre Suizid durch die Ausbildung einer HR (Heath *et al.*, 2000a; Lam *et al.*, 2001). Hierbei kommt es innerhalb weniger Stunden nach Infiltration des Pathogens zu einer Akkumulation von ROS und Stickstoffmonoxid (NO). Es resultieren ein irreversibler Verlust der Semipermeabilität der Plasmamembran, die Freisetzung von phenolischen Substanzen, ein lokal begrenzter Zelltod und die Ausbildung von Nekrosen am Infektionsort. Der eingeleitete programmierte Zelltod führt zum Absterben von pflanzlichem Gewebe in der Umgebung des Infektionsorts und verhindert auf diese Weise die Weiterverbreitung des Pathogens (Buchanan *et al.*, 2000). Die HR wird von der Aktivierung einer großen Anzahl von Abwehrgenen begleitet. Die von den infizierten Zellen produzierten Signalmoleküle spielen wiederum eine Rolle bei der Induktion weiterer Abwehrmechanismen. Die Bedeutung des hypersensitiven Zelltods bei der Induktion von PR-Genen und der Ausprägung der SAR konnte anhand verschiedener *A. thaliana*-Mutanten aufgeklärt werden. „lesion mimic“-Mutanten (oder: lesions simulating disease resistance response, *lsd1*) besitzen eine verminderte CAT1-(Katalase) Aktivität. *Lsd1* codiert für einen Transkriptionsfaktor mit Zinkfingerdomäne, welcher als negativer Regulator des Zelltods fungiert (Dietrich *et al.*, 1997). Die peroxysomale Katalase besteht aus den drei Untereinheiten CAT1 bis CAT3. Infolge des Defektes zeigen *lsd1*-Pflanzen nach einem Übergang von Kurz- zu Langtag-Lichtperioden oder während kontinuierlicher Photoperioden auch in Abwesenheit von Pathogenen sich ausbreitende HR-ähnliche Läsionen aufgrund der cytotoxischen Wirkungen von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und Superoxid ( $O_2^{\bullet}$ ) (Glazebrook, 1999). Nach Jabs *et al.* (1997) ist dagegen  $O_2^{\bullet}$  und nicht  $H_2O_2$  nötig und sogar ausreichend, um in *A. thaliana* die Ausbildung von chlorotischen und nekrotischen Läsionen sowie die mRNA-Akkumulation von PR1 zu induzieren. Demnach kann  $O_2^{\bullet}$  seine Funktion als Signalmolekül im Rahmen der Verteidigungsantwort unabhängig von  $H_2O_2$  vermitteln (Jabs *et al.*, 1997). Zusätzlich sind diese Mutanten nicht in der Lage, den Zelltod während der HR infolge einer Infektion mit avirulenten Pathogenen zu begrenzen (Mateo *et al.*, 2004).

Transkripte von PR-Genen akkumulieren lokal zum Teil bereits einige Minuten bis wenige Stunden nach einer Infektion oder der Behandlung mit Elicitoren. Ihre Bildung gehört somit zu den frühen Reaktionen der Pflanze auf einen Pathogenbefall (Somssich und Hahlbrock,

1998). Die Wirkung von frühen PR-Proteinen kann durch eine Bildung von später systemisch generierten sekundären Signalstoffen wie SA, JA und Ethylen sowohl lokal als auch in nicht infizierten Pflanzenteilen verstärkt werden (s. u.). PR-Proteine wurden ursprünglich als Tabak-Mosaik-Virus-induzierte Proteine definiert. Erst nach Entdeckung strukturell ähnlicher Proteine in anderen Pathosystemen wurde der Begriff PR-Proteine auf diese ausgeweitet (van Loon, 1997). Zu ihren Charakteristika zählen die Toleranz extremer pH-Werte, die Resistenz gegen Proteasen und ihr geringes Molekulargewicht. PR-Proteine werden in 14 verschiedene Familien eingeteilt (PR1 bis PR14) (Kombrink und Somssich, 1995; van Loon und van Strein, 1999), von denen im Folgenden einige vorgestellt werden. Die sauren Formen der Proteine des Typs PR1 werden in den Interzellularraum sekretiert, die basischen dagegen akkumulieren in der Vakuole der Pflanzenzelle. PR1-Proteine konnten u. a. in *A. thaliana* nachgewiesen werden. Es ist bekannt, dass die PR-Proteine der Familie 2, die 1,3- $\beta$ -Glucanasen, *in vitro* antifungale Wirkung zeigen. Sie wurden ebenfalls in *A. thaliana* beobachtet und zeigen eine starke Akkumulation nach Pathogenbefall (Delp und Palva, 1999). Zur dritten Familie der PR-Proteine zählen die Chitinasen, die ebenfalls das pilzliche Wachstum hemmen, indem sie Chitin ( $\beta$ -1,4-N-Acetylglucosamin) als Hauptkomponente der pilzeigenen Zellwand hydrolysieren (Schlumbaum *et al.*, 1986). Eine antifungale Wirkung besitzen die basischen, in der Vakuole lokalisierten Isoformen der Glucanasen (Familie 2) und Chitinasen (Familie 3), während den kaum antifugal wirksamen sauren Chitinasen eine Rolle bei der Ausprägung der SAR zugewiesen wird (Kombrink und Somssich, 1995). Zur Familie 5 der PR-Proteine zählen die Thaumatin-ähnlichen Proteine sowie die Osmotine, die in *A. thaliana* nach Pathogeninfektion, Behandlung mit Abscisinsäure- und Ethylen, nach Salz- und Trockenstress sowie nach Verwundung gefunden wurden (Hu und Reddy, 1997; Capelli *et al.*, 1997). PR5-Proteine besitzen antifungale Wirkung, die im Falle des Zeamatins (PR5-Protein aus Mais) auf eine Permeabilisierung der pilzlichen Membran zurückgeführt wird (Vigers *et al.*, 1991; Kombrink und Somssich, 1995; van Loon und van Strein, 1999). Zu den antimikrobiellen Peptiden zählen auch die bereits erwähnten Defensine, z.B. PR12 (van Loon und van Strein, 1999).

Neben den PR-Proteinen akkumulieren weitere Proteine, die aus Stress-aktivierten Genen resultieren. Beispielsweise werden vermehrt Calmodulin-Gene exprimiert, deren Produkte Calcium-bindende Proteine mit multifunktionellem Regulationspotential darstellen. Zielstrukturen der Calmoduline sind dabei verschiedene Enzyme wie NAD-Kinasen,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen und Proteinkinasen (Snedden und Fromm, 1998; Lewit-Bentley und Rety, 2000). Die verschiedenen Isoformen dieser Proteine sind durch die Regulation des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels an der Sensibilisierung sowie Desensibilisierung abiotischer und biotischer Reize beteiligt. Durch die transiente Änderung der Permeabilität der Plasmamembran kommt es zur Öffnung von Ionenkanälen, hierbei erfolgt ein  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{H}^+$ -Einstrom und ein  $\text{K}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Ausstrom. Die Ionenflüsse über der Plasmamembran sind als sehr frühe Prozesse nach

der erfolgten Signalperzeption detektierbar. Als ein Bindeglied zwischen der Elicitorperzeption und den nachfolgenden Ionenflüssen werden heterotrimere G-Proteine diskutiert, deren Existenz in *A. thaliana* gezeigt werden konnte (Joo *et al.*, 2005).

Eine Erkennung der Elicitoren durch die pflanzlichen Rezeptoren vermittelt die schnelle und transiente Phosphorylierung von spezifischen Kern-eigenen, cytosolischen oder Membran-gebundenen Proteinen über Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen). Hierbei bewirkt ein erhöhter intrazellulärer  $Ca^{2+}$ -Spiegel die Auslösung von Proteinphosphorylierungskaskaden, die die wichtigsten posttranskriptionellen Regulationsmechanismen darstellen. Bei der Signaltransduktion spielen sowohl MAP-Kinasen (Jabs *et al.*, 1997; Ligterink *et al.* 1997; Stratmann *et al.*, 1997) als auch Calcium-aktivierte Proteinkinasen eine Rolle (Romeis *et al.*, 2000), wobei die Signale über sukzessiv ablaufende Phosphorylierungsprozesse weitergeleitet werden (Hirt, 2000; Ligterink *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2001). Dieser Teil des Signaltransduktionsweges wird als ein Knotenpunkt in der Spezifizierung der einzelnen Abwehrreaktionen diskutiert (Romeis *et al.*, 2000). Eine direkte Beteiligung von MAP-Kinasen in der Pathogenabwehr wurde für *Nicotiana tabacum* gezeigt. Die konstitutive Expression von NtMEK2, einer MAP-Kinase, führt zu einem HR-ähnlichen Zelltod und der Expression von Abwehrgenen (Yang *et al.*, 2001). Für *A. thaliana* konnte die über eine MAP-Kinase-Kaskade vermittelte Resistenzausbildung gegenüber bakteriellen und pilzlichen Pathogenen nachgewiesen werden (Asai *et al.*, 2002).

Nach Pathogenattacken, Elicitorbehandlung und Verwundung akkumulieren Enzyme, die an der Bildung von Signalen oder Phytoalexinen beteiligt sind (Geerts *et al.*, 1994; Royo *et al.*, 1996). Hierzu zählen die Lipoxygenasen (LOX, Rosahl, 1996) und die Phospholipasen. Die LOX-vermittelten entstandenen Hydroperoxide können unter anderem in den Peroxygenase-, Hydroperoxid-Lyase- sowie Allenoxidsynthese-Weg eingehen und führen zur Synthese verschiedener enzymatisch wie auch nicht-enzymatisch generierter Oxylipine (Blee, 1998; Göbel *et al.*, 2001). Auf die Bildung einiger Oxylipine wird im Folgenden näher eingegangen. Eine Regulierung der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase erfolgt ebenso durch diverse äußere Stimuli wie durch Pathogenbefall, Elicitoren, UV-Bestrahlung, Kälte und Verwundung (Weisshaar und Jenkins, 1998). Die Phenylalanin-Ammoniak-Lyase ist ein Enzym des Phenylpropan-Stoffwechsels und der Ausgangspunkt für die Synthese von zahlreichen phenolischen Komponenten wie Flavonoide, Anthocyane und Tannine. Diese haben Bedeutung als Schutz gegen biotischen und abiotischen Stress, als Pigmente, aber auch als Signalsubstanzen (Logemann *et al.*, 1995; Dixon, 2001). Zu einer induzierten biochemischen Verteidigung gehört auch die Produktion von antimikrobiell wirkenden Phytoalexinen, wobei die Bezeichnung Phytoalexin sowohl phenolische Substanzen, Terpene und Polyacetylene als auch Fettsäurederivate einschließt. Zur Bildung von Phytoalexinen kommt es durch unterschiedliche Stressbedingungen, in erster Linie aber nach Infektion durch Pilze (Pedras *et al.*, 2000).

Es wurde gezeigt, dass NO und möglicherweise auch die NO-Synthase eine Rolle in der Pflanzenabwehr gegen mikrobielle Schädlinge spielen. Die Freisetzung von NO tritt dabei innerhalb von Minuten auf, ähnlich wie beim oxidativen „burst“ während der HR (Huang *et al.*, 2004). NO wird hauptsächlich mittels Reduktion von Nitrat gebildet und spielt im pflanzlichen Stoffwechsel eine Schlüsselrolle, da es an einer Vielzahl von physiologischen Funktionen beteiligt ist. Zu diesen gehört die inter- und intrazelluläre Signalübertragung für die Auslösung von zahlreichen Zellfunktionen einschließlich der angeborenen Immunität. Aufgrund der geringen Größe des NO-Moleküls kann es frei diffundieren. Seine biologischen Eigenschaften sind durch seine chemische Reaktivität gegenüber Sauerstoff (O<sub>2</sub>), ROS und Metallen festgelegt. Erste Hinweise auf eine säugetierähnliche NO-Synthase in Pflanzen wurden von Cueto *et al.* (1996) publiziert. Während der Pathogen-Interaktion induziert NO in *A. thaliana* zahlreiche Abwehrgene und bewirkt die verstärkte Bildung von Proteinkinasen, Phosphatasen, PR-Proteinen, Peroxidasen und Gluthathion-S-Transferasen (Polverari *et al.*, 2003). Notwendig für die Signaltransduktion ist hierbei die Interaktion von NO mit Rezeptorproteinen. Die Signalkette ist abhängig von der direkten Wirkung von NO und von Botenstoffen wie zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) und zyklischer Adenosindiphosphat-Ribose (cADPR). NO scheint hierbei, wie in der tierischen Immunabwehr über cGMP und cADPR, die Signaltransduktion zu aktivieren, wenn auch in Pflanzen nicht alle Komponenten des tierischen Systems nachgewiesen werden konnten (Durner und Klessig, 1999; Klessig *et al.*, 2000). Außerdem wurde ein synergistischer Effekt von ROS, NO und SA bei der Auslösung der Pathogenabwehr bestätigt (McDowell *et al.*, 2000). In *NahG*-Pflanzen, die ein bakterielles Salicylat-Hydroxylase-Gen (*NahG*) exprimieren, induziert NO die JA-Produktion und die Expression von JA-responsiven Genen, was auf einen antagonistischen Effekt von SA auf JA hinweist. Eine JA-Behandlung führt zu verstärkter NO Produktion, was auf eine JA/NO-Schleife hindeutet (Huang *et al.*, 2004).

Der Begriff „oxidative burst“ wurde in Analogie zum „respiratory burst“ bei der tierischen Pathogenabwehr etabliert (Wientjes und Segal, 1995). Hierbei versteht man unter dem oxidativem „burst“ oder unter oxidativem Stress ein Ungleichgewicht zwischen der Erzeugung und Entgiftung von ROS (Salin *et al.*, 1987; Asada 1994; Palmer und Paulson, 1997). Dieses Ungleichgewicht entsteht durch verschiedene abiotische Einflüsse wie Ozon und Schwefeldioxid, Schwermetalle, Hitze- und Kältestress, intensives Licht und eine dadurch verursachte Photo-Inhibition, Trockenheit oder ROS-generierende Herbizide wie Paraquat. Ebenso tritt während der Seneszenz oxidativer Stress auf (Berger *et al.*, 2001). Biotische Reize stellen eine weitere Ursache einer verstärkten ROS-Generierung dar. Hierzu zählen die Verwundung durch Herbivoren sowie der Befall durch Phytopathogene. Nach der Erkennung eines Pathogens kommt es in Pflanzen zu einer vermehrten Bildung und Akkumulation von extrazellulären ROS, wie O<sub>2</sub><sup>•-</sup> und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (s. u.). Der Anstieg der ROS-

Konzentration kann biphasisch auftreten, wobei innerhalb weniger Minuten ein erster schwächerer Anstieg direkt an der Angriffsstelle des Pathogens statt findet, der sowohl in der kompatiblen als auch in der inkompatiblen Interaktion auftritt, und ein zweiter ROS-Anstieg, der nach einigen Stunden folgt, nur in der inkompatiblen Interaktion auftritt und im Zuge der HR zum Absterben der Pflanzenzelle führt (Feys und Parker, 2000). Subletale ROS-Dosen erhöhen die Widerstandsfähigkeit von Pflanzen gegen biotischen und abiotischen Stress und führen zu verringertem Wuchs (Vranova *et al.*, 2002). ROS alleine appliziert sind nicht in der Lage, die volle Ausprägung der Resistenzreaktionen zu induzieren. Im Zusammenspiel mit NO potenziert sich ihre aktivierende Wirkung, was einen synergistischen Effekt dieser beiden Signalmolekültypen belegt. Es scheint jedoch zwei separate Signalwege zu geben, da auch NO alleine Abwehrreaktionen induzieren kann (Delledonne *et al.*, 1998).

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wirkt dabei nicht nur als aggressives Agens, sondern spielt aufgrund seiner verglichen mit anderen ROS relativen Langlebigkeit und guten Membranpermeabilität eine wichtige Rolle als Signalmolekül. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wird beim oxidativen „burst“ am Infektionsort in größeren Mengen durch die resistente Wirtspflanze aktiv erzeugt und besitzt die im Folgenden beschriebenen Funktionen (Mehdy, 1994; Mehdy und Brodl, 1998; Alvarez *et al.*, 1998): Erstens wirkt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vor allem im Verbund mit Lipidperoxiden toxisch gegenüber invasiven Schädlingen. Zweitens ist H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Substrat bei der Quervernetzung von Zellwandbestandteilen und damit Voraussetzung für die Verstärkung von Zellwänden im Rahmen der präformierten Abwehr. Drittens führt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Konzentrationen über einem bestimmten Schwellenwert zusammen mit anderen Signalen zum programmierten Zelltod und spielt eine Rolle als Signalmolekül bei der Ausbildung der SAR (Dangl *et al.*, 1996; Alvarez *et al.*, 1998). In *A. thaliana* konnte gezeigt werden, dass einem lokal eng begrenzten oxidativem „burst“ eine Staffel kleinerer, aufeinander folgender, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generierender „microbursts“ im entfernteren Gewebe folgt, bei dem die NADPH-Oxidasen (s. u.) in die Wiederholung und Fortpflanzung des Signals eingebunden sind. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bewirkt die Induktion von Schutzgenen in der Pflanze wie beispielsweise die der Glutathion-S-Transferase und Glutathionperoxidase (Levine *et al.*, 1994). Anhand von transgenen Pflanzen wurde die Bedeutung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei der Etablierung der Pathogenresistenz intensiv untersucht. Beispielsweise zeigten *Solanum tuberosum*-Pflanzen, die das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generierende Enzym Glucose-Oxidase konstitutiv exprimierten, eine erhöhte Resistenz gegenüber *Erwinia carotovora subsp. carotovora* (Wu *et al.*, 1995). An dieser Stelle soll auf die O<sub>2</sub><sup>•-</sup>- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Erzeugung mittels NADPH-Oxidasen näher eingegangen werden.

Durch Mutanten-Analysen wurde eine Beteiligung der NADPH-Oxidase an der pflanzlichen O<sub>2</sub><sup>•-</sup>- und somit der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion gezeigt. Eine Analogie zwischen dem Modell einer Generierung von ROS in Pflanzen während des oxidativen „burst“ und dem NADPH-Oxidase-System in Tieren wurde aufgezeigt (Apel und Hirt, 2004). Das erste in Pflanzen identifizierte NADPH-Oxidase-Gen war *OsrbohA*, das in *Oryza sativa* vorkommt und



Homologie mit der katalytischen Untereinheit *gp91<sup>phox</sup>* aus Säugetieren aufweist (Groom *et al.*, 1996). Weiterführende Studien erbrachten die Identifizierung anderer *Rboh*-Gene (engl: Respiratory burst oxidase homolog) in anderen Pflanzenspezies, wie *Lycopersicon*, *Nicotiana*, *Solanum* und *Arabidopsis* (Torres *et al.*, 1998; Keller *et al.*, 1998; Yoshioka *et al.*, 2001; Yoshioka *et al.*, 2003; Simon-Plas *et al.*, 2002). Zwei *Rboh*-Proteine konnten in der Plasmamembran lokalisiert werden (Keller *et al.*, 1998; Simon-Plas *et al.*, 2002) wobei sie die ROS-Produktion und die Ausbildung der HR regulieren können (Kawasaki *et al.*, 1999). In *A. thaliana* wurden 10 *Atrboh*-Gene identifiziert, deren Genprodukte eine vermutlich cytosolisch lokalisierte 300-Aminosäuren-Aminoterminal-Bindestelle für  $Ca^{2+}$ -Ionen besitzen, was auf eine direkte Regulierung der *Rboh*-Oxidasen über  $Ca^{2+}$  hindeutet (Keller *et al.*, 1998). So konnte die Existenz von *Rboh*-Homologen nachgewiesen werden, was auf eine pflanzliche  $O_2^{\bullet-}$ -generierende NADPH-Oxidase hindeutet. Diese unterscheidet sich allerdings von Säugetier-eigenen *gp91<sup>phox</sup>*, bezogen auf die Struktur ihrer Untereinheiten und ihrer Aktivierung (Sagi und Fluhr, 2001). Bei der Regulation der *Rboh*-Funktionen scheinen heterotrimere G-Proteine und auch Phosphorylierungsprozesse involviert zu sein (Chen *et al.*, 2004). Der genetische Beweis für die Notwendigkeit von *Rboh* während des Pathogen-induzierten oxidativen „burst“ wurde durch Untersuchungen an *Rboh*-Mutanten erbracht. Die Infektion von *A. thaliana*-Mutanten mit funktionellen Defekten der *AtrbohD*- und *AtrbohF*-Proteine machte deutlich, dass *AtrbohD* für nahezu die Gesamtheit der ROS-Produktion im Apoplasten nach Pathogenbefall mit avirulenten Bakterien (*Pst avrRPM1*) oder Oomyceten verantwortlich ist, wobei *AtrbohF* notwendig für die Auslösung der HR ist (Torres *et al.*, 2002). Die systemische Resistenzbildung nach vorheriger Infektion mit avirulenten Bakterien konnte durch die Anwendung von Diphenyliodonium, eines NADPH-Oxidase-Inhibitors, blockiert werden (Alvarez *et al.*, 1998). Die Reduzierung der ROS-Bildung im Vergleich zum Wildtyp *Col-0*, findet in *atrbohF*-Pflanzen verglichen mit *atrbohD* in schwächerem Ausmaß statt, was anschließend zu einer ebenfalls geringeren Abschwächung der HR-Symptome führt (Torres und Dangl, 2005). Weiterhin besteht eine funktionelle Überlappung der unterschiedlichen *Rboh*-Proteine. Beispielsweise sind in *atrbohD/F*-Doppelmutanten die Phänotypen von *atrbohD*- und *atrbohF* verstärkt sichtbar (Torres *et al.*, 2002; Kwak *et al.*, 2003). Exogen applizierte ROS wirken synergistisch in einer signal-verstärkenden Schleife mit SA (Shirasu *et al.*, 1997). Dem entgegen wurde in *atrbohD* kürzlich eine antagonistische Wirkung von ROS und SA beobachtet, wobei die HR auf die Infektionsstelle lokal beschränkt wurde (Torres und Dangl, 2005). Außerdem sind aufeinander abgestimmte Konzentrationen an ROS und NO notwendig für die Auslösung einer HR, was belegt, dass über *Atrboh* produzierte ROS unterschiedliche Funktionen in unterschiedlichen Zusammenhängen vermitteln (Delledonne *et al.*, 2001). Es wird daher ein komplexes Signal-Netzwerk postuliert, in dem ein Zusammenspiel diverser Mitglieder der *Rboh*-Familie miteinander stattfindet und diese auch in andere Signalwege involviert sind.

#### 4. Die Signaltransduktion bei der Pathogenabwehr

Die Biosynthese des Signalmoleküls SA führt von Phenylalanin über Zimt- und Benzoesäure zur Salicylsäure (Lee *et al.*, 1995). Es kann sich eine Glykosylierungsreaktion anschließen, so dass ein Salicylsäure- $\beta$ -Glycosid als inaktive Speicherform gebildet wird (Ryals *et al.*, 1996). Durch Untersuchungen an *A. thaliana* wurde deutlich, dass die Induktion der SA-Synthese und deren Akkumulation nicht nur notwendig sondern auch ausreichend ist, um die SAR auszuprägen (Dempsey *et al.*, 1994; Sticher *et al.*, 1997; Dong, 1998). Die Notwendigkeit von SA wird durch den Ausfall der SAR in *NahG*-Mutanten von *A. thaliana* deutlich (Lawton *et al.*, 1995). *NahG*-Pflanzen exprimieren das Enzym Salicylsäure-Hydroxylase aus *Pseudomonas putida*, das die SA-Akkumulation durch Umwandlung von SA zu Catechol verhindert. Die von *R*-Genen aktivierte Abwehr ist in *NahG* geschwächt (Hammerschmidt, 1999). Mit Hilfe dieser Mutanten konnte außerdem gezeigt werden, dass chemische SA-Analoga, die ebenfalls SAR induzieren können wie 2,6-Dichlorisonikotinsäure oder Benzothiadiazol über denselben Signalweg wirken wie SA selbst (Shah *et al.*, 1997). *A. thaliana*-Mutanten, die ein Hybrid-Gen aus zwei bakteriellen Genen der Salicylsäure-Biosynthese exprimieren, besitzen einen erhöhten cytosolischen SA-Gehalt und eine erhöhte Resistenz (Mauch *et al.*, 2001). Lange Zeit wurde angenommen, dass die SAR ausschließlich über das Signalmolekül Salicylsäure vermittelt wird. Pfropfungsexperimente mit *NahG*-Pflanzen lieferten allerdings Evidenz dafür, dass SA zwar notwendig für die Expression der SAR-Markergene PR1, PR2 und PR5 ist, nicht jedoch das Signal darstellt, das zur Vermittlung der systemischen Resistenz in *A. thaliana* transportiert wird (Uknes *et al.*, 1992). Trotz der Transportmöglichkeit über das Phloem (Shulaev *et al.*, 1995; Vernooij *et al.*, 1994) konnte gezeigt werden, dass SA in nicht infizierten Sprossachsen und Blattvenen auch *de novo* synthetisiert wird (Smith-Becker *et al.*, 1998). Ob SA ein mobiles Signal bei der Auslösung der SAR darstellt, wird kontrovers diskutiert. In Mutanten-Screenings wurde die *A. thaliana*-Mutante *dir1* (engl.: *defective in induced resistance*) identifiziert. *dir1* zeigt zum Wildtyp ähnliche lokale Resistenz gegenüber virulenten und avirulenten Stämmen der Gattung *Pseudomonas*, kann allerdings keine PR-Gene in systemischen Pflanzenorganen induzieren und keine SAR etablieren (Metraux, 2001). *dir1* codiert für ein apoplastisch lokalisiertes Lipidtransferprotein, das die Produktion eines mobilen Signalstoffes (vom lokalen zum systemischen Gewebe) vermittelt (Suzuki *et al.*, 2004). Mutanten, die einen direkten Einfluss auf die SA-Biosynthese haben wie *sid1* und *sid2* (engl.: *salicylic acid-induction deficient*) zeigen einen ähnlichen Phänotyp wie *NahG*-Pflanzen sowie eine fehlende SA-Akkumulation bei erhöhter Pathogenanfälligkeit und verdeutlichen damit die Bedeutung, die SA in der SAR-Ausprägung einnimmt (Nawrath und Metraux, 1999).

Neben der über SA vermittelten Genaktivierung existieren parallel SA-unabhängige Verteidigungsantworten. Hierbei spielen die Phytohormone Ethylen und JA sowie von JA

abgeleitete Derivate eine bedeutende Rolle (Pieterse und van Loon, 1999). Beispielsweise kann während der HR nach Pathogenbefall und Verwundung ein Anstieg der Ethylen- und Jasmonat-Konzentrationen beobachtet werden (Chang und Shockey 1999). Auch wurde nach der Inokulation von *A. thaliana* mit dem nicht pathogenen Pilz *Alternaria brassicicola* die sowohl lokale als auch systemische Akkumulation des Defensins PDF1.2 beobachtet, das unabhängig von SA, aber abhängig von JA und Ethylen induziert wird (Penninckx *et al.*, 1996; Penninckx *et al.*, 1998).

JA entsteht Verwundungs- oder Elicitor-vermittelt aus  $\alpha$ -Linolensäure über den LOX- und Jasmonatweg analog zur Prostaglandin-Biosynthese in Säugetieren (Creelman und Mullet, 1995). Ein erhöhter JA-Gehalt bzw. exogen applizierte JA führen unter anderem zu einer transkriptionellen Aktivierung von Genen, die mit der pflanzlichen Abwehr verknüpft sind. Die Bedeutung der JA für die Genaktivierung, den Signaltransduktionsweg und die Interaktionen zwischen dem SA-abhängigen und -unabhängigen Weg wurden mit Hilfe von diversen Mutanten aufgeklärt. Zu den JA-defizienten Mutanten zählen die „triple *fad*“-Mutanten (engl.: *fatty acid dehydrogenase*; *fad3-2*, *fad7-2*, *fad8*), die keine dreifach ungesättigten Fettsäuren und damit auch keine JA synthetisieren können sowie eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber dem Bodenpathogen *Pythium mastophorum* zeigen. Durch die exogene Zugabe von JA kann deren ursprüngliche Resistenz wieder hergestellt werden (McConn *et al.*, 1997). In der *coi1*-Mutante (engl.: *coronatine-insensitive*), einer in der JA-Perzeption beeinträchtigten Mutante, führt die exogene Applikation von JA dagegen nicht zu einem Schutz gegen *P. mastophorum* (Vijayan *et al.*, 1998). Auch ist auf der *coi1*-Mutante *Alternaria brassicicola* virulent. Bei dem *coi1*-Genprodukt handelt es sich um ein LRR-Protein, das an der Ubiquitylierung von Proteinen beteiligt ist und somit den Proteinabbau steuert (Xie *et al.*, 1998). Weitere Mutanten mit Defekten in der Jasmonatkaskade sind die JA-insensitiven Mutanten *jar1* (engl.: *jasmonate-resistant*) sowie *jin1* und *jin4* (engl.: *jasmonate-insensitive*), die Veränderungen in der Aktivierung Jasmonat-regulierter Gene aufweisen (Berger *et al.*, 1996; Staswick *et al.*, 1998).

Bisher lassen sich drei Signaltransduktionswege definieren: Neben der SA-abhängigen Aktivierung von PR1, PR2 und PR5 (Ryals *et al.*, 1996) existieren eine JA/Ethylen-abhängige Aktivierung des pflanzlichen Defensins, PDF1.2 und eine an JA gekoppelte ISR (siehe Abbildung I.3). Da keines der beschriebenen Modelle die Gesamtheit der Wirtspflanze-Pathogen-Interaktion erklären kann, liegt die Vermutung nahe, dass es sich nicht um lineare Signaltransduktionsketten sondern um Netzwerke handelt, die über die verschiedenen Signalkomponenten reguliert werden (Genoud und Metraux, 1999). In der Literatur werden in einer Vielzahl von Studien sowohl synergistische (van Wees *et al.*, 2000) als auch antagonistische Effekte von SA- und JA bei der Ausbildung der pflanzlichen Resistenzen belegt (Reymond und Farmer, 1998).

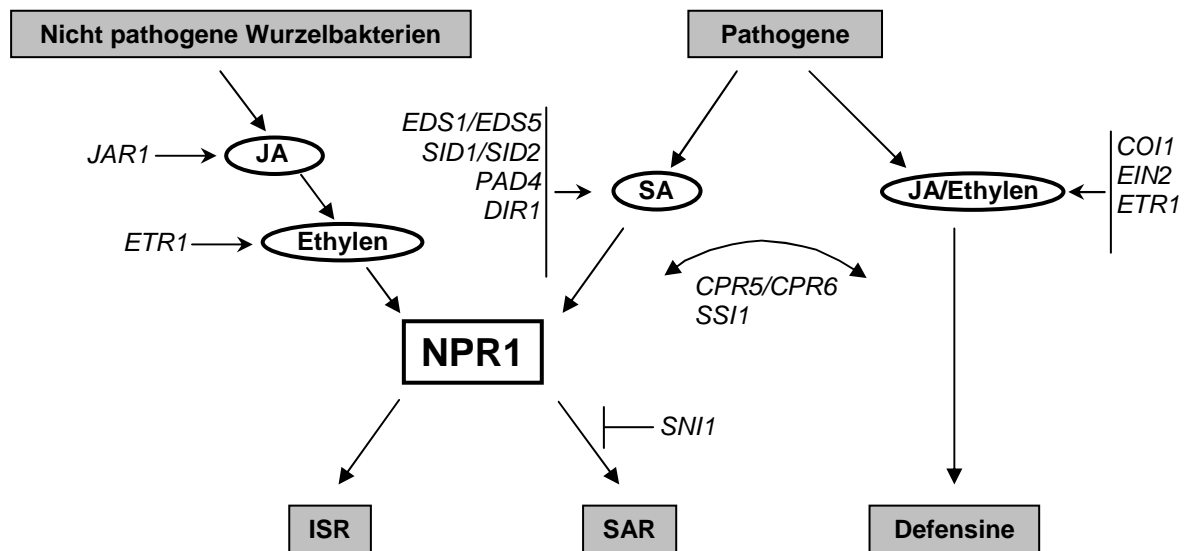


Abbildung 1.3: Dargestellt sind verschiedene Signaltransduktionswege, die über die Signalmoleküle SA, JA und Ethylen zu zwei Arten der systemischen Resistenz führen. Die Proteine, die induzierend oder reprimierend auf diese Wege einwirken, sind durch Mutanten in *A. thaliana* identifiziert worden und als dreibuchstabile Abkürzungen dargestellt sowie im Text erklärt. Die Abbildung wurde leicht verändert von Feys und Parker (2000) übernommen.

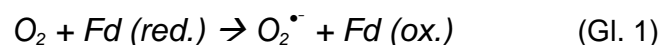
*A. thaliana* reagiert auf die Infektionen mit dem nekrotrophen Bakterium *Erwinia carotovora* mit der Expression von Ethylen-, JA- und SA-responsiven Genen gleichzeitig, wobei es zu einer simultanen Aktivierung der SA-abhängigen SAR und der JA- sowie Ethylen-abhängigen ISR kommt (van Wees *et al.*, 2000). Die Signalmoleküle wirken hier regulativ auf die Signaltransduktion der anderen Signale. Beispielsweise inhibieren Ethylen und SA die Expression von JA-responsiven Genen, während SA eine Anzahl Ethylen-responsiver Gene aktiviert (Norman-Setterblad *et al.*, 2000). Weitere genetische Ansätze geben Hinweise auf Verbindungen zwischen den Signalwegen. Es konnte gezeigt werden, dass der Regulationsfaktor NPR1 sowohl an der SA-abhängigen PR-Gen-Expression als auch an einer JA- und Ethylen-abhängigen Resistenz beteiligt ist (Pieterse *et al.*, 1999; van Wees *et al.*, 2000). Dagegen scheint SA keinen Anteil an der Resistenzausprägung gegen *Alternaria* oder *Pythium* zu haben, da sowohl *NahG*- als auch *npr1*-Pflanzen keine veränderte Suszeptibilität zeigen (Penninckx *et al.*, 1998). In *NahG* konnte weiterhin eine verstärkte Bildung von JA und die Expression von JA-responsiven Genen nach Infektion durch biotrophe Pathogene nachgewiesen werden, was darauf hin deutet, dass eine Pathogen-induzierte SA-Akkumulation die JA-Akkumulation und die Expression JA-responsiver Gene inhibiert (Spoel *et al.*, 2003). Eine synergistische Wirkung von JA und SA konnte dadurch gezeigt werden, dass die *ssi1*-Pflanzen alle Defekte von *npr1*-Pflanzen kompensieren können und das JA-abhängige PDF1.2-Protein in SA-abhängiger Weise exprimiert wird

(Shah *et al.*, 1999). Damit kann *Ssi1* einen NPR1-unabhängigen Signalweg regulieren. Dies lässt darauf schließen, dass *Ssi1* eine Rolle bei der Verknüpfung der SA-vermittelten Signalwege und der Ethylen/JA-Signaltransduktion spielt (Nandi *et al.*, 2003). Weiterhin konnte in Microarray-Analysen die synergistische Wirkung von Ethylen und Jasmonat-Signalwegen nachgewiesen werden. Ein Großteil der durch Ethylen induzierten Gene wurde auch durch Methyljasmonat induziert (Schenk *et al.*, 2000). Mittels Microarray-Analysen von Mutanten mit Defekten in der SA-, JA- und/oder Ethylen-Signaltransduktion konnte nach Infektion mit virulenten Bakterien beobachtet werden, dass SA und JA antagonistisch wirken, JA und Ethylen generell synergistisch arbeiten und dass SA und Ethylen häufig antagonistisch wirken (Thatcher *et al.*, 2005).

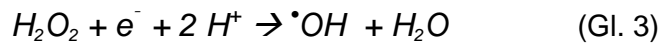
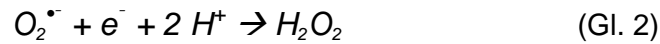
## 5. Bildungsmechanismen von reaktiven Sauerstoffspezies

Seit der Freisetzung von molekularem Sauerstoff in die Erdatmosphäre durch photosynthetisch aktive Organismen vor etwa 2,7 Millionen Jahren wird das aerobe Leben von ROS begleitet (Halliwell und Gutteridge, 1989). Zu den ROS zählen Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ), Superoxid-Radikale ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ),  $\text{H}_2\text{O}_2$  und andere Peroxide (ROOH) sowie das extrem reaktive und deshalb kurzlebige Hydroxyl-Radikal ( $^{\bullet}\text{OH}$ ). Diese im Vergleich zu  $\text{O}_2$  sehr reaktionsfreudigen Moleküle entstehen in verschiedenen Organellen als Nebenprodukte im Zell-Stoffwechsel. ROS unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Bildungswege, ihrer Toxizität und der für ihre Detoxifikation notwendigen Antioxidantien.

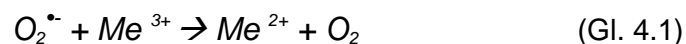
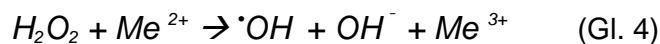
Die primär in einem oxidativen „burst“ erzeugte RO-Spezies ist  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (Halbwertszeit 2 bis 4  $\mu\text{s}$ ), das in lebenden Zellen im Equilibrium mit seiner protonierten Form dem Hydroperoxyl-Radikal ( $^{\bullet}\text{O}_2\text{H}$ ) vorliegt (Wojtaszek, 1997). Das Hydroperoxyl-Radikal ist hydrophober als  $\text{O}_2^{\bullet-}$  und kann Lipidmembranen leichter penetrieren und diese im Gegensatz zu  $\text{O}_2^{\bullet-}$  auch passieren. Das Superoxid-Anion-Radikal entsteht aus  $\text{O}_2$  durch die Übertragung von nur einem Elektron, wenn im zellulären Metabolismus Elektronenakzeptoren in ungenügender Konzentration zur Verfügung stehen. Dies kann auf enzymatischem Wege über Flavoprotein-Dehydrogenasen oder auch nicht-enzymatisch durch Autoxidation von Substraten wie beispielsweise Ferredoxinen, Hydrochinonen, Thiolen oder reduzierten Hämproteinen ablaufen. Insbesondere wenn die Verfügbarkeit von NADPH wegen geringer interner  $\text{CO}_2$ -Konzentration und gleichzeitiger hoher Lichtintensität eingeschränkt ist, findet in den Chloroplasten eine Übertragung der Elektronen von reduziertem Ferredoxin (Fd) direkt auf den Sauerstoff statt (siehe Gleichung 1, Gl. 1: Mehler-Reaktion; Mehler 1951; Noctor und Foyer, 1998).



Das resultierende  $O_2^{\bullet -}$  kann schrittweise zu weiteren reaktiven ROS reduziert werden. Die Bildung von  $H_2O_2$  erfolgt hierbei spontan oder katalysiert durch einen Plasmamembran-gebundenen NADPH-Oxidase-Komplex (s. o.) sowie eine apoplastische Superoxid-Dismutase (Gl. 2 und 3). Dabei ist  $O_2^{\bullet -}$  im Vergleich zu  $H_2O_2$  instabiler, weniger toxisch und besitzt eine geringere Membranpermeabilität.



$H_2O_2$  besitzt eine moderate Reaktionsfähigkeit und ist ein relativ langlebiges Molekül mit einer biologischen Halbwertszeit von 1 ms, was die Delokalisierung von seinem Entstehungsort mittels Diffusion erlaubt. Aufgrund seines hohen Oxidationspotentials (+1,77 V) wirkt  $H_2O_2$  vor allem durch die Oxidation von Thiol-Gruppen Enzym-schädigend und kann Enzyme des Calvin-Zyklus sowie Superoxid-Dismutasen inaktivieren (Bowler *et al.*, 1994). Dagegen besitzt das  $\bullet OH$  eine besonders hohe Reaktivität und vermag mit den meisten organischen Verbindungen zu reagieren. Das  $\bullet OH$  besitzt eine fast Diffusionskontrollierte Umsatzrate und hat dabei eine Halbwertszeit von  $10^{-9}$  s (Wojtaszek, 1997). In der pflanzlichen Zelle existieren zwei Möglichkeiten für die Bildung dieses Radikals. Zum einen kann  $H_2O_2$  durch in Spuren auftretende, katalytisch wirksame, zweiwertige Metallionen ( $Me^{2+}$ ) reduziert werden, wobei mittels der Fenton-Reaktion das  $\bullet OH$  und das oxidierte Metallion ( $Me^{3+}$ ) entstehen (Gl. 4). Die Regeneration der oxidierten Metallionen erfolgt mittels Reduktion durch  $O_2^{\bullet -}$  (Gl. 4.1). Die Übergangsmetalle fungieren somit als Katalysatoren. Ihre Lokalisierung und Verfügbarkeit in der Pflanzenzelle stellt den limitierenden Faktor für eine über die Fenton-Reaktion generierte Menge an  $\bullet OH$  dar (Kaim und Rall, 1996).



Außerdem kann nach der Haber-Weiss-Reaktion eine gemeinsamen Redoxreaktion von  $H_2O_2$  und  $O_2^{\bullet -}$  statt finden (Gl. 5; Haber und Wilstätter, 1931; Haber und Weiss, 1934).



Unter normalen Bedingungen tritt die Haber-Weiss-Reaktion in pflanzlichen Organismen allerdings nur mit geringer Geschwindigkeit und mit geringer Ausbeute an  $\bullet OH$  auf (Wojtaszek, 1997). Da die Pflanze keine enzymatische Entgiftungsmöglichkeit für  $\bullet OH$  besitzt, führt eine verstärkte Produktion letztendlich zum Zelltod.

Eine weitere Quelle von ROS in Pflanzen stellt Ozon dar. Durch Reaktionen von Ozon mit Ethylen oder anderen Alkenen im Apoplasten entstehen  $O_2^{\bullet -}$ ,  $\bullet OH$  und  $\bullet O_2H$  (Buchanan *et al.*, 2000). Ozon reagiert in wässriger Umgebung mit Thiol-Gruppen, Aminen, phenolischen

Verbindungen der Zellwand, aber auch mit ungesättigten Fettsäuren der Zellmembran. Ozon produziert auf diese Weise ROS, Aldehyde und organische Radikale. Makroskopisch werden ozonbedingte Schäden vor allem durch das Auftreten von punktförmigen Nekrosen infolge eines lokal begrenzten Zelltods sichtbar (Langebartels *et al.*, 2000).

Darüber hinaus können ROS durch Pigment-vermittelten Energietransfer entstehen.  $^1\text{O}_2$  entsteht infolge von UV-Bestrahlung oder im Falle hoher Lichtintensitäten und limitierend wirkender  $\text{CO}_2$ -Assimilation in einem als Photo-Inhibition bezeichneten Prozess (siehe Abbildung I.4). Einige Vertreter der in dieser Arbeit untersuchten OH-FS werden mittels Lipidperoxidation durch  $^1\text{O}_2$  gebildet.

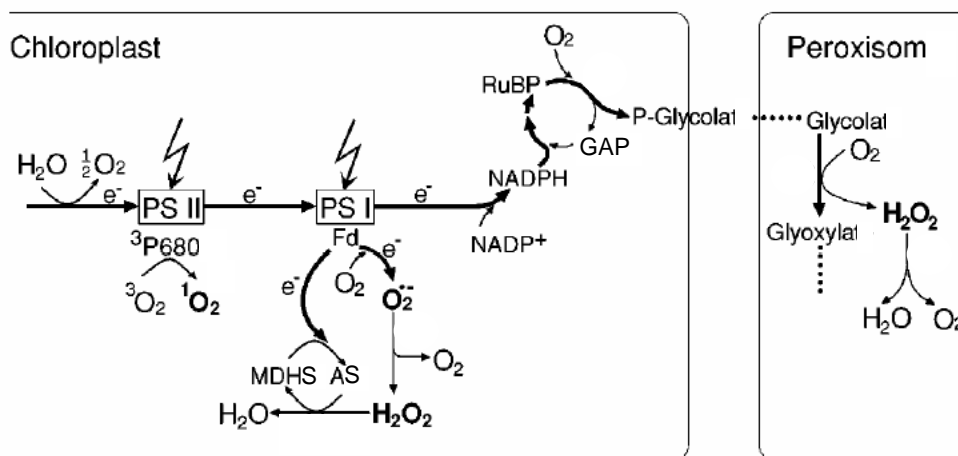


Abbildung I.4: Schematische Darstellung des Elektronen-Transports unter Starklicht-Bedingungen, wobei ROS in den Chloroplasten und den Peroxisomen entstehen. Es können zwei Wege genutzt werden, um einen Elektronenüberschuss zu verhindern: a) die Reduktion von  $\text{O}_2$  zu  $\text{O}_2^-$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Photosystem I (PS I). b) die Rubisco-Oxygenase-Reaktion und die Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in den Peroxisomen während der Photo-Respiration. Bei Starklicht-Bedingungen entsteht verstärkt  $^1\text{O}_2$  in PS II.

Ascorbinsäure (AS), Monodehydroascorbat (MDHS), Ribulose-1,5-Bisphosphat (RuBP), Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP). Die Abbildung wurde leicht verändert von Apel und Hirt (2004) übernommen.

Die Photo-Inhibition tritt vor allem dann auf, wenn eine entsprechende Nutzung der durch die photosynthetisch aktiven Pigmente absorbierten Energie verhindert ist oder in vermindertem Maße stattfindet. Pigmentmoleküle wie beispielsweise Chlorophyll, Protochlorophyllid, Uro- oder Coproporphyrinogen III können unter solchen Umständen verstärkt photosensibilisierend wirken. Hierbei gehen sie aus dem reaktionsträgen Grund- oder Singulett-Zustand ( $^0\text{S}$ ) zuerst in den angeregten Singulett-Zustand ( $^1\text{S}$ , Gl. 6) und nachfolgend in den sehr reaktiven Triplett-Zustand ( $^1\text{T}$ , Gl. 7) über. Dabei wird die überschüssige Anregungsenergie eines Photons beispielsweise vom angeregten Triplett-Chlorophyll nicht mehr auf das Reaktionszentrum des Photosystems II übertragen, sondern

auf molekularen Sauerstoff unter Bildung von reaktivem  $O_2^{\bullet-}$  (Lüttge *et al.*, 1999). In angeregtem Zustand sind Pigmentmoleküle demnach in der Lage, Radikale direkt zu erzeugen, indem sie zum Beispiel  $O_2$  zu  $O_2^{\bullet-}$  reduzieren (Gl. 8, Typ I-Mechanismus).



Gleichzeitig wird unter diesen Bedingungen der Elektronentransfer vom Photosystem I direkt auf  $O_2$  unter der Bildung von  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$  und  ${}^{\bullet}OH$  stimuliert (Foyer *et al.*, 2003; Pfannschmidt, 2003). Somit stellt die Stroma-exponierte reduzierende Seite des Photosystem I eine wichtige Quelle der univalenten Sauerstoffreduktion in den Chloroplasten dar. Hierbei haben insbesondere die Eisen-Schwefel-Proteine Anteil an der Bildung von  $O_2^{\bullet-}$  (Asada, 1994). Andererseits können Photo-Sensibilisatoren im angeregten Triplett-Zustand ihre Anregungsenergie auch auf  $O_2$  übertragen. Mittels des sogenannten Typ II-Mechanismus, geht dieser aus dem relativ reaktionsträgen Triplett-Zustand ( ${}^3O_2$ ) in den sehr reaktiven Singulett-Zustand ( ${}^1O_2$ ) über (Gl. 9; Salin, 1987).

Sauerstoff-Spezies		Bildungsweg
Molekularer Sauerstoff (Triplett-Grundstadium)	${}^3O_2$	häufigste Form von $O_2$
Singulett Sauerstoff (erster angeregter Singulett-Zustand)	${}^1O_2$	UV-Strahlung, Photo-Inhibition, Photosystem II $e^-$ -Transfer-Reaktionen
Superoxidanion-Radikal	$O_2^{\bullet-}$	mitochondrialer $e^-$ -Transfer, Mehler-Reaktion in Chloroplasten, glyoxysomale Photo-Respiration, Oxidation von Paraquat, Reaktion von $O_3$ mit $OH^-$ im Apoplasten, Pathogenabwehr
Wasserstoffperoxid	$H_2O_2$	Photorespiration, $\beta$ -Oxidation, Dismutierung von $O_2^{\bullet-}$
Hydroxyl-Radikal	${}^{\bullet}OH$	Dismutierung von $O_3$ im Apoplasten, aus Peroxiden über Fenton Reaktion
Perhydroxyl-Radikal	${}^{\bullet}O_2H$	Reaktion von $O_3$ mit $OH^-$ im Apoplasten
Ozon	$O_3$	UV-Strahlung in Stratosphäre, Reaktionen unter Beteiligung von Verbrennungsprodukten fossiler Brennstoffe und UV-Strahlung in Troposphäre

Tabelle I.1: ROS und deren Entstehung (Tabelle verändert nach Buchanan *et al.*, 2000).

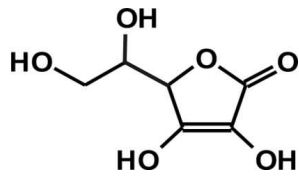


$^1\text{O}_2$  reagiert rasch mit verschiedenen organischen Molekülen und bildet durch Addition an ungesättigte Kohlenstoffbindungen Hydroperoxide und Endoperoxide. Dabei beträgt seine Halbwertszeit in Wasser 4  $\mu\text{s}$  und in einer unpolaren Umgebung 100  $\mu\text{s}$  (Foyer und Harbinson, 1994). Eine Übersicht über ROS sowie deren Entstehungsmöglichkeiten ist in Tabelle I.1 dargestellt.

## 6. Antioxidative Schutzmechanismen in Pflanzen

Kein Zweifel besteht in der potentiell cytotoxischen Wirkung von ROS, welche im Falle einer HR zum induzierten Zelltod und damit zur Begrenzung der Vermehrung von biotrophen Pathogenen genutzt wird. Das unkontrollierte Auftreten von ROS hat dagegen die Peroxidation von Lipiden der zelleigenen Membranen zur Folge. Hieraus ergeben sich eine erhöhte Rigidität sowie ein Funktionalitätsverlust der Pflanzenmembranen (Montillet *et al.*, 2004). Neben der Schädigung von Lipiden vermitteln ROS die Denaturierung von Proteinen sowie DNA-Strangbrüche und die Oxidation von Polysacchariden. Da ROS und ihre Folgeprodukte außerdem, in Abhängigkeit von ihrer Halbwertszeit im pflanzlichen Gewebe, nicht nur die unmittelbare Umgebung ihres Entstehungsortes sondern auch weiter entfernte Regionen der Zelle schädigen können, haben Pflanzen als Anpassung an aerobe Lebensbedingungen Schutz- und Entgiftungsmechanismen evolviert. Mit Ausnahme des  $\cdot\text{OH}$  stehen für die Detoxifizierung der anderen ROS in den betroffenen Zell-Kompartimenten enzymatische und nicht-enzymatische Schutzsysteme zur Verfügung (Noctor und Foyer, 1998).

Ein wichtiger Mechanismus regelt das ungefährliche Abführen der in Form von Triplett-Zuständen der Pigmente angestauten Energie. Xanthophylle als Vertreter der Carotinoide sind aufgrund ihrer Molekülstruktur zu strahlungsloser Energiedissipation in Form von Wärme fähig. Dieser Prozess wird als Auslöschen oder "Quenching" der angeregten Zustände bezeichnet.  $^1\text{O}_2$ , der mit Carotinoiden aber auch mit  $\alpha$ -Tocopherol direkt reagieren kann, wird auf diese Weise deaktiviert (Edge *et al.*, 1997). Carotinoide und Hydrochinone können zusätzlich mit  $\text{O}_2^{\cdot-}$  reagieren und es auf diese Weise entgiften. Tocopherole spielen eine besonders wichtige Rolle beim Schutz vor Oxylipin-Radikalen in Membranen, da hier das in wässrigem Milieu operierende Ascorbat-Glutathion-System (s. u.) nicht effektiv arbeiten kann. Sowohl reduziertes Ascorbat als auch Glutathion können nicht-enzymatisch mit den verschiedenen ROS reagieren oder fungieren als Substrate von enzymatischen Reaktionen. Die Lipidperoxide als Folgeprodukte der ROS werden auf gleiche Weise entgiftet (Buchanan *et al.*, 2000). Abbildung I.5 stellt einige Substanzen dar, die auch auf nicht-enzymatischem Weg als Antioxidantien wirksam sind.



Ascorbinsäure

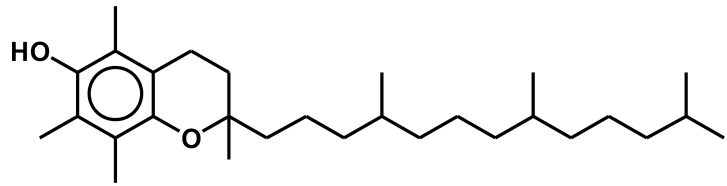
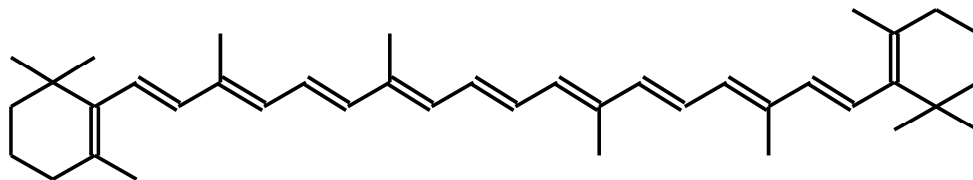
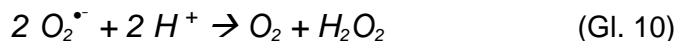
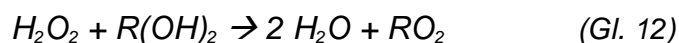
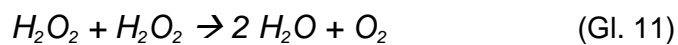
 $\alpha$ -Tocopherol $\beta$ -Carotin

Abbildung 1.5: In Pflanzen vorkommende nicht-enzymatisch wirksame Antioxidantien. Ascorbinsäure ist auch im Ascorbat-Glutathion-Zyklus an enzymatisch ablaufenden Prozessen beteiligt.

Superoxid-Dismutasen (SOD) tragen Kupfer-, Zink-, Eisen- und Manganionen in ihrem aktiven Zentrum. SOD kommen in verschiedenen Isoformen im Cytosol oder den Plastiden sowie in den Mitochondrien und Peroxisomen vor und beschleunigen durch die Übertragung von zwei Protonen die Disproportionierung des  $O_2^{\cdot-}$  in  $H_2O_2$  und Sauerstoff (Gl. 10; Kliebenstein *et al.*, 1998).



Das dabei entstehende, ebenfalls schädliche  $H_2O_2$  kann durch Katalasen (Gl. 11) sowie Peroxidasen (Gl. 12) entgiftet werden. Sowohl die Katalasen als auch die Peroxidasen tragen ein Häm in ihrem aktiven Zentrum (Nocter und Foyer, 1998).



Peroxidasen sind von besonderer Bedeutung für den Abbau von  $H_2O_2$  in den Chloroplasten der Pflanzenzelle, da Katalasen vor allem in den Peroxisomen vorkommen, aber nicht in den Chloroplasten gefunden wurden (Foyer *et al.*, 2003). Obwohl die Chloroplasten sowohl Glutathion als auch die zur Regeneration von reduziertem Glutathion notwendige Glutathion-Reduktase besitzen, scheint die Bedeutung der Glutathion-Peroxidase für die Entgiftung von  $H_2O_2$  in der Pflanze eher gering zu sein. Da Phospholipid-Hydroperoxide durch Glutathion-Peroxidase in Pflanzen entgiftet werden können, scheinen sie eine Funktion beim antioxidativen Schutz von Membranen zu besitzen. Die Phospholipid-Hydroperoxide entstehen hierbei durch die Reaktion von Tocopherolen mit Phospholipid-Peroxy-Radikalen.

Die verschiedenen Isoenzyme der Ascorbat-Peroxidase stellen das erste enzymatische Glied des Ascorbat-Glutathion-Zyklus dar. Sie tragen die Hauptlast bei der Entgiftung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in den Chloroplasten und im Cytosol der Pflanzen. Reduziertes Ascorbat wird dabei zu Monodehydroascorbat umgesetzt, wobei durch Reduktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  gleichzeitig Wasser entsteht. Das erste Oxidationsprodukt Monodehydroascorbat wird unter Verbrauch von NAD(P)H durch die Monodehydroascorbat-Reduktase (MDAR) wieder zu Ascorbat reduziert und somit regeneriert. Aus Monodehydroascorbat entsteht durch eine Disproportionierungsreaktion Didehydroascorbat. Dieses wird durch die Didehydroascorbat-Reduktase wieder in Ascorbat umgewandelt, wobei reduziertes GSH verbraucht und oxidiertes Glutathion (GSSG) gebildet wird. Am Ende dieser Redoxkette steht die Reduktion von GSSG, welche durch die Glutathion-Reduktase (GR) unter Verbrauch von NADPH katalysiert wird. In Abbildung I.6 sind die Reaktionen aus dem Ascorbat-Glutathion-Zyklus schematisch dargestellt.

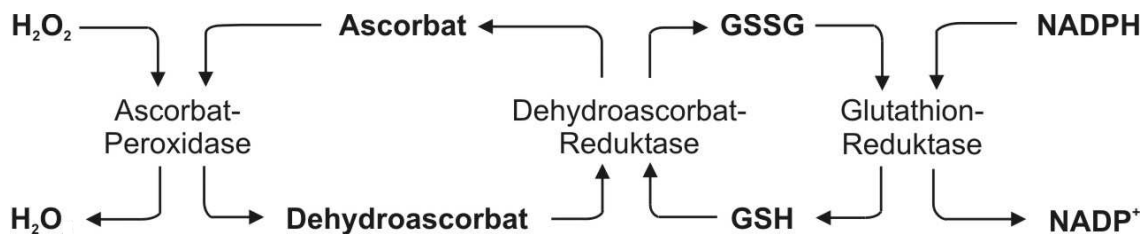


Abbildung I.6: Der Ascorbat-Glutathion-Zyklus: Entgiftung von  $\text{O}_2^*$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$  unter Verbrauch von Ascorbat und Regenerierung von Ascorbat mittels Glutathion und NADPH.

Es werden somit Reduktionsäquivalente aufgewendet, um ROS zu entgiften. Ein erhöhtes Angebot an NADPH trägt dazu bei, die Komponenten der Elektronentransportkette der Photosysteme länger reduziert zu halten und verringert damit die Wahrscheinlichkeit einer verstärkten Radikalbildung aufgrund von Elektronenstau. Somit stehen weniger Reduktionsäquivalente in Form von NADPH für die Fixierung von Kohlenstoff zur Verfügung, die allerdings über den Pentose-Phosphatweg unter Verbrauch von Glucose-6-Phosphat generiert werden (Noctor und Foyer, 1998). Neben den bisher erwähnten antioxidativ wirkenden Enzymen gibt es noch eine Reihe weiterer enzymatisch arbeitender Antioxidantien und Entgiftungs-Enzyme in Pflanzen. Dazu zählt die Glutathion-S-Transferase, die Glutathion mit Xenobiotika konjugiert, um diese dauerhaft in die Vakuole abzulagern. Andererseits haben einige Glutathion-S-Transferasen auch eine schwache GSH-abhängige Peroxidase-Aktivität (Marrs, 1996).

## 7. Synthese von Hydroxy-Fettsäuren

In pflanzlichem Blattmaterial treten Fettsäuren entweder in freier Form auf oder kommen in veresterter Form vor. OH-FS sind eine Klasse von Lipidperoxidationsprodukten, die wie schon erwähnt sowohl auf enzymatischem Wege über LOX (Rosahl, 1996) und  $\alpha$ -Dioxygenasen (Feussner und Wasternack, 2002; Hamberg *et al.*, 2003), als auch auf ROS-vermitteltem Weg entweder radikalisch oder durch  $^1\text{O}_2$  gebildet werden können. Mechanistisch gibt es Unterschiede zwischen den drei Wegen der Lipidperoxidation. Diese Unterschiede begründen sich durch die verschiedenen Ausrichtungen des Spins der ungepaarten Elektronen des  $^3\text{O}_2$ -Grundstadiums sowie des angeregten  $^1\text{O}_2$ -Zustands (Frankel, 1998). Zudem findet die ROS-vermittelte Lipidperoxidation an in Membranlipiden veresterten Fettsäuren statt, die LOX-vermittelte dagegen im Allgemeinen an freien Fettsäuren, welche vermutlich durch Lipasen aus den Membranen freigesetzt wurden (Montillet *et al.*, 2004). Die Gehalte an Membran-veresterten OH-FS sind dabei um das 5- bis 10-fache höher als die freier OH-FS (Göbel *et al.*, 2003).

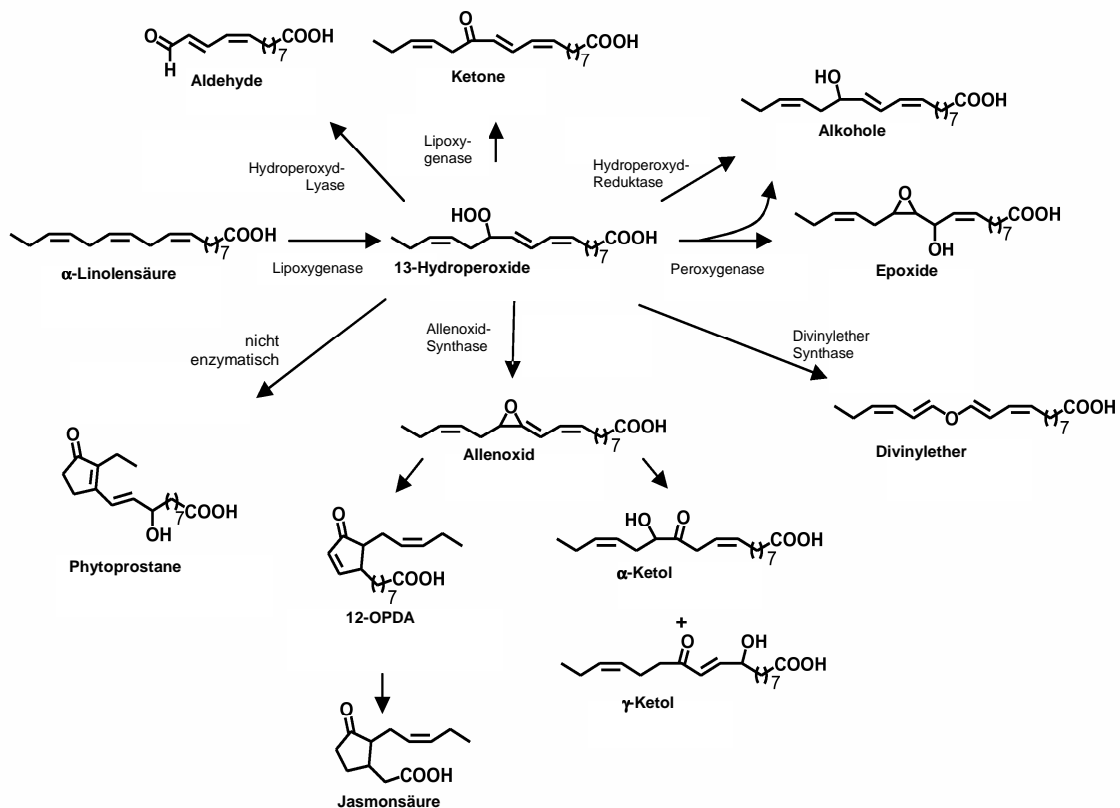


Abbildung I.7: Ausgewählte enzymatisch und nicht-enzymatisch gebildeten Oxylipine ausgehend von aus  $\alpha$ -Linolensäure gebildeten 13-Hydroperoxy-Fettsäuren. Abbildung verändert nach Schulze *et al.* (2006).

Die Hydroxy- sowie die Hydroperoxy-Fettsäuren bilden nur eine Fraktion der aus ungesättigten Fettsäuren gebildeten Oxylipine neben den Di- und Trihydroxy-Fettsäuren, den Endoperoxiden oder Epoxy-Hydroxy-Fettsäuren sowie -Alkoholen, den Ketodienen und Ketotrienen sowie den Alkenalen (Gardner, 1989), welche teilweise auch über enzymatische Reaktionen mittels LOX, Peroxygenasen und Hydroperoxidasen gebildet werden können (siehe Abbildung I.7; Blee, 2002; Schulze *et al.*, 2006). Auf Reaktionen und Umlagerungen, welche aufgrund der Reaktivität der auftretenden Intermediate sowie der ROS stattfinden und die zur Bildung weiterer Produkte neben den Mono-OH-FS führen, wird im Folgenden nicht eingegangen. Nachfolgend sollen die mechanistischen Einzelschritte der Bildung von Hydroxy-Fettsäuren durch LOX, mittels radikalisch ablaufender Reaktion sowie die Lipidperoxidation durch  $^1\text{O}_2$  beschrieben werden.

## 7.1 Enzymatische Bildung von Hydroxy-Fettsäuren

LOX sind eisenhaltige Nicht-Häm-Dioxygenasen, welche molekularen Sauerstoff entweder an C-9 (9-LOX) oder an C-13 (13-LOX) von mindestens zweifach ungesättigten Fettsäuren wie Linol- und  $\alpha$ -Linolensäure addieren (Howe und Schillmiller, 2002). Neben dem pH-Wert und der vorliegenden Sauerstoffkonzentration differiert das Produktverhältnis zwischen 9- und 13-Regioisomer in erster Linie in Abhängigkeit von Pflanzenart und Isoenzym (Siedow, 1991; Berry *et al.*, 1998). Die enzymatische Lipidperoxidation von ungesättigten  $\text{C}_{18}$ -Fettsäuren soll anhand der 13-LOX dargestellt werden (siehe Abbildung I.8). 13-LOX sind in *A. thaliana* hauptsächlich aktiv, wohingegen der 9-LOX-Weg nur eine geringe Rolle spielt. 13-LOX arbeitet hochgradig, 9-LOX dagegen sehr viel weniger stereoselektiv (Montillet *et al.*, 2004). Es ist bekannt, dass LOX neben Fettsäuren auch andere Verbindungen mit dem für die Umsetzung zwingend notwendigen 1(*cis*),4(*cis*)-Pentadienyl-System als Substrat akzeptieren und oxygenieren (Siedow, 1991; Berry *et al.*, 1998). Im ersten Reaktionsschritt wird die LOX durch bereits vorhandene Fettsäure-Hydroperoxide aktiviert, wobei das  $\text{Fe}^{2+}$  im aktiven Zentrum des Enzyms zu  $\text{Fe}^{3+}$  oxidiert wird. Es erfolgt die Ausbildung eines Enzym-Substrat-Komplexes wobei  $\text{Fe}^{3+}$  wieder zu  $\text{Fe}^{2+}$  reduziert wird. Nach der Bindung des Substrates im aktiven Zentrum des Enzyms erfolgt analog zum radikalischen Mechanismus (s. u.) die Abstraktion des Wasserstoffatoms am durch  $\text{Fe}^{2+}$  aktivierten Methylenkohlenstoff C-11. Anschließend findet eine stereospezifische Addition von molekularem Sauerstoff an C-13 statt, wobei das (*S*)-Stereoisomer des konjugierten 2(*trans*),4(*cis*)-Dien-Mono-Hydroperoxyl-Radikals entsteht (Dudda *et al.*, 1996). Demnach erfolgt die enzymatische Oxygenierung durch LOX sowohl regio- als auch stereoselektiv und unterscheidet sich somit wesentlich vom unter I.7.2 beschriebenen radikalischen Mechanismus (Feussner und Wasternack, 2002). Das Ausmaß der Stereo- und Regioselektivität unterscheidet sich in Abhängigkeit der untersuchten Pflanzenspezies (Blee, 1998). Nach der Reduktion des Peroxyl-Radikals zum entsprechenden Peroxidation mittels  $\text{Fe}^{2+}$  erfolgt eine Protonierung zum Fettsäure-Hydroperoxid (*cis*-9, *trans*-11), welches anschließend durch Peroxidasen zu

der korrespondierenden OH-FS reduziert wird. Es entsteht beispielsweise, als Resultat der Linolsäure-Peroxidation durch 13-LOX, das Hauptprodukt 13(S)-Hydroxyoctadecadiensäure (HODE). Analog dazu wird bei der Umsetzung von  $\alpha$ -Linolensäure die 13(S)-Hydroxyoctadecatriensäure (HOTE) generiert (Dudda *et al.*, 1996). Die in *A. thaliana* hauptsächlich auftretende 13-HOTE wird in jungen Blättern nur zu 20 Prozent nicht-enzymatisch gebildet, wobei dieser Anteil in alten Blättern auf 40 Prozent und in seneszenten Blättern fast auf 100 Prozent ansteigt (Berger *et al.*, 2001).

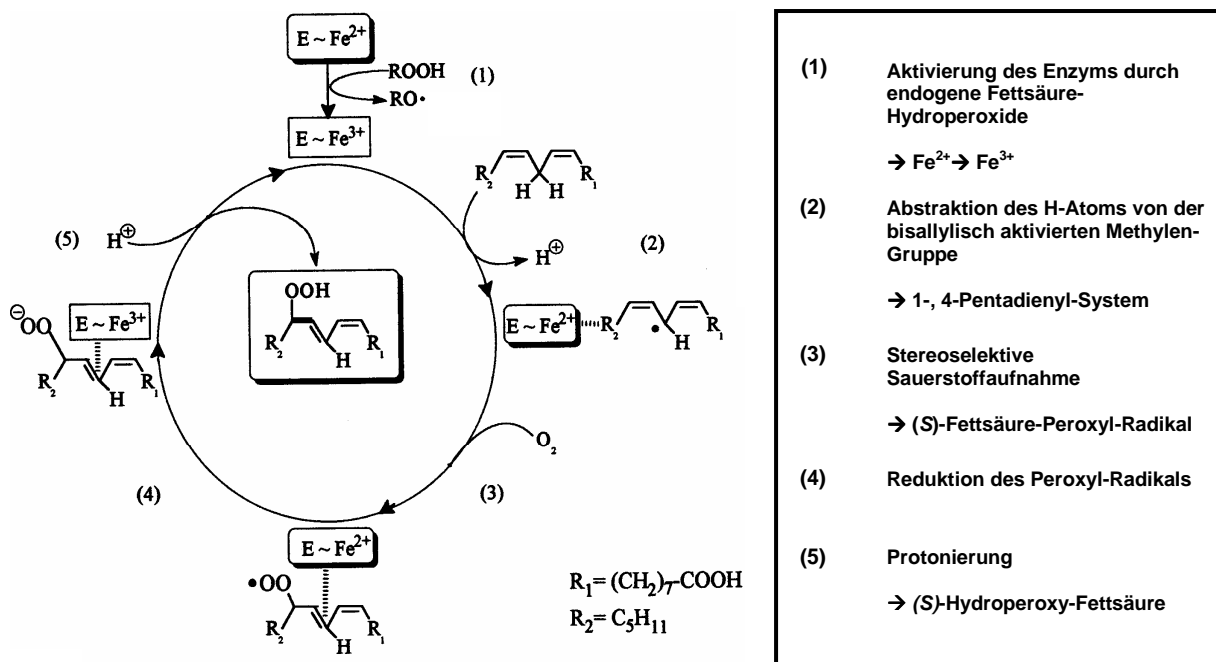


Abbildung 1.8: Stereoselektive Umsetzung von Linolsäure zur Hydroperoxy-Fettsäure mittels LOX. Abbildung verändert nach Dudda *et al.* (1996).

## 7.2 Bildung von Hydroxy-Fettsäuren über einen radikalischen Mechanismus

Im Gegensatz zur enzymatischen Lipidperoxidation stellt die Autoxidation von ungesättigten Fettsäuren eine durch freie Radikale katalysierte Kettenreaktion von molekularem Sauerstoff mit organischen Komponenten dar. Obwohl die Bezeichnung „Autoxidation“ eine spontan ablaufende Reaktion unter milden Bedingungen impliziert, wird diese gewöhnlich durch Schwermetall-Ionen oder Spuren von Peroxiden sowie Hydroperoxiden initiiert und kommt ubiquitär in pflanzlichem Material vor. Radikale können leicht ein Wasserstoffatom einer ungesättigten Fettsäure abstrahieren, falls diese wie auch für die enzymatische Peroxidbildung benötigt ein allylisches Zentrum ( $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2$ ) besitzt. Der Grund dafür liegt in der Möglichkeit zur Ausbildung von mehreren Mesomerie-stabilisierten Strukturen des nach

der Wasserstoffabstraktion entstehenden Radikals. Auf diese Weise wird eine ausreichend hohe Stabilität und damit Halbwertszeit des Intermediates gewährleistet, das anschließend weiterreagiert. Die Bildung von allylischen Intermediaten ist charakteristisch für die über freie Radikale katalysierte Generierung von Fettsäure-Oxidationsprodukten (Frankel, 1998). Für die Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit sind die einfach ungesättigte Ölsäure (*cis*- $\Delta$ 9-Octadecensäure) sowie die zweifach ungesättigte Linol- (*cis*, *cis*- $\Delta$ 9,  $\Delta$ 12-Octadecadien-) und die dreifach ungesättigte  $\alpha$ -Linolensäure (*cis*, *cis*, *cis*- $\Delta$ 9,  $\Delta$ 12  $\Delta$ 15-Octadecatriensäure) von Bedeutung. Bei der Radikal-katalysierten Generierung von Hydroperoxy-Fettsäuren aus obigen ungesättigten C<sub>18</sub>-Fettsäuren unterscheidet vor allem die Anzahl der vorhandenen Allylzentren über die Reaktivität einer Fettsäure. So zeigt beispielsweise Linolsäure, welche eine Bisallylmethylen-(Pentadienyl)-Gruppe (-CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH=CH-) enthält, *in vitro* eine etwa 40-fach höhere Reaktivität als Ölsäure.  $\alpha$ -Linolensäure mit zwei Bisallylmethylen-Gruppen zeigt *in vitro* eine im Vergleich zu Ölsäure mehr als 90-mal und im Vergleich zu Linolsäure etwa 2,4-mal höhere Reaktivität (Frankel, 1998). Die dichte Packung der Fettsäuremoleküle in den Membranen fördert Radikalkettenreaktionen, in denen reaktive Peroxidationsprodukte mit intakten Fettsäuren reagieren. Als Konsequenz daraus wird die Integrität großer Membranbereiche zerstört, was vor allem die an mehrfach ungesättigten Fettsäuren reichen Chloroplasten-Membranen schädigt (Gutteridge und Halliwell, 1990).

Auf molekularer Ebene beginnt die radikalische Lipidperoxidation mit der Abspaltung eines Wasserstoff-Atoms am Methylenkohlenstoff (C-11) des Pentadienyl-Systems, durch  $\cdot$ OH oder  $\cdot$ O<sub>2</sub>H (siehe Abbildung I.9). Dies führt zur Entstehung eines Fettsäure-Radikals, dessen ungepaartes Elektron über die Bisallylmethylen-Gruppe hinweg, d. h. zwischen C-9 und C-13, delokalisiert ist. Anschließend reagiert dieses Radikal mit molekularem Sauerstoff, der insofern eine besondere Stellung einnimmt, als er zwei ungepaarte Elektronen im so genannten Grundzustand besitzt ( $\cdot$ O-O $\cdot$ ) und sich damit im Triplettzustand (<sup>3</sup>O<sub>2</sub>) befindet. Die Addition an den Positionen C-9 oder C-13 findet dabei mit gleicher Wahrscheinlichkeit statt. Es entstehen äquimolare Mengen der beiden regioisomeren Peroxyl-Radikale, welche anschließend durch die Wasserstoff-Abstraktion von einer ungesättigten Fettsäure in die entsprechenden Hydroperoxide überführt werden (Montillet *et al.*, 2004). Von den gebildeten Regioisomeren existieren jeweils ein *trans/cis*- und ein *trans/trans*-konjugiertes Diensystem. Aus Linolsäure entstehen beispielsweise die folgenden vier Regio- sowie Stellungsisomere (Frankel, 1998).

- 1) 9- Hydroperoxy-*trans*-10, *cis*-12-linoleat
- 2) 9- Hydroperoxy-*trans*-10, *trans*-12-linoleat
- 3) 13- Hydroperoxy-*cis*-9, *trans*-12-linoleat
- 4) 13- Hydroperoxy-*trans*-9, *trans*-12-linoleat

Als Charakteristikum einer radikalisch ablaufenden Reaktion tritt keine Stereoselektivität auf, was zur Generierung von äquimolaren Mengen von (*R*)- sowie (*S*)-Stereoisomeren führt. Im Anschluss an die Hydroperoxidierung findet, analog zur enzymatischen Generierung, eine von Peroxidasen katalysierte Reduktion der Hydroperoxide zu den korrespondierenden OH-FS statt (Blee, 2002).

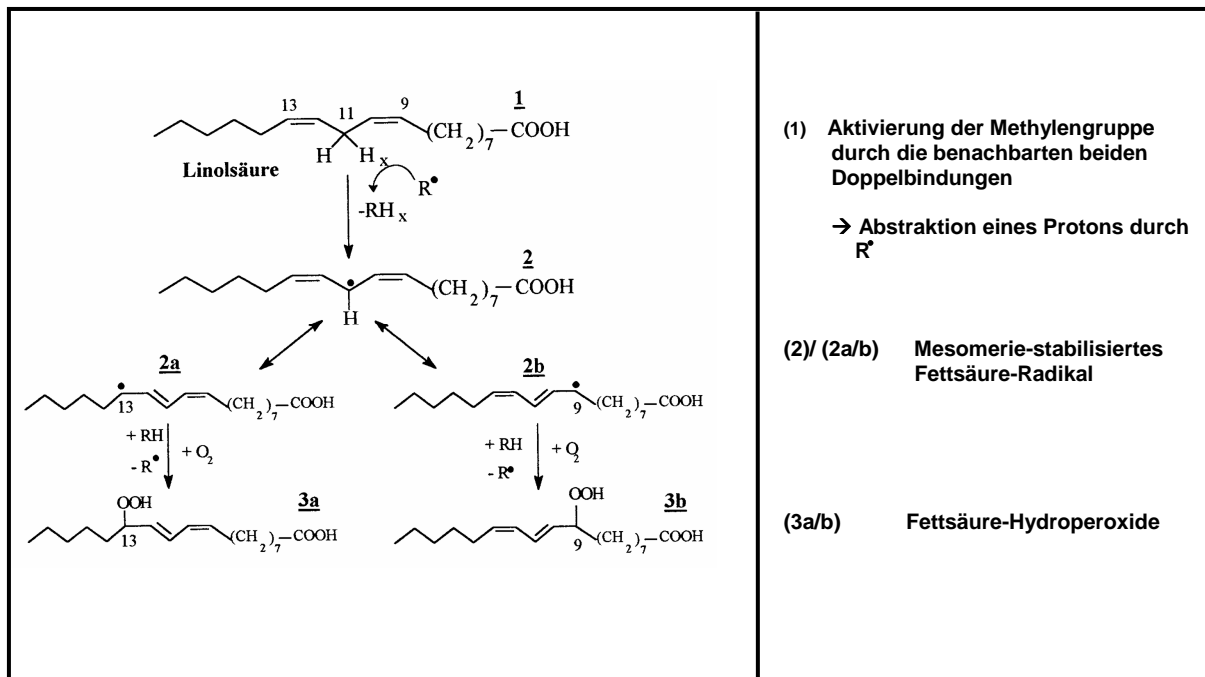


Abbildung I.9: *Bildungsmechanismus von 9- und 13(R/S)-Hydroperoxy-Fettsäuren aus Linolsäure über einen Radikal-katalysierten Mechanismus. Abbildung verändert nach Wills (1965.)*

### 7.3 Bildung von Hydroperoxy-Fettsäuren durch Singulett-Sauerstoff

Die durch  $^1\text{O}_2$  initiierte Lipidperoxidation unterscheidet sich von dem enzymatischen Bildungsweg sowie dem radikalischen Mechanismus dahingehend, dass  $^1\text{O}_2$  aufgrund seiner hohen Elektrophilie direkt die Doppelbindung einer ungesättigten Fettsäure angreifen kann.  $^1\text{O}_2$  reagiert beispielsweise mit Ölsäure 1500-fach schneller als  $^3\text{O}_2$  (Frankel, 1998). Die Reaktion von Linolsäure beginnt mit der direkten Addition von  $^1\text{O}_2$  zu gleichen Teilen an eine der beiden Doppelbindungen zwischen C-9 und C-10 oder C-12 sowie C-13 (siehe Abbildung I.10).



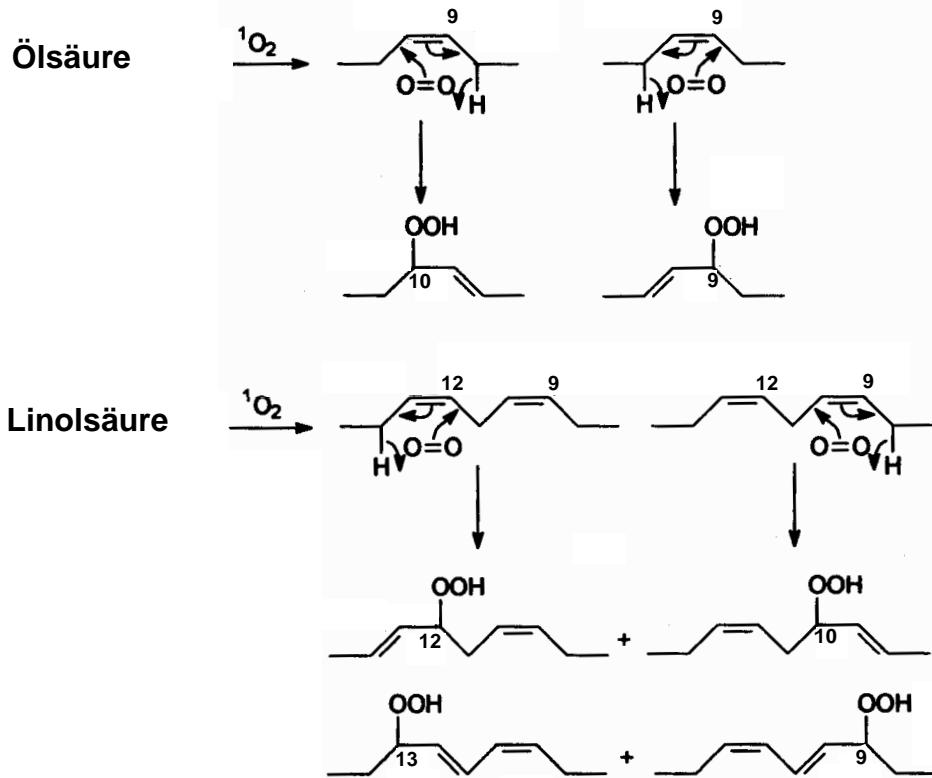


Abbildung I.10: Bildung von Hydroperoxy-Fettsäuren aus Öl- und  $\alpha$ -Linolsäure durch  $^1\text{O}_2$ . Abbildung verändert nach Frankel (1998).

Mittels Hydroperoxidierung von  $\alpha$ -Linolensäure durch  $^1\text{O}_2$  entstehen *in vitro* vier regioisomere Hydroperoxy-Fettsäuren:

- 1) 9-Hydroperoxy-*trans*-10-*cis*-12-linoleat
- 2) 10-Hydroperoxy-*trans*-8-*cis*-12-linoleat
- 3) 12-Hydroperoxy-*cis*-9-*trans*-13-linoleat
- 4) 13-Hydroperoxy-*cis*-9-*trans*-11-linoleat

Die Konzentration der internen (bezogen auf die Position der Doppelbindung) 10-Hydroperoxide (10-OOH) sowie der 12-OOH ist dabei etwa halb so hoch wie die der externen 9-OOH und der 13-OOH, da die 10- und 12-Peroxyradikale zu Folgereaktionen wie Zyklisierungen tendieren (Frankel, 1998). Ein Unterschied zum Radikal-katalysierten Mechanismus besteht darin, dass mittels  $^1\text{O}_2$  sowohl konjugierte (9-OOH und 13-OOH) als auch nicht-konjugierte (10-OOH und 12-OOH) Dien-Hydroperoxide gebildet werden. Analog zum radikalischen Mechanismus tritt auch hier keine Stereoselektivität auf (Montillet *et al.*, 2004). Als Resultat der Linolsäure-Peroxidation durch  $^1\text{O}_2$  entstehen nach Reduktion der

Hydroperoxide 9(*R/S*)-HODE, 10(*R/S*)-HODE, 12(*R/S*)-HODE sowie 13 (*R/S*)-HODE. In Tabelle I.2 sind die verschiedenen OH-FS-Regioisomere aufgeführt, die über die drei Bildungswege, mittels LOX, durch die Einwirkung von freien Radikalen oder durch  $^1\text{O}_2$ , aus Öl-, Linol- und  $\alpha$ -Linolensäure entstehen können.

	8-OH-FS	9-OH-FS	10-OH-FS	11-OH-FS	12-OH-FS	13-OH-FS	15-OH-FS	16-OH-FS
<b>Ölsäure</b>								
radikalisch	8-OH-FS	9-OH-FS	10-OH-FS	11-OH-FS				
$^1\text{O}_2$		9-OH-FS	10-OH-FS					
<b>Linolsäure</b>								
radikalisch		9-HODE				13-HODE		
$^1\text{O}_2$		9-HODE	10-HODE		12-HODE	13-HODE		
LOX		9-HODE				13-HODE		
<b>Linolensäure</b>								
radikalisch		9-HOTE			12-HOTE	13-HOTE		16-HOTE
$^1\text{O}_2$		9-HOTE	10-HOTE		12-HOTE	13-HOTE	15-HOTE	16-HOTE
LOX		9-HOTE				13-HOTE		

Tabelle I.2: Aus Öl-, Linol- und  $\alpha$ -Linolensäure gebildete OH-FS. Durch die Biosynthese mittels 13-LOX entstehen (*S*)-Enantiomere, mittels Radikal-katalysiertem Mechanismus sowie durch  $^1\text{O}_2$  entstehen (*R/S*)-Enantiomere zu gleichen Anteilen.

## 8. Phytoprostane

Phytoprostane (PP) stellen eine weitere Klasse von ausschließlich nicht-enzymatisch gebildeten Lipidperoxidations-Produkten dar, die in den pflanzlichen Membranen aus  $\alpha$ -Linolensäure gebildet werden. Bei den Phytoprostanen handelt es sich um  $\text{C}_{18}$ -Analoge der in Säugern vorkommenden  $\text{C}_{20}$ -Isoprostane. Die *in vivo*-Synthese verläuft über die 12- und 13-Peroxy-Radikale, welche eine 1,3-Zyklisierung vollziehen, indem sie intramolekular an eine der benachbarten beiden Doppelbindung addieren (Frankel, 1998). Die somit entstandenen Endoperoxide lagern sich anschließend zu bicyklischen Endoperoxiden um. Nach einer weiteren  $\text{O}_2$ -Addition und der Aufnahme von jeweils einem Wasserstoff-Atom entstehen als labile Zwischenprodukte die  $\text{G}_1$ -Phytoprostane (siehe Abbildung I.11; Mueller, 1998). Diese können spontan volatiles Malondialdehyd freisetzen, dass als Markersubstanz für die über freie Radikale katalysierte Peroxidation Anwendung findet (Weber *et al.*, 2004). Aus den  $\text{G}_1$ -Phytoprostanen entstehen anschließend auf nicht-enzymatischem Wege die verschiedenen anderen Klassen von Phytoprostanen (A, B, D, E, F, J und deoxy-J), welche sich hinsichtlich des Substitutionsmusters des Zyklopentan-Rings und bezüglich seiner Absättigung unterscheiden. Außerdem existieren von jeder Klasse zwei Regioisomere, Typ I und Typ II (Thoma *et al.*, 2004).

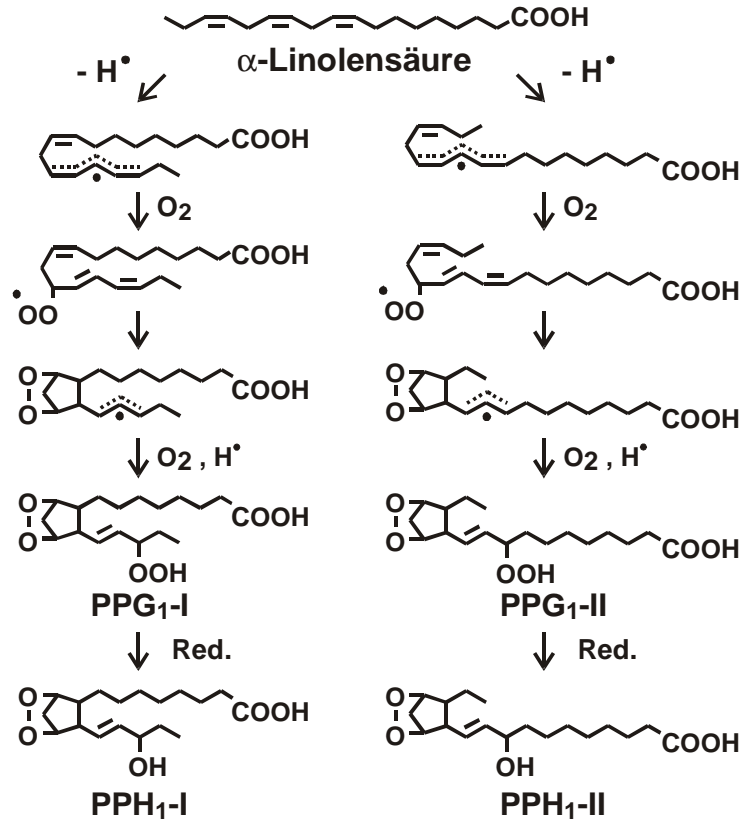


Abbildung I.11: Postulierter Syntheseweg für die Entstehung von G<sub>1</sub>- bzw. H<sub>1</sub>- Phytoprostanen nach dem Endoperoxid-Mechanismus. Abbildung verändert nach Kruschke et al. (2003).

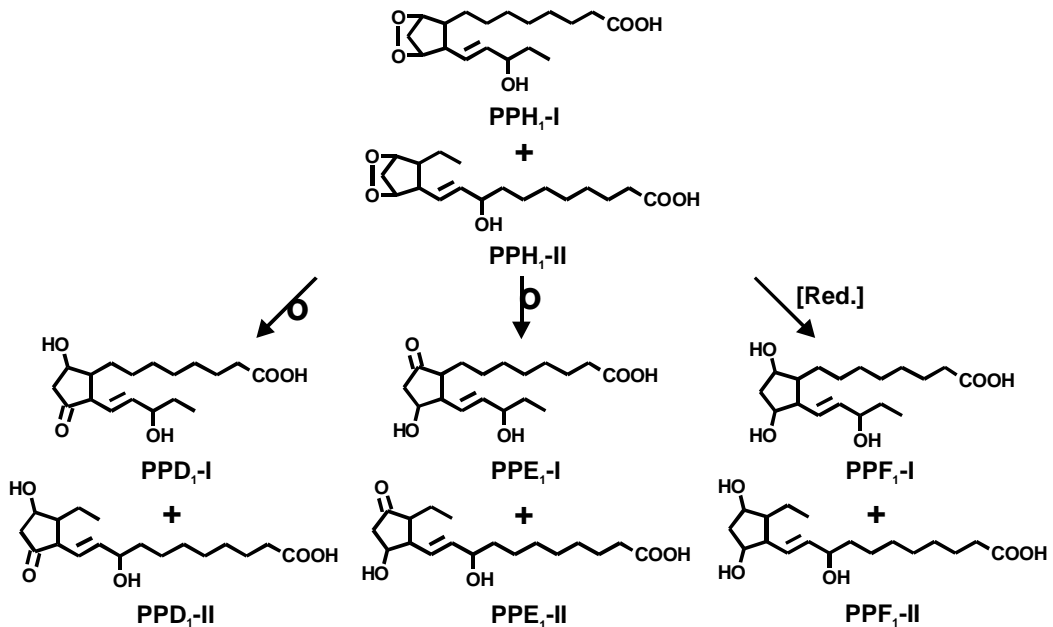


Abbildung I.12: Umlagerung bzw. Reduktion von PPH<sub>1</sub> in andere Phytoprostan-Klassen. Abbildung verändert nach Imbusch und Mueller (2000a).

Wie in Abbildung I.12 dargestellt erfolgt die Freisetzung von F<sub>1</sub>-Phytosteranen nach Reduktion von PPG<sub>1</sub> oder die Generierung von PPE<sub>1</sub> sowie PPD<sub>1</sub> nach erfolgter Umlagerung (Imbusch und Mueller, 2000a). Phytosterane und andere mittels ROS generierte Oxylipine werden vermutlich über eine der im Tier vorkommenden Phospholipase PAF-AH (engl.: Platelet Activating Factor Acetylhydrolase) ähnlichen Lipase selektiv hydrolysiert und somit aus den Membranen frei gesetzt (Jakab *et al.*, 2003).

## 9. Hydroxy-Fettsäuren und F<sub>1</sub>-Phytosterane als Marker für die nicht-enzymatische Lipid-peroxidation

Einige Produkte der Lipidperoxidation und somit Folgeprodukte der primär erzeugten ROS können als zuverlässige und sensitive Marker für oxidativen Stress herangezogen werden. Die ursprünglich als derartige Marker verwendeten Verbindungen wie Lipid-Peroxide, Malondialdehyd, verschiedene Alkane und Aldehyde sind aufgrund ihrer zum Teil enzymatischen Bildung, ihrer geringen biologischen Halbwertszeit, ihrer chemischen Instabilität und ihrer Flüchtigkeit wenig verlässlich oder analytisch aufwändig zu handhaben (Gutteridge und Halliwell, 1990; Halliwell und Gutteridge, 1995).

	18:1		18:2		18:3	
	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Rad <sup>•</sup>	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Rad <sup>•</sup>	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Rad <sup>•</sup>
8-OH						
9-OH						
10-OH						
11-OH						
12-OH						
13-OH						
15-OH						
16-OH						

Abbildung I.13: Dargestellt sind aus Öl-, Linol- und α-Linolensäure nicht-enzymatisch entstehende OH-FS-Isomere. Diese können teilweise Photo-oxidativ durch <sup>1</sup>O<sub>2</sub> sowie nach Radikal-katalysierter Bildung (Rad<sup>•</sup>) entstehen.

Dagegen eignen sich die F<sub>1</sub>-Phytprostane, als Analoga der als Marker für oxidativen Stress etablierten F<sub>2</sub>-Isoprostane aus Säugern (Roberts und Morrow, 1999), als Markersubstanzen in Pflanzen (Imbusch und Mueller, 2000b). Auch die OH-FS stellen eine Klasse von Verbindungen dar, welche als zuverlässige Marker der Lipidperoxidation Verwendung finden. Anhand der Position der OH-Gruppe innerhalb der OH-FS-Regioisomere kann auf den bevorzugt ablaufenden Bildungs-Mechanismen, z.B. während der Pathogenese zurückgeschlossen werden. Den Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bildete die Untersuchung von nicht-enzymatisch entstandenen C<sub>18</sub>-OH-FS sowie PPF<sub>1</sub>. In der Abbildung I.13 sind jene OH-FS-Regioisomere aufgeführt, die ausschließlich nicht-enzymatisch gebildet werden können.

## 10. Ziele der vorliegenden Arbeit

1. Das erste Ziel der Arbeit war es, die Referenzsubstanzen für die nachfolgende Analytik von OH-FS in *A. thaliana* herzustellen. Diese sollten zum einen auf enzymatischem Wege und zum anderen mittels Autoxidation von Linol- und  $\alpha$ -Linolensäure gewonnen werden sowie mit Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) und Dünnschicht-Chromatographie (DC) aufgereinigt und mit Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) identifiziert werden.
2. In der inkompatiblen Pflanze-Pathogen-Interaktion werden Abwehrmechanismen schneller initiiert als in einer kompatiblen Interaktion. Deshalb sollten der Verlauf der Akkumulation von Oxylipinen in beiden Interaktionen des Pathosystems *Arabidopsis thaliana Col-0* / *Pseudomonas syringae pv. tomato* DC3000 miteinander verglichen werden. Hierbei sollte zum einen der auf *A. thaliana* virulente Stamm DC3000, als auch der avirulente Stamm DC3000 *avrRPM1* verwendet werden. Die Oxylipin-Gehalte sollten über einen Zeitraum von 60 h nach Infektion verfolgt werden, um neben frühen auch spät im Laufe der Pathogenese erfolgende Konzentrationsänderungen von Oxylipinen zu erfassen. Die Kinetiken sollten Aufschluss darüber geben in wie weit ein Konzentrationsunterschied und ein abweichender zeitlicher Verlauf bei der Akkumulation von enzymatisch und nicht-enzymatisch gebildeten Oxylipinen beobachtet werden kann. Neben JA und deren Vorstufe OPDA, als Vertreter der enzymatisch gebildeten Oxylipine, sollte auch das Phytohormon SA untersucht werden. Parallel dazu sollten die OH-FS-Gehalte bestimmt werden, wobei die 9- und 13-Regioisomere sowohl enzymatisch als auch nicht-enzymatisch gebildet werden können, 8-,10-,11-,12-,15- und 16-OH-FS jedoch ausschließlich über nicht-enzymatische Mechanismen. Als weitere Substanzklasse wurden die ebenfalls nicht-enzymatisch gebildeten F<sub>1</sub>-Phytprostane untersucht, die aus Hydroperoxyoctadeca-

triensäuren entstehen können. Es sollten sowohl für OH-FS und als auch für die F<sub>1</sub>-Phytopropane jeweils die frei vorliegenden Konzentrationen sowie die Membranveresterten Gehalte bestimmt werden.

3. Die unter 2. beschriebenen Untersuchungen einer Akkumulation von OH-FS während der inkompatiblen Interaktion von *A. thaliana* mit *Pst avrRPM1* sollten unter Ausschluss von Licht durchgeführt werden, um eine Photo-oxidative Bildung von OH-FS auszuschließen und somit Hinweise auf den jeweiligen Anteil der unterschiedlichen Mechanismen bei der nicht-enzymatischen Lipidperoxidation zu erhalten.
4. In einem weiteren Experiment sollten die OH-FS-Konzentration in oberirdischen Pflanzenteilen und Wurzelgewebe von *A. thaliana* miteinander verglichen werden. Hierbei waren in erster Linie die durch Einwirkung von <sup>1</sup>O<sub>2</sub> auf Linol- und α-Linolensäure gebildeten 10-HODE, 10-HOTE- sowie 15-HOTE-Isomere von Interesse. <sup>1</sup>O<sub>2</sub> entsteht während der Photoinhibition in photosynthetisch aktiven Pflanzenorganen. Eine Untersuchung der OH-FS-Muster in unterschiedlichen Organen von *A. thaliana* wurde bisher nicht beschrieben.
5. Im Folgenden sollte die Bildung von OH-FS und F<sub>1</sub>-Phytoprostanen in Mutanten von *A. thaliana* mit Defekten in der ROS-Biosynthese analysiert werden. Hierbei sollten *lsd1*-, *atrbohD*- und *atrbohF*-Mutanten in der inkompatiblen Interaktion mit *Pst avrRPM1* untersucht werden. *lsd1*-Pflanzen besitzen eine verminderte Fähigkeit zur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Dismutation, was zu einer verstärkten ROS-Bildung und damit zu oxidativem Stress führt. Bei *atrboh* wurde eine verminderte Bildung von ROS nach Infektion mit *Pst avrRPM1* beobachtet (Torres, 2002).
6. Um die Frage nach Synergismen bzw. Antagonismen von ROS mit der SA-abhängigen Signaltransduktion zu untersuchen, sollte die Konzentration von OH-FS und F<sub>1</sub>-Phytoprostanen -als Marker für eine verstärkte Bildung von ROS- nach Infektion mit *Pst avrRPM1* in *NahG*-Pflanzen analysiert werden, die keine SA akkumulieren können.
7. Die Untersuchung der biologischen Aktivität von PPF<sub>1</sub> war ein weiteres Ziel bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit.

## II. Material

### 1. Chemikalien

Linolsäure puriss. p.a.,  $\alpha$ -Linolensäure puriss. p.a.,  $\alpha$ -Linolensäure (natürliche, ca. 70 %), Arachidonsäure puriss. p.a. und N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (BSTFA) wurden bezogen von Fluka (Neu-Ulm). Hydrier-Katalysator nach Adams und Shriner (Platin-(IV)-oxid), 2,2-Dimethoxypropan, Triethylamin (TEA) und Zinn-(II)-chlorid stammten von Merck (Darmstadt).  $\alpha$ -Brom-2,3,4,5,6-pentafluortoluol (PFB-Br), Butylhydroxytoluol (BHT), Diazald<sup>®</sup>, N,N-Diisopropylethylamin (DIEA), Natriumborhydrid (NaBH<sub>4</sub>), Trimethylsilyldiazomethan (2 M in Hexan), Triphenylphosphin (TPP) wurden bezogen von Sigma-Aldrich (Steinheim). 15(S)-Hydroxyeikosatetraensäure (15(S)-HETE) wurde von Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA) erhalten.

Alle weiteren handelsüblichen Chemikalien und Lösungsmittel waren von p.a.-Qualität. Für die Probenvorbereitung mittels VPE (engl.: Vapor Phase Extraction), die Verdünnung sowie die Lagerung von Referenzsubstanzen wurden Lösungsmittel von p.a.- oder HPLC-Qualität (gradient grade) verwendet. Die Chemikalien und Lösungsmittel wurden von folgenden Firmen bezogen: Aldrich (Steinheim), Applichem (Darmstadt), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Riedel-de Haen (Seelze), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Deisenhofen).

Die für die Biosynthese von Hydroxy-Fettsäuren verwendete Soja-Lipoxygenase (LOX, EC 1.13.11.12, Type I-S, 43.000 units/mg) wurde von Sigma (Deisenhofen) bezogen.

### 2. Standardsubstanzen

[D<sub>4</sub>]-Salicylsäure wurde aus [D<sub>5</sub>]-Phenol und Carbonat mittels der Kolbe-Schmitt-Synthese hergestellt und war im Bestand des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie der Universität Würzburg vorhanden. 9- und 13-HODE, 9-,12-,13- und 16-HOTE sowie 15(S)-HETE wurden mittels LOX bzw. durch Autoxidation von Linolsäure,  $\alpha$ -Linolensäure und Arachidonsäure gewonnen. Mittels Oxidation von  $\alpha$ -Linolensäure mit Luftsauerstoff bzw. in einer <sup>18</sup>O<sub>2</sub>-Atmosphäre wurden PPF<sub>1</sub> sowie [<sup>18</sup>O<sub>3</sub>]-PPF<sub>1</sub> erhalten, die bereits am Lehrstuhl vorhanden waren. PPF<sub>1</sub> Typ I (S), PPF<sub>1</sub> Typ I (R), PPF<sub>1</sub> Typ II (S), PPF<sub>1</sub> Typ II (R) wurden durch Synthese an der Faculte De Pharmacie De Montpillier der Universite Montpillier von T. Durand synthetisiert (El Fangour *et al.*, 2004). [<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]-OPDA (5% unmarkiert bezogen auf eine zweifache-Markierung) gehörte zum Bestand des Lehrstuhls. Racemisches Methyljasmonat wurde von Serva (Heidelberg) bezogen. JA konnte durch alkalische Hydrolyse des Esters gewonnen werden. 9,10-Dihydrojasmonsäure wurde mittels katalytischer Hydrierung von JA hergestellt (Gundlach *et al.*, 1992). Sämtliche Standardsubstanzen wurden in Methanol oder Acetonitril gelagert.

### 3. Verbrauchsmaterial

Zur Festphasenextraktion wurden 500 mg bzw. 800 mg Aminopropyl (NH<sub>2</sub>)- und 500 mg Silica (SiOH)-Phasen von Macherey-Nagel (Düren) sowie 150 mg Super Q 80/100-Phase von Alltech (Deerfield, IL, USA) in Li Chrolut Glassäulen von Merck (Darmstadt) eingesetzt. Zur Entfernung des Hydrier-Katalysators wurden Sartorius-Filter (Sartorius, Göttingen) verwendet.

### 4. Frische Pflanzenorgane

Die verwendeten frischen Pflanzenorgane (Blatt- und Wurzelgewebe) stammten von *A. thaliana* Ökotyp *Columbia (Col-0)* und *Wassilevskaja (WS)* sowie den *A. thaliana*-Mutanten *NahG*, *Isd1*, *atrbohF* und *atrbohD*. Das verwendete Saatgut stand am Lehrstuhl zur Verfügung. Die Pflanzen wurden mit einer täglichen Beleuchtung von 9 h mit einer Lichtstärke von 100  $\mu\text{Es}^{-1}\text{m}^{-2}$  bei einer Temperatur von 20°C in den Klimakammern des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg kultiviert. Es wurden ausschließlich Pflanzen im Alter von fünf bis sieben Wochen nach der Aussaat verwendet.

Zur Bestimmung des Trockengewichtes wurde ca. 1 g Pflanzenmaterial bis zur Gewichtskonstanz bei 60°C gelagert. Der Trockengewichtsanteil betrug in der Regel 7 bis 12 % des Feuchtgewichtes. Größere Unterschiede zwischen behandelten Versuchspflanzen und Kontrollpflanzen waren nach der Infiltration von *A. thaliana* mit *Pst*-Suspensionen zu beobachten, da es bei der Untersuchung später Zeitpunkte der Messreihe zu einer starken Dehydratisierung der Blätter kam. Zur Vereinheitlichung aller Ergebnisse wurden die ermittelten Oxylin-Konzentrationen immer auf das Trockengewicht berechnet.

### 5. Geräte

Gaschromatographie- GC-MS (Jeol, Tokyo, Japan)

Massenspektrometrie: Agilent 6890 Series Gaschromatograph (Agilent, Waldbronn) gekoppelt mit einem JMS-GCMate II Sektorfeld-Massenspektrometer (Jeol, Tokyo, Japan)

GC-MS (Finnigan MAT, Bremen)

Varian 3400 Gaschromatograph (Varian, Darmstadt) gekoppelt mit einem SSQ 700 Quadrupol-Massenspektrometer (Finnigan MAT, Bremen)



HPLC- Massenspektrometrie:	HPLC-Anlage Thermo Finnigan (Waltham, USA) Surveyor MS Pump Surveyor Autosampler Surveyor PDA Detector LCQ Deca XP Plus Xcalibur™ Homepage Version 1.3 (Thermo Finnigan, Waltham, USA)
Analytische HPLC:	HPLC-Anlage Waters (Milford, USA) W600 Pump W717 Autosampler W996 Diode Array Detector W474 Fluorescence Detector W600 Controller, Millennium32 Software  HPLC-Anlage Merck-Hitachi (Darmstadt) L-6200 Intelligent Pump AS-4000 Intelligent Autosampler L-4250 UV-VIS Detector Eurochrom Integration Package 2000 (Knauer, Berlin)  HPLC-Anlage Thermo Finnigan (Waltham, USA) Surveyor LC Pump Surveyor Auto Sampler Surveyor PDA Detector Chrom Quest Version 4.0 (Thermo Finnigan, Waltham, USA)
Photometer:	Perkin-Elmer UV/ VIS-Spektrometer Lambda 2 (Perkin-Elmer, Überlingen)  Specord 200 UV/ VIS-Spektrophotometer (analytikjena AG, Jena)  Ultrospec 100 pro VIS-Spektrophotometer (Amersham Bioscience, Biochrom Ltd., Cambridge, England)
Homogenisieren:	Ultra-Turrax IKA T25 basic mit Dispergierwerkzeug S 25 N- 10G (Janke & Kunkel, Staufen) Kugelmühle MM 301 (Retsch, Haan)

Rühren/ Durchmischen:	Diverse Magnetrührer, IKA RET basic und IKA RCT basic mit Kontakt-Thermometer ETS-D4 fuzzy (Janke & Kunkel, Staufen)  Vortex REAX 2000 (Heidolph, Kehlheim)
Festphasenextraktion:	Vakuumbox für SPE-Säulen (Eigenbau der Werkstatt des Julius-von-Sachs-Instituts, Würzburg) mit Membran-Vakuumpumpe MZ 2C (Vakuubrand, Wertheim)
Zentrifugen:	Kühlzentrifugen Heraeus Sepatech Minifuge RF und Tischkühlzentrifuge Megafuge 1.0R (Heraeus-Christ, Osterode)  Eppendorf-Tischzentrifuge Centrifuge 5415C (Eppendorf, Hamburg)
Probenkonzentrierung	Rotavapor R 110 (Büchi, Flawil, Schweiz)  Rotationsvakuumkonzentratoren RVC 2-18 und RVC 2-25 (Heraeus-Christ, Osterode) jeweils mit Membran-Vakuumpumpen MZ 2C (Vakuubrand, Wertheim)
Rotationsschüttler:	Gyrotory Water Bath Shaker G76 (New Brunswick Scientific, Edison, N.J., USA)
Autoklaven:	Technomara-Autoklav (Fedegari, Albuzzano, Italien)  Autoklav 5075 ELV (Systec, Wettenberg)
Temperieren/ Inkubieren:	Thermostatisierbare Wasserbäder Julabo EM (Julabo Labortechnik, Seelbach) und GFL 1012 (GFL, Gesellschaft für Labortechnik, Hannover)  Heizschrank Heraeus T5050 (Heraeus-Christ, Osterode)  Diverse 4°C-Kühlschränke und -20°C-Gefrierschränke -80°C-Gefrierschrank (New Brunswick Scientific, Nürtingen) -80°C-Gefrierschrank Hera freeze (Heraeus-Christ, Osterode)

- Messen/Wiegen:      Analysenwaage AT 200 (Mettler, Gießen)  
                            Analysewaage BP211D (Sartorius, Göttingen)  
                            Laborwaage PC4400 (Mettler, Gießen)
- Eppendorf Reference Kolbenhubpipetten (Eppendorf,  
                            Hamburg)
- Sonstige Geräte:      Laminar-Flow-Box (CEAG Envirco, Dortmund)
- UV-Lampe MinUVIS,  $\lambda$ : 254/ 356 nm (Desaga, Heidelberg)
- Ultraschallbad Sonorex TK52 (Bandelin)
- Mikroprozessor-pH-Meter HI9321 (HANNA Instruments, Kehl  
                            am Rhein)

### III. Methoden

#### 1. Medien und Antibiotika für die Anzucht von Bakterienkulturen

Für die Herstellung von 1 L Kings Medium B (KB) für Agar-Platten wurden 20 g Glycerol, 40 g Proteose Peptone 3 sowie 15 g Agar verwendet und mit bidestilliertem Wasser ad 1 L aufgefüllt. Das Medium wurde anschließend im Autoklav (121°C, 2 bar, 20 min) sterilisiert und nach Abkühlung bis auf 50°C jeweils 10 ml sterile  $K_2HPO_4^-$  (10 %, *m/v*) und  $MgSO_4^-$ -Lösung (10 %, *m/v*) zu gegeben. Für die Anlage einer Kultur des avirulenten *Pst*-Stammes DC3000 *avrRPM1* wurden anschließend je 200 µl Rifampicin-Lösung (50 mg/ml) sowie 200 µl Tetrazyklin-Lösung (5 mg/ml) zu 1 L KB-Medium gegeben. Für die Anlage einer Kultur des virulenten *Pst* DC3000-Stammes wurden zu 1 L KB-Medium 200 µl Rifampicin-Lösung (50 mg/ml) gegeben. Für die Anlage einer Flüssigkultur wurde in analoger Weise verfahren, wobei dem KB kein Agar zu gegeben wurde.

#### 2. Anzucht von *P. syringae*

Für die Herstellung der zur Infiltration verwendeten Bakterien-Suspensionen wurden jeweils 50 ml KB-Medium in sterile Erlenmeyerkolben überführt. Das Medium für den avirulenten *Pst*-Stamm wurde mit 50 µl Rifampicin-Lösung (50 mg/ml) sowie 100 µl Tetrazyklin-Lösung (5 mg/ml) versetzt. Im Falle des virulenten *Pst*-Stammes wurden 50 µl Rifampicin-Lösung (50 mg/ml) zugegeben. Von jeder Lösung wurden jeweils 3 ml in ein Reagenzglas überführt und anschließend mit dem virulenten oder dem avirulenten *Pst*-Stamm angeimpft. Die Bakterienkulturen wurden über Nacht bei 28°C mit 120 U/min inkubiert. Jeweils 1 ml der Übernachtskulturen wurden am folgenden Tag in einen 50 ml Erlenmeyerkolben überführt und zwei bis drei Stunden bei 28°C inkubiert (120 U/min). Anschließend wurden die Suspensionen abzentrifugiert (10 min, 3.000 U/min, 4°C), der Überstand verworfen und das Bakterien-Pellet dreimal mit jeweils 10 ml einer 10 mM  $MgCl_2$ -Lösung gewaschen. Die Bakterien wurden in 10 mM  $MgCl_2$  suspendiert und anschließend mit dieser Lösung am Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm auf eine optische Dichte von 0,2 eingestellt. Dies entspricht einer Konzentration von  $10^8$  Kolonie-bildenden Einheiten pro ml Lösung.

#### 3. Infiltration und Ernte von *A. thaliana*

Die Blätter von *A. thaliana* wurden auf der Blattunterseite durch die Stomata mit einer 1 ml Tuberkulin-Spritze mit den Bakterien-Suspensionen und im Falle der Kontrollpflanzen mit einer 10 mM  $MgCl_2$ -Lösung infiltriert. Zur Ernte wurden zwischen fünf und zehn Pflanzen vollständig oberhalb der Wurzel abgeschnitten, umgehend in flüssigem Stickstoff eingefroren, in einem Mörser homogenisiert und bis zur späteren Verwendung bei -80°C gelagert.

## 4. Extraktion von *A. thaliana* und Bestimmung von Oxylipinen

### 4.1 Extraktion und Aufreinigung von Jasmonaten

Zur Analyse von JA sowie OPDA wurden 200 mg Pflanzenmaterial eingesetzt und mit 10 ml gesättigter NaCl-Lösung, 10 ml Diethyläther, 200 µl 1M Citronensäure, 400 µl 5% BHT in Methanol (*m/v*), 50 ng 9,10-Dihydrojasmonsäure und 100 ng [<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]-OPDA als interne Standards versetzt. Die Zugabe der Chemikalien erfolgte auf Eis, um ein Auftauen des Pflanzenmaterials zu vermeiden. Anschließend wurde der Ansatz mit einem Ultraturrax durch dreiminütige Dispersion bei 24.000 U/min homogenisiert. Das Homogenisat wurde bei 4.000 U/min und 4°C für 10 min zentrifugiert. Die Ätherphase wurde abgenommen und unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Die Aufreinigung der Jasmonate erfolgte über Festphasenextraktion an NH<sub>2</sub>-Material. Dazu wurde die NH<sub>2</sub>-SPE-Säule mit einem Säulenvolumen (SV) 5% TEA in Methanol (*v/v*) und zwei SV Methanol gewaschen sowie mit drei SV Diethyläther äquilibriert. Anschließend wurde der Extrakt in 2 ml Diethyläther aufgenommen und auf die Säule aufgegeben. Die Säule wurde mit einem SV Chloroform /Isopropanol 2:1 (*v/v*) gewaschen. Die Jasmonate wurden mit zwei SV Diethyläther /Essigsäure 98:2 (*v/v*) eluiert und das Eluat unter einem Stickstoffstrom getrocknet.

### 4.2 Analytik von Salicylsäure mittels „Vapor Phase Extraction“-Methode

Zur Analyse von SA wurden 100 mg Blattmaterial eingesetzt. Nach Zugabe von 300 µl 0,15 M HCl/Isopropanol 1:2 (*v/v*) wurde das Pflanzenmaterial für 3 min in der Kugelmühle bei einer Frequenz von 30 min<sup>-1</sup> extrahiert. Anschließend wurden 1 ml Diethyläther und 100 ng [D<sub>4</sub>]-Salicylsäure als interner Standard zugegeben und für weitere 3 min in der Kugelmühle extrahiert. Nach einminütiger Zentrifugation des Gemisches in einer Tischzentrifuge (14.000 U/min) wurde der Überstand abgenommen und die Lösung mit 50 µl 2,2-Dimethoxypropan getrocknet. Im Anschluss wurden der Diethyläther und das verbliebene Lösungsmittel in einem Rotationsvakuumkonzentrator entfernt. Durch die Methylierung der Carboxyl-Gruppe von SA mit Trimethylsilyldiazomethan wurde die extrahierte SA in ein flüchtiges Derivat für die nachfolgende Vaporisierung überführt. Dazu wurde der getrocknete Extrakt in 100 µl Methanol und 500 µl Diethyläther gelöst, mit 5 µl Trimethylsilyldiazomethan (2 M in Hexan) versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Zur Entfernung von überschüssigem Trimethylsilyldiazomethan wurde der Ansatz mit 15 µl Essigsäure versetzt und anschließend bis zur Hälfte unter einem Stickstoffstrom eingeeengt. Bei der anschließenden „Vapor Phase Extraction“ (VPE) wurden im ersten Schritt sämtliche in der Probe vorhandenen flüchtigen Methylester quantitativ auf eine Super Q 80/100-SPE-Säule überführt. Dazu wurde der Ansatz mit Helium zur Trockne eingeeengt, wobei der Heliumstrom über die Super Q 80/100-Säule geleitet

wurde (Flussrate: 100 ml/min). Anschließend wurde der Ansatz in einen Heizblock mit 250°C platziert. Nach dreiminütiger Überleitung („Vaporisierung“) mit Helium wurden die auf der Säule gebundenen SA-Methylester mit 1 ml Diethyläther eluiert. Überschüssiges Lösungsmittel wurde unter einem Stickstoffstrom entfernt, der Rückstand in 5 µl Hexan gelöst und davon 2 µl mittels GC-MS analysiert. Die Detektion der Methylester erfolgte im positiven CI-Modus. In Abbildung III.1 sind die einzelnen Arbeitsschritte der VPE-Methode dargestellt.

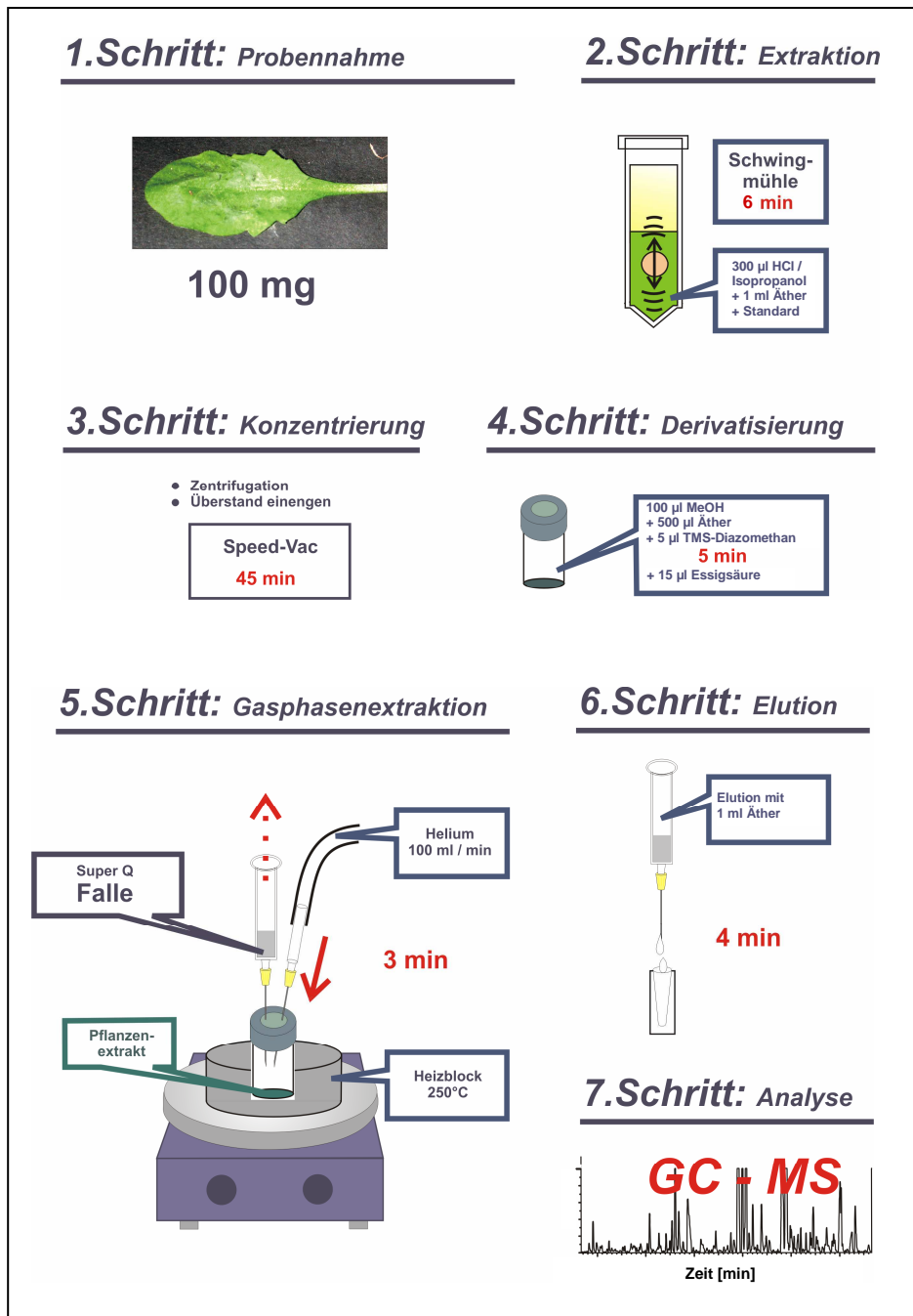


Abbildung III.1: Arbeitsschritte bei der Bestimmung von SA aus *A. thaliana* mittels VPE, Mueller, M.J. (2006).

#### 4.3 Extraktion und Aufreinigung der freien Hydroxy-Fettsäuren aus *A. thaliana*

Die freien OH-FS wurden mittels Lipid-Extraktion in Anlehnung an die Methode von Blight and Dyer (1959) gewonnen. Dabei wurden 0,5 bis 1 g Pflanzenmaterial mit 7,5 ml Methanol/Chloroform 2:1 (v/v), 1,3 ml 1 M Citronensäure, 300 µl 5% BHT in Methanol (m/v), 20 mg TPP und 500 ng 15(S)-HETE als internem Standard versetzt. Die Zugabe der Reagenzien erfolgte auf Eis, um ein Auftauen des Pflanzenmaterials zu vermeiden. Der Zusatz von TPP diente zur Reduktion der in der Probe vorhandenen Hydroperoxy-Fettsäuren zu OH-FS. Der Reduktionsschritt hatte zur Folge, dass Hydroperoxy-Fettsäuren und OH-FS des gleichen Regioisomers gemeinsam quantifiziert wurden und im Folgenden nicht mehr differenziert werden konnten. Nach Zugabe der Reagenzien wurde das Pflanzenmaterial mit einem Ultraturrax durch zweiminütige Dispersion bei 24.000 U/min homogenisiert. Dem Homogenisat wurden anschließend 2,5 ml Chloroform und 3 ml 0,88%ige (m/v) KCl-Lösung zugesetzt, nochmals für 2 min mit dem Ultraturrax dispergiert und für 10 min zentrifugiert (3.500 U/min, 4°C). Nach der Phasentrennung wurde die obere wässrige Phase verworfen, die untere organische Phase wurde in ein Reagenzglas überführt, im Wasserbad in einem Stickstoffstrom bis zur Trockne eingeengt und für die anschließende Aufreinigung mittels NH<sub>2</sub>-SPE mit 5 ml Ethylacetat versetzt. Um Matrixbestandteile abzutrennen, wurde eine Festphasenextraktion an NH<sub>2</sub>-Material durchgeführt. Dazu wurde die SPE-Säule mit zwei SV 5% TEA in Methanol (v/v) und zwei SV Methanol gewaschen und mit drei SV Ethylacetat äquilibriert. Die in 5 ml Ethylacetat vorliegende Probe wurde auf die Säule aufgegeben und im Anschluß mit einem SV Chloroform/Isopropanol 2:1 (v/v) gewaschen. Die OH-FS wurden mit zwei SV Diethyläther/ Essigsäure 98:2 (v/v) eluiert und das Eluat unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Die OH-FS wurden, wie unter III.7.1 beschrieben derivatisiert.

#### 4.4 Extraktion und Aufreinigung von freien und veresterten Hydroxy-Fettsäuren aus *A. thaliana*

Zur Analyse von freien und veresterten in *A. thaliana* vorkommenden OH-FS wurde eine Lipid-Extraktion in Anlehnung an Blight and Dyer (1959) durchgeführt, wobei 200 bis 500 mg Pflanzenmaterial eingewogen und wie unter III.4.3 beschrieben extrahiert wurden. Abweichend zu III.4.3 wurde 1 µg 15(S)-HETE als interner Standard verwendet und nach erfolgter Lipid-Extraktion eine Hydrolyse der Lipide durchgeführt. Hierzu wurde die organische Phase nach der Extraktion in ein verschraubbares Reagenzglas überführt und unter einem Stickstoffstrom bis auf etwa 0,5 ml eingeengt. Sämtliche in Form von Glycerolipiden, einfache Acylglycerole, Phospho- oder Glykolipide, in pflanzlichen Zellmembranen veresterten Fettsäuren wurden durch alkalische Hydrolyse freigesetzt und konnten somit gemeinsam mit den endogen in freier Form vorliegenden Fettsäuren

quantifiziert werden. Dazu wurde der eingeeengte Extrakt mit 2 ml 15% (*m/v*) Kaliumhydroxid-Lösung sowie 50 µl 5% BHT in Methanol (*m/v*) versetzt und 1 h bei 60°C hydrolysiert, wobei die Probe im Abstand von 15 min mittels Vortex durchmischt wurden. Anschließend wurde der Ansatz in ein 50 ml-Schraubdeckelgefäß überführt, mit 10 ml Wasser verdünnt und mit 10 ml 1 M Citronensäure angesäuert. Das Hydrolysat wurde mit 10 ml Ethylacetat für 3 min ausgeschüttelt, für 5 min zentrifugiert (3.500 U/min, 4°C) und anschließend die Ethylacetat-Phase abgenommen. Die organische Phase wurde in einem Stickstoffstrom auf etwa 5 ml eingeeengt und mittels NH<sub>2</sub>-SPE aufgereinigt und wie unter III.7.1 beschrieben für die GC-MS Analytik derivatisiert. Im Laufe der Untersuchungen trat zeitweilig eine Kontamination der verwendeten Lösungsmittel mit OH-FS auf, die für die quantifizierten OH-FS-Regioisomere zwischen 0,1 und 10 % der endogenen Konzentrationen betrug. Durch die parallele Aufarbeitung von Kontrollen, die eine der Einwaage an Pflanzenmaterial entsprechende Menge an Wasser enthielten, wurden die Verunreinigungen quantifiziert und anschließend von im Zeitraum der Kontamination ermittelten OH-FS-Konzentrationen subtrahiert. Bei der Untersuchung der Lösungsmittel wurden hauptsächlich Diethyläther und Chloroform in jeweils p.a. Qualität als Quellen der Verunreinigung identifiziert.

#### 4.5 Extraktion und Aufreinigung von freien F<sub>1</sub>-Phytosteranen

Zur Bestimmung von freien F<sub>1</sub>-Phytosteranen wurde etwa 1 g Pflanzenmaterial eingewogen, mit 20 ml gesättigter Natriumchlorid-Lösung, 200 µl 1 M Citronensäure, 200 µl 5% BHT in Methanol (*m/v*), 20 ml Ethylacetat, 20 mg TPP und 500 ng [<sup>18</sup>O<sub>3</sub>]-PPF<sub>1</sub> versetzt. Die Zugabe der Reagenzien erfolgte auf Eis, um ein Auftauen des Pflanzenmaterials zu vermeiden. Anschließend wurde der Ansatz für 5 Minuten mittels Ultraturrax bei 24.000 U/min homogenisiert, für 10 min bei 3.500 U/min zentrifugiert und die organische Phase in ein Reagenzglas überführt. Das Ethylacetat wurde in einem Stickstoffstrom bis auf verbleibende 3 ml aus der Probe entfernt. Wie auch bei der Aufreinigung der OH-FS wurde im Anschluss an die Extraktion von PPF<sub>1</sub> eine Festphasenextraktion an NH<sub>2</sub>-Material durchgeführt. Dazu wurde die SPE-Säule mit zwei SV 5% TEA in Methanol (*v/v*) sowie zwei SV Methanol gewaschen und mit drei SV Ethylacetat äquilibriert. Die in 3 ml Ethylacetat vorliegende Probe wurde auf die Säule aufgegeben und mit einem SV Chloroform/Isopropanol 2:1 (*v/v*) sowie einem SV Diethyläther/Essigsäure 98:2 (*v/v*) gewaschen. Anschließend wurden die PPF<sub>1</sub> mit 2,5 SV Diethyläther/Methanol/Essigsäure 80:20:2 (*v/v/v*) eluiert, das Lösungsmittel unter einem Stickstoffstrom entfernt und die PPF<sub>1</sub> wie unter III.7.2 beschrieben für die GC-MS Analytik derivatisiert.



#### 4.6 Extraktion und Aufreinigung von freien und veresterten F<sub>1</sub>-Phytosteranen

Zur Bestimmung von freien und veresterten in *A. thaliana* vorkommenden PPF<sub>1</sub> wurde 500 mg Pflanzenmaterial eingewogen und mit 10 ml Methanol, 200 µl 1M Citronensäure, 200 µl 5% BHT in Methanol (*m/v*), 20 mg TPP und mit 1 µg [<sup>18</sup>O<sub>3</sub>]-PPF<sub>1</sub> als internem Standard versetzt. Anschließend wurde das Pflanzenmaterial mit einem Ultraturrax durch fünfminütige Dispersion bei 24.000 U/min extrahiert. Der Ansatz wurde bei 3.500 U/min für 10 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand quantitativ vom unlöslichen pflanzlichen Rückstand abgenommen und unter einem Stickstoffstrom bis auf ein Volumen von etwa 1 ml eingengt. Nach Hydrolyse der Lipide wie unter III.4.4 beschrieben und Aufreinigung mittels NH<sub>2</sub>-SPE wurden die PPF<sub>1</sub> für die Analyse mittels GC-MS wie unter III.7.2 beschrieben derivatisiert.

### 5. Chromatographische Methoden

#### 5.1 Dünnschichtchromatographie

Die dünnschichtchromatographische Auftrennung sowie die präparative Isolierung von OH-FS wurde auf Polygram<sup>®</sup> SIL G/UV<sub>254</sub> Kieselgelfolien mit einer Schichtdicke von 0,25 mm und Fluoreszenzindikator (Macherey und Nagel, Düren) durchgeführt. Als Laufmittel wurde eine Mischung von 66 Teilen Hexan, 33 Teilen Diethyläther und einem Teil Essigsäure verwendet. Nach der Entwicklung des Dünnschichtchromatogramms wurden die OH-FS mittels UV-Löschung bei 254 nm oder nach Detektion in einer Jodkammer nachgewiesen. Sublimiertes Jod reagiert als Lewis-Säure mit geeigneten Lewis-Basen (Elektronenpaar-Donatoren), beispielsweise ungesättigten Kohlenwasserstoffen, und bildet in einer reversiblen Reaktion intensiv braun- oder rot-gefärbte Charge-Transfer-Komplexe.

#### 5.2 Festphasenextraktion

Die Festphasenextraktion (engl.: Solid Phase Extraction, SPE) fand Anwendung als schneller Reinigungsschritt, insbesondere bei der Aufarbeitung von Proben aus pflanzlichem Blattmaterial. Als Adsorptionsmaterialien kamen NH<sub>2</sub>- und SiOH-Phasen zum Einsatz. Bei den verwendeten Säulen handelte es sich um 3 ml-Glassäulen der Fa. Macherey und Nagel (Düren) bzw. der Fa. Merck (Darmstadt), die mit jeweils 500 bis 800 mg der stationären Phase zwischen 2 Papierfilterblättchen befüllt wurden. Die Chromatographie erfolgte unter leichtem Vakuum an einer Vakuumbox. Dadurch konnten bis zu sechs Proben parallel aufgearbeitet werden. Die Säulen wurden in dem gleichen Lösungsmittel äquilibriert, in dem anschließend die Probe aufgetragen wurde. Während der Probenaufarbeitung war zu

beachten, dass die SPE-Säulen nicht trocken laufen, da dadurch das Elutionsprofil der Säule verändert werden konnte.

### 5.3 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie

Die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) wurde zur analytischen Trennung und zur präparativen Reinigung von OH-FS eingesetzt. Hierbei kamen sowohl Reversed Phase-Materialien (RP-18 endcapped) als auch Silica-Materialien, im Falle der Normalphasen-HPLC (NP-HPLC), als stationäre Phasen zum Einsatz. Die mobile Phase wurde entsprechend der Analyten ausgewählt. Die Detektion erfolgte bei 234 nm, dem Absorptionsmaximum konjugierter Diene.

#### 5.3.1 Präparative Isolierung von HODE und HOTE mittels RP-HPLC

HPLC-Anlage: Analytische HPLC von Waters  
 Trennsäule: Purospher Star 100 RP18 endcapped (250 mm x 4 mm, Partikelgröße 5 µm, Merck, Darmstadt)  
 Laufmittel (LM) A: Wasser/Essigsäure 99,9 : 0,1 (v/v)  
 LM B: Methanol/Essigsäure 99,9 : 0,1 (v/v)  
 Gradient:

Zeit [min]	LM A [%]	LM B [%]
0,0	30	70
20,0	0	100
30,0	0	100

Flussrate: 0,8 ml/min  
 Detektion:  $\lambda_{\max}$  : 234 nm  
 Injektionsvolumen: 50 µl  
 Retentionszeiten: HODE: 23,9 min  
 HOTE: 21,4 min

#### 5.3.2 Präparative Isolierung von HETE mittels RP-HPLC

HPLC-Anlage: Analytische HPLC Surveyor, Thermo Finnigan  
 Trennsäule: Purospher Star 100 RP18 endcapped (250 mm x 4 mm, Partikelgröße 5 µm, Merck, Darmstadt)  
 LM A: Wasser/Essigsäure 99,9 : 0,1 (v/v)  
 LM B: Methanol/Essigsäure 99,9 : 0,1 (v/v)

Gradient:

Zeit [min]	LM A [%]	LM B [%]
0,0	30	70
20,0	0	100
30,0	0	100

Flussrate: 0,8 ml/min  
 Detektion:  $\lambda_{\max}$  : 234 nm  
 Injektionsvolumen: 100  $\mu$ l  
 Retentionszeit: HETE: 17,0 min

### 5.3.3 Präparative Isolierung von Hydroxy-Fettsäure-Regioisomeren mittels NP-HPLC

Nach einer Aufreinigung mittels Dünnschichtchromatographie oder RP-HPLC wurden HODE und HOTE mittels NP-HPLC in die einzelnen Regioisomere aufgetrennt. Hierzu wurden die in Methanol vorliegenden OH-FS am Rotavapor bis zur Trockne eingengt und in 0,5 ml n-Hexan aufgenommen.

HPLC: Merck Hitachi  
 Säule: Li Chrospher Si 60 (250 x 4 mm, Partikelgröße: 5  $\mu$ m, Knauer, Berlin)  
 Auswertung: Eurochrom Integration Package 2000 (Knauer, Berlin)  
 Eluent: n-Hexan/Isopropanol/Essigsäure 98 : 2 : 0,05 (v/v/v)  
 Fluß: 1 ml/min, isokratisch  
 Detektion:  $\lambda_{\max}$  : 234 nm  
 Injektionsvolumen: 100  $\mu$ l  
 Retentionszeiten: 9-HODE: 19,1 min  
 13-HODE: 11,2 min  
 9-HOTE: 33,5 min  
 12-HOTE: 22,0 min  
 13-HOTE: 18,1 min  
 16-HOTE: 25,3 min

### 5.3.4 Quantifizierung von konjugierten Dienen

Um die Konzentration von OH-FS zu berechnen, wurde eine photometrische Messung der konjugierten Diene in ihrem Absorptionsmaximum bei 234 nm durchgeführt. Hierzu wurde jeweils ein Aliquot der in Methanol gelöst vorliegenden OH-FS in einem Photometer gegen Methanol als Blindwert vermessen. Für die Berechnung der OH-FS-Konzentrationen wurde der molare Extinktionskoeffizient der 13(S)-Hydroperoxy-9(*cis*),11(*trans*),15(*cis*)-okta-

dekatriensäure (13-HPOTE,  $\epsilon_{234}$ : 23.000 cm<sup>-1</sup>M<sup>-1</sup>; Graff *et al.*, 1990) zugrunde gelegt und die folgende Formel angewendet:

$$c(\text{OH-FS}) = E / \epsilon_{234} * d * F * M_w(\text{OH-FS}) \quad [\text{mg/ml}]$$

c(OH-FS)	Konzentration (OH-FS) [mg/ml]
E	gemessene Extinktion bei einer Wellenlänge von 234 nm
$\epsilon_{234}$	molarer Extinktionskoeffizient von 13-HPOTE [cm <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> ] 23.200 bis 24.600 cm <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> (G. Graff <i>et al.</i> , 1990) 23.000 cm <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> (für Berechnungen verwendet)
d	Schichtdicke der Küvette: 1 cm
F	Verdünnungsfaktor
M <sub>w</sub> (OH-FS)	Molekulargewicht: HODE: 296 g/mol; HOTE: 294 g/mol

#### 5.4 Gaschromatographie

Die gaschromatographische Analyse von Proben wurde an zwei verschiedenen Systemen durchgeführt. Die beiden Systeme zeigten nur geringe Unterschiede bezüglich der Retentionszeit der Analyten sowie der Detektions- und Nachweisgrenzen in den verschiedenen Ionisationstechniken. In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl für Analysen im Elektronenstoß-Modus sowie im negativen chemischen Ionisation-Modus in erster Linie System 2 verwendet. Für Analysen im positiven CI-Modus wurde System 1 eingesetzt.

##### GC-MS-System 1:

Gaschromatograph:	Varian 3400
Vorsäule:	methyldesaktivierte Säule (10 m x 0,25 mm, Phenomenex, Aschaffenburg)
Säule:	Zebtron ZB 5 (30 m x 0,25 mm, Filmdicke 0,25 µm, Phenomenex, Aschaffenburg)
Trägergas:	Helium
Fließgeschwindigkeit:	23 cm/s
Injektor:	Inlet-Liner gepackt mit silanisierter Glaswolle, 300°C
Detektor:	SSQ 700 Massenspektrometer (Finnigan MAT, Bremen)

GC-MS-System 2:

Gaschromatograph: Agilent 6890  
 Vorsäule: methyldesaktivierte Säule (10 m x 0,25 mm, Phenomenex, Aschaffenburg)  
 Säule: Zebron ZB 5 (30 m x 0,25 mm, Filmdicke 0,25 µm, Phenomenex, Aschaffenburg)  
 Trägergas: Helium  
 Fließgeschwindigkeit: 1 ml/min  
 Injektor: Inlet-Liner gepackt mit silanisierter Glaswolle, 300°C  
 Detektor: JMS-GCMate II (Jeol, Tokyo, Japan)

Folgende Temperatur-Zeitprogramme wurden für die verschiedenen Analysen verwendet:

(a) Trennbedingungen für PFB-Ester von JA und OPDA an GC-MS System 1:

Gesamtzeit [min]	$\Delta T$ [°C/min]	Endtemperatur [°C]
0	-	100
0,5	-	100
3,5	30	190
10,5	5	225
12	31	280
16	5	300
26	-	300

(b) Trennbedingungen für Methylester von JA, OPDA und SA an GC-MS System 1:

Gesamtzeit [min]	$\Delta T$ [°C/min]	Endtemperatur [°C]
0	-	80
3	-	80
25	10	300
30	-	300

(c) Trennbedingungen für hydrierte, TMS-verätherte PPF<sub>1</sub>-PFB-Ester GC-MS-System 2:

Gesamtzeit [min]	$\Delta T$ [°C/min]	Endtemperatur [°C]
0	-	175
0,5	-	175
4	30	285
10	2,5	300
15	-	300

(d) Trennbedingungen für PFB-Ester von JA und OPDA an GC-MS System 2:

Gesamtzeit [min]	$\Delta T$ [°C/min]	Endtemperatur [°C]
0	-	100
0,5	-	100
3,5	30	190
10,5	5	225
13	30	300
20	-	300

(e) Trennbedingungen für hydrierte und silylierte Methylester von Hydroxy-Fettsäuren GC-MS System 2:

Gesamtzeit [min]	$\Delta T$ [°C/min]	Endtemperatur [°C]
0	-	150
3,75	20	225
13,75	5	275
15,25	19	300
20,25	-	300

#### 5.4.1 Bestimmung der Responsefaktoren für die Gaschromatographie

Für die Quantifizierung von Verbindungen aus den Peakflächen eines Chromatogramms werden Responsefaktoren benötigt. Der Responsefaktor ( $R$ ) ist eine relative Größe, welche die unterschiedliche Empfindlichkeit des Detektors für einen gegebenen Analyten in Relation zur Standardverbindung angibt. Die Detektorempfindlichkeit ( $S$ ) kann hierbei als Peakfläche ( $A$ ) pro Masse Analyt ( $W$ ) ausgedrückt werden. Der Responsefaktor (Analyt/Standard) wurde mit folgender Formel bestimmt (Ettre *et al.*, 1996):

$$R = \frac{S(a)}{S(st)} = \frac{A(a) \cdot W(st)}{A(st) \cdot W(a)}$$

$a = \text{Analyt}; \quad st = \text{Standard}$

Im Falle von gleichen eingesetzten Mengen von Analyt und Standard lässt sich der Responsefaktor aus dem Peakflächenverhältnis  $A(a)/A(st)$  berechnen. Interne stabil isotope markierte Standards sind für die GC-MS-Analytik am besten geeignet, da sie identische physikalisch-chemische und chromatographische Eigenschaften sowie gleiche Ionisationsraten in der Massenspektrometrie im Vergleich zu den Analyten aufweisen. Aufgrund dessen kann mit Responsefaktoren von 1,0 gerechnet werden. Isotopenmarkierte Standards standen für die Bestimmung von SA und PPF<sub>1</sub> zur Verfügung.

Für die Untersuchung von OH-FS in Pflanzenmaterial wurde 15(S)-HETE verwendet, ein C<sub>20</sub>-Analogon der C<sub>18</sub>-Hydroxy-Fettsäuren, welches in Pflanzen genuin nicht vorkommt. Zur Bestimmung der Responsefaktoren wurden jeweils 1 µg 15(S)-HETE sowie 9-,12-,13- und 16-HOTE vereinigt, derivatisiert und mittels GC-MS analysiert. Die Responsefaktoren wurden im EI-Modus an den GC-MS-Systemen 1 und 2 (s. u.) und im CI-Modus ausschließlich am GC-MS-System 1 jeweils in Dreifachbestimmung ermittelt. Die Responsefaktoren für 8-,10-,11- und 15-OH-FS wurden durch Bildung des Mittelwertes der Responsefaktoren von Regioisomeren mit ähnlicher Retentionszeit errechnet. Für die Quantifizierung von OH-FS, die ausgehend von C<sub>16</sub>-Fettsäuren gebildet werden, wurden C<sub>18</sub>-OH-FS/15(S)-HETE-Responsefaktoren verwendet. In Tabelle 1 sind die im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Responsefaktoren in Abhängigkeit von dem verwendeten GC-MS-System, dem Ionisationsmodus und der verwendeten Derivatisierung der Analyten aufgelistet. Auf die Fragmentierung der OH-FS-Derivate im Elektronenstoß-Modus der MS-Systeme und die daraus resultierende Bildung von A- und B-Fragmenten wird unter IV.1.6 eingegangen.

GC-MS-System (Modus)	Jeol (EI)		SSQ (EI)		Jeol (CI)		SSQ (CI)	
	A	B	A	B				
Fragment								
JA / 9,10 DHJA					***			1,00
OPDA / 9,10 DHJA					***			0,53
8-OH-FS (C <sub>18</sub> ) / 15(S)-HETE	***	1,10*	***	***				
9-OH-FS (C <sub>18</sub> ) / 15(S)-HETE	0,50	1,09	0,45	1,02	1,05			0,83
10-OH-FS (C <sub>18</sub> ) / 15(S)-HETE	***	0,96*	***	***				
11-OH-FS (C <sub>18</sub> ) / 15(S)-HETE	***	0,90*	***	***				
12-OH-FS (C <sub>18</sub> ) / 15(S)-HETE	0,64	0,83	0,46	0,69	0,81			0,52
13-OH-FS (C <sub>18</sub> ) / 15(S)-HETE	0,63	0,68	0,48	0,57	0,68			0,37
15-OH-FS (C <sub>18</sub> ) / 15(S)-HETE	***	0,69*	***	***				
16-OH-FS (C <sub>18</sub> ) / 15(S)-HETE	1,11	0,70	1,10	0,67	1,04			0,90
7-OH-FS (C <sub>16</sub> ) / 15(S)-HETE	0,50**	1,09**	***	***				
10-OH-FS (C <sub>16</sub> ) / 15(S)-HETE	0,64**	0,83**	***	***				
11-OH-FS (C <sub>16</sub> ) / 15(S)-HETE	0,63**	0,68**	***	***				
14-OH-FS (C <sub>16</sub> ) / 15(S)-HETE	1,11**	0,70**	***	***				

Tabelle III.1: Responsefaktoren der Analyten nach Derivatisierung und Analyse im EI- und CI-Modus an GC-MS-System 1 und 2. \* Responsefaktoren wurden näherungsweise berechnet (s. o.), \*\* für die Quantifizierung von C<sub>16</sub>-OH-FS wurden die C<sub>18</sub>-OH-FS/15(S)-HETE-Responsefaktoren verwendet, \*\*\* Responsefaktoren wurden nicht berechnet.

## 6. Massenspektrometrie

Die massenspektrometrischen Analysen wurden an einem SSQ 700-Massenspektrometer (Finnigan MAT, Bremen) und an einem JMS GCMate II-Massenspektrometer (Jeol, Tokyo, Japan) vorgenommen. Der Probeneinlass erfolgte über Gaschromatographen. An beiden Geräten war eine Detektion im EI- sowie im CI- und NICI-Modus möglich.

Die Aufnahme von EI-Spektren erfolgte unter folgenden Bedingungen:

	SSQ 700	JMS-GCMate II
Ionenquellentemperatur	150°C	200°C
Elektronenenergie	70eV	70eV

Die Aufnahme von positiven und negativen CI-Spektren wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

	SSQ 700	JMS-GCMate II
Ionenquellentemperatur	150°C	200°C
Elektronenenergie	200eV	200eV
Reaktand-Gas	Isobutan	Methan
Quellendruck	$2,0 - 2,5 \times 10^{-5}$ Torr	$2,4 \times 10^{-2}$ Pa

## 7. Derivatisierung von freien Fettsäuren und deren Derivaten

In der vorliegenden Arbeit wurden Fettsäure-Derivate mittels Gaschromatographie (GC) getrennt und über Massenspektrometrie (MS) im Elektronenstoß-Ionisationsmodus (engl.: electron impact, EI) sowie im negativen chemischen Ionisationsmodus (engl.: negative ion chemical ionization, NICI) bestimmt. Diese analytischen Methoden erforderten eine Überführung der zu analysierenden Verbindungen in flüchtige, stabile und in dem jeweiligen Ionisationsmodus nachweisbare Derivate.

### 7.1 Derivatisierung von Hydroxy-Fettsäuren für die GC-MS Analytik

Um Hydroxy-Fettsäuren für die GC-MS-Analytik in volatile Substanzen zu überführen, müssen diese derivatisiert werden. Hierzu wird die Carboxyl-Gruppe methyliert (siehe III.7.4), und die Hydroxy-Gruppe zum Trimethylsilyläther (siehe III.7.6) umgesetzt. Im Anschluss an die Methylierung wurde eine katalytische Hydrierung der im Molekül vorliegenden Doppelbindungen durchgeführt (siehe III.7.7)



## 7.2 Derivatisierung von F<sub>1</sub>-Phytosteranen für die GC-MS Analytik

Um PPF<sub>1</sub> in eine mittels GC-MS analysierbare, flüchtige Form zu überführen, wurden diese zu Pentafluorbenzylestern (siehe III.7.5) und TMS-Äthern (siehe III.7.6) umgesetzt. Vor der Derivatisierung wurden die Ansätze katalytisch hydriert (siehe III.7.7). Die Hydrierung der Doppelbindungen diente hierbei dazu, ebenfalls in der Probe vorhandene offenkettige Trihydroxy-Fettsäuren von PPF<sub>1</sub> unterscheiden zu können, die gleiche Massen, ähnliche Retentionszeiten, aber eine unterschiedliche Anzahl von Doppelbindungen besitzen.

## 7.3 Herstellung von Diazomethan

Diazomethan ist ein leichtflüchtiges hochreaktives Gas, das durch Hydrolyse von Diazald<sup>®</sup> gewonnen wird. Hierzu wurden 5,3 g Diazald<sup>®</sup> in einem 100 ml-Rundkolben eingewogen und mit 30 ml Diethyläther versetzt. Nach Zugabe von 5 ml Ethanol und 2 g Kaliumhydroxid, gelöst in 3,2 ml Wasser, wurde der Reaktionsansatz unter ständigem Rühren vorsichtig erwärmt. Das entstandene Diazomethan wurde zusammen mit dem Diethyläther über eine Destillationsbrücke destilliert und in einem eisgekühlten 100 ml-Spitzkolben, in dem sich 3 ml Diethyläther befanden, aufgefangen. Nach Beendigung der Reaktion wurde zu dem verbleibenden Reaktionsansatz vorsichtig Essigsäure zugesetzt, um Reste des Diazomethans zum Essigsäuremethylester umzusetzen. Die gelblich gefärbte Diazomethan-Lösung konnte bei -20°C gelagert werden.

## 7.4 Methylierung freier Carboxylgruppen

Die zu methylierenden Fettsäure-Derivate wurden in 30 µl Methanol angelöst und tropfenweise, bis zu einer bleibenden Gelbfärbung, mit in Diethyläther gelöstem Diazomethan versetzt. Wahlweise konnten statt Diazomethan auch 10 µl 2 M Trimethylsilyldiazomethan in Hexan zugegeben werden. Nach zehnmütiger Reaktion bei Raumtemperatur wurden überschüssiges Reagenz und die Lösungsmittel unter einem Stickstoffstrom entfernt. Der Vorteil der zweiten Methode bestand in der geringeren Flüchtigkeit von Trimethylsilyldiazomethan im Vergleich zu Diazomethan und einer damit verbundenen leichteren Handhabung.

## 7.5 Herstellung von Pentafluorbenzylestern

Eine sehr empfindliche Nachweismethode für Fettsäuren und ihre Derivate ist die massenspektrometrische Bestimmung im NICI-Modus. Hierzu muss die Carboxyl-Funktion mit einer Verbindung derivatisiert werden, die einen sehr hohen Elektroneneinfangquerschnitt besitzt. In der Analytik von Fettsäurederivaten hat sich die Veresterung freier Säuren mit  $\alpha$ -Brom-2,3,4,5,6-Pentafluortoluol (PFB-Br) etabliert (Morrow *et al.*, 1990). Die

Verbindungen wurden in 200  $\mu$ l Chloroform gelöst, mit 10  $\mu$ l N,N-Diisopropylethylamin (DIEA) und 10  $\mu$ l PFB-Br versetzt und bei 40°C im Wasserbad inkubiert. Nach 45 min wurde der Ansatz unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Zur Entfernung von überschüssigem Reagenz wurde eine SiOH-SPE durchgeführt. Dazu wurde eine mit 500 mg SiOH-Material befüllte SPE-Säule mit 1 Säulenvolumen (SV) Methanol, mit 1 SV Diethyläther gewaschen und mit 2 SV Chloroform äquilibriert. Die PFB-veresterten F<sub>1</sub>-Phytoprostane wurden in 2 ml Chloroform rekonstituiert und auf die Säule aufgegeben. Überschüssige Reagenzien wurden mit 1 SV Diethyläther entfernt. Die PPF<sub>1</sub>-PFB-Ester wurden anschließend mit 2 SV Diethyläther/Methanol 9:1 (v/v) eluiert und in einem Stickstoffstrom getrocknet.

### 7.6 Herstellung von Trimethylsilyläthern

Die freien Hydroxy-Gruppen der OH-FS oder der F<sub>1</sub>-Phytoprostane mussten ebenfalls derivatisiert werden. Dazu wurden die Verbindungen in 200  $\mu$ l Chloroform gelöst und mit 50  $\mu$ l N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (BSTFA) für 45 min bei 40°C inkubiert. Die dabei entstandenen Trimethylsilyläther wurden anschließend in einem Stickstoffstrom bis zur Trockne eingengt.

### 7.7 Katalytische Hydrierung

Für die Reduktion von Doppelbindungen wurde eine katalytische Hydrierung durchgeführt. Die Probe wurde dazu in 1 ml Methanol gelöst und mit einer Spatelspitze Platin-(IV)-oxid (Katalysator nach Adams und Shriner) versetzt. Anschließend wurde für 10 min molekularer Wasserstoff über eine Glaskapillare durch den Reaktionsansatz geleitet. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Katalysator abfiltriert, der Filter mit 1 ml Methanol nachgespült und das klare Filtrat bis zur Trockene eingengt. Der so erhaltene Rückstand konnte weiter derivatisiert werden.

## 8. Zuordnung einiger Isomere der F<sub>1</sub>-Phytoprostane

Als Isomeren-reine Standards standen die in der Abbildung III.2 dargestellten (*ent*)-PPF<sub>1</sub>-Isomere jeweils als (*R*)- und (*S*)-Enantiomere zur Verfügung, die von T. Durrand (Faculte De Pharmacie De Montpellier, Universite Montpellier) chemisch synthetisiert wurden. Die PPF<sub>1</sub>-Isomere (siehe Abbildung III.2, C und D) sind für einen Vergleich mit den (*ent*)-Verbindungen (siehe Abbildung III.2, A und B) ebenfalls abgebildet.

Die Bestimmung von F<sub>1</sub>-Phytoprostanen erfolgte über eine durch Autoxidation von  $\alpha$ -Linolensäure in einer <sup>18</sup>O<sub>2</sub>-Atmosphäre hergestellte PPF<sub>1</sub>-Isomerenmischung (Imbusch und Mueller, 2000a). Der Ansatz wurde derivatisiert (siehe III.7.2) und über GC-NICI-MS analysiert (Imbusch und Mueller, 2001).

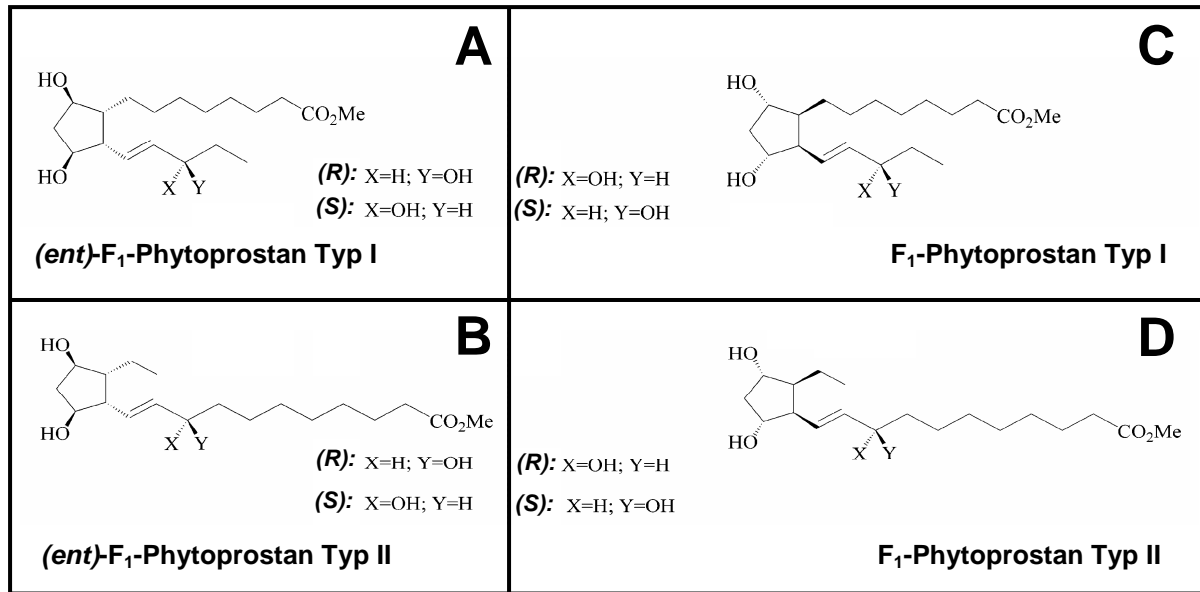


Abbildung III.2: Synthetisierte (*ent*)-F<sub>1</sub>- und F<sub>1</sub>-Phytoprostane, Abbildung verändert nach El Fangour et al. (2004).

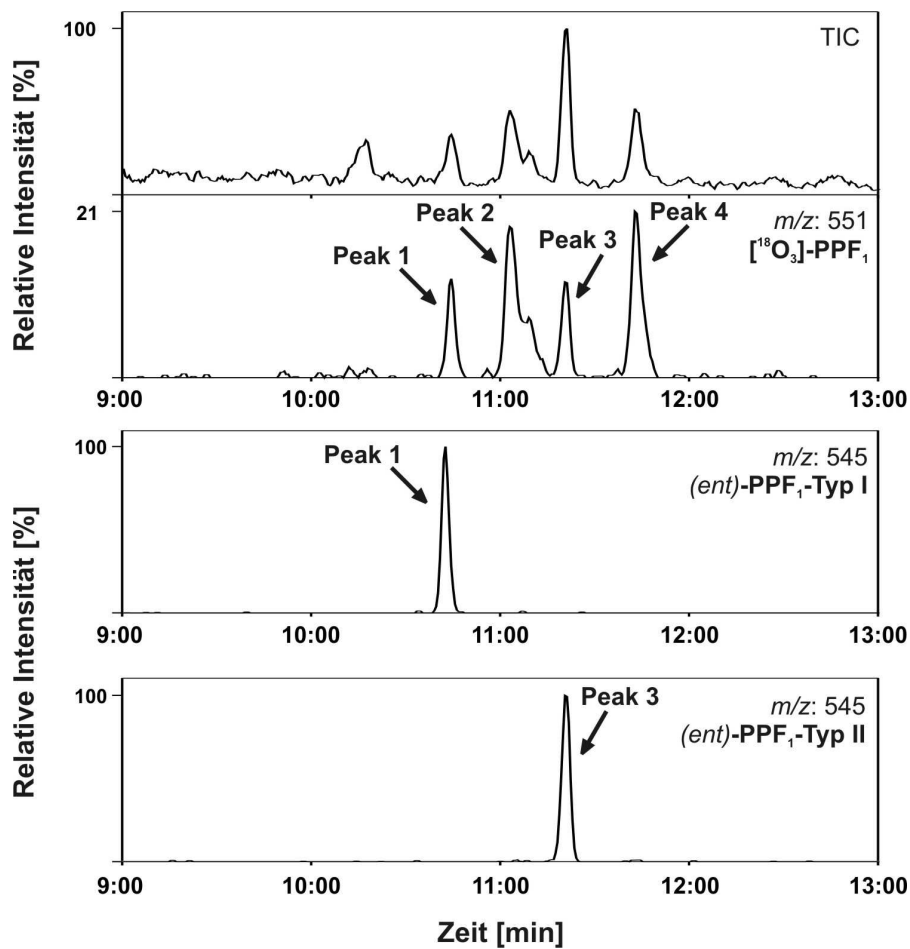


Abbildung III.3: GC-MS-Chromatogramme (NICI) der  $[M-PPF]^-$ -Ionen des  $[^{18}O_3]$ -PPF<sub>1</sub>-Standards bei *m/z* 551, Totalionenstrom (TIC) sowie von synthetisierten (*ent*)-PPF<sub>1</sub>-Typ I und Typ II bei *m/z* 545.

Eine Auftrennung des [ $^{18}\text{O}_3$ ]-PPF<sub>1</sub>-Standards mittels GC ergab das in Abbildung III.3 dargestellte Chromatogramm. Die theoretisch 32 Isomere koeluierten dabei in vier Peaks. Die synthetisierten (*ent*)-PPF<sub>1</sub>-Isomere konnten, mittels ihrer Retentionszeiten auf der GC-Säule, den Isomeren des, auch für die Untersuchungen an *A. thaliana* verwendeten, [ $^{18}\text{O}_3$ ]-PPF<sub>1</sub>-Standards zugeordnet werden. Es ergab sich eine Zuordnung von (*ent*)-PPF<sub>1</sub>-Typ I (*S*) und (*ent*)-PPF<sub>1</sub>-Typ I (*R*) zu Peak 1 und von (*ent*)-PPF<sub>1</sub>-Typ II (*S*) und (*ent*)-PPF<sub>1</sub>-Typ II (*R*) zu Peak 3.

## IV. Ergebnisse

### 1. Herstellung von Hydroxy-Fettsäuren als Standardsubstanzen

Für den Nachweis und die Konzentrationsbestimmungen von OH-FS in *A. thaliana* wurden die im Folgenden näher beschriebenen OH-FS-Isomere als Standardsubstanzen hergestellt. Hierbei wurde zunächst der enzymatische Biosyntheseweg über LOX verfolgt, wobei LOX Linol- und  $\alpha$ -Linolensäure zu den entsprechenden 9(S)- oder 13(S)-Hydroperoxy-Fettsäuren umsetzt. Eine zweite Synthese von Hydroperoxy-Fettsäuren erfolgte über eine Autoxidation von Linol- und  $\alpha$ -Linolensäure in Gegenwart von Sauerstoff. Hierbei wurden nicht-enzymatisch gebildete racemische 9(R/S)-, 12(R/S)-, 13(R/S)- und 16(R/S)-Regio-isomere der Hydroperoxyoctadecadien (HPODE)- und der Hydroperoxyoctadecatriensäure (HPOTE) gewonnen. Die entstandenen Hydroperoxy-Fettsäuren wurden mittels Natriumborhydrid oder Zinn-(II)-chlorid zu den entsprechenden OH-FS reduziert. Eine anschließende Aufreinigung erfolgte über präparative Dünnschichtchromatographie oder mittels präparativer RP-HPLC. Die Auftrennung der OH-FS in ihre Regioisomere erfolgte über NP-HPLC. Eine anschließende Identifizierung der Regioisomere wurde mittels GC-MS durchgeführt. Die Konzentrationen der enzymatisch und nicht-enzymatisch hergestellten OH-FS wurden im Anschluss photometrisch mittels UV-Spektroskopie bestimmt. Hierfür wurde der molare Extinktionskoeffizient von 13-HPOTE ( $\epsilon_{234}$ :  $23.000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ) zugrunde gelegt (Graff *et al.*, 1990). Dieser Extinktionskoeffizient konnte für die Quantifizierung aller hergestellten OH-FS-Isomere verwendet werden, da diese jeweils über ein konjugiertes Dien-System in Verbindung mit einer Hydroxy- bzw. Hydroperoxy-Gruppe verfügen, d.h. das gleiche Chromophor enthalten.

#### 1.1 Herstellung von Hydroxy-Fettsäuren mittels Lipoxxygenase

Für die Herstellung von OH-FS wurde eine käufliche LOX aus Sojabohne verwendet. Um die Inkubationszeit der Linolsäure für die enzymatische Umsetzung zu 13(S)-HPODE zu ermitteln, wurden 14 mg Linolsäure in 100  $\mu\text{l}$  n-Oktan gelöst und nach Zugabe von 50 ml 100 mM Natriumboratpuffer (pH 7,5) zuerst für 1 min im Ultraschallbad gemischt und anschließend gerührt. Durch die Zugabe von 4 mg Soja-LOX wurde die Reaktion gestartet und dieser Lösung im Abstand von jeweils 5 min ein Aliquot von 200  $\mu\text{l}$  entnommen. Jede Probe wurde mit 100 mM Natriumborat-Puffer auf 1 ml verdünnt und die Absorption gegen 100 mM Natriumborat-Puffer als Referenz vermessen. Über die eingesetzte Menge an Linolsäure wurde mittels des molaren Extinktionskoeffizienten von 13-HPOTE die theoretische Absorption, bezogen auf eine vollständige Umsetzung von Linolsäure zu HPODE, berechnet. Die berechnete Absorption wurde im Experiment nach 2,5 h erreicht,

wonach kein weiterer Anstieg der Absorption mehr zu beobachten war (siehe Abbildung IV.1). Weitere Inkubations-Ansätze zur Bildung von HPODE mittels LOX wurden in folgenden Versuchen für mindestens 3 h inkubiert.

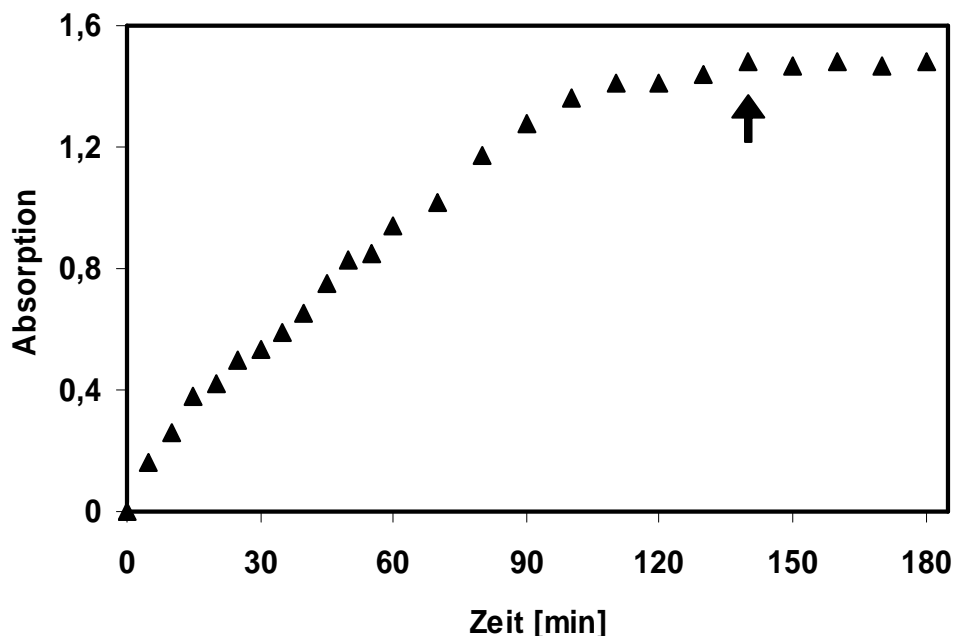


Abbildung IV.1: Zeitlicher Verlauf der Umsetzung von Linolsäure zu konjugierten Dienen mit Sojabohnen-LOX bei Raumtemperatur. Die Akkumulation der Reaktionsprodukte wurde durch Messung des Anstiegs der Absorption bei einer Wellenlänge von 234 nm verfolgt. Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt der kompletten Umsetzung der Linolsäure.

Am Ende der Inkubationszeit wurden 100  $\mu$ l 5% BHT in Methanol (*m/v*) zugesetzt, um eine Weiterreaktion der gebildeten Hydroperoxide zu verhindern. Der Ansatz wurde mit 1 M Citronensäure auf einen pH von 2 eingestellt und zweimal mit jeweils 20 ml Diethyläther extrahiert. Die vereinigten Ätherphasen wurden über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und in einem Stickstoffstrom bis zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wurde in 500  $\mu$ l Methanol gelöst. Die gebildeten HPODE wurden anschließend zu HODE reduziert, analog der nicht-enzymatisch gebildeten HPOTE (s. u.). Bei der Herstellung von HPODE wurde eine Ausbeute von 60,8 % bezogen auf die eingesetzte Linolsäure erreicht, nach der Reduktion von HPODE betrug die Ausbeute an HODE 22,5 %. Die Herstellung von HPOTE aus  $\alpha$ -Linolensäure erfolgte analog mit vergleichbarer Ausbeute.

## 1.2 Nicht-enzymatische Herstellung von Hydroxy-Fettsäuren

Durch die Addition von Sauerstoff an  $sp^2$ -hybridisierte Kohlenstoff-Atome werden bei der Autoxidation aus Linolsäure 9(*R,S*)- und 13(*R,S*)-HPODE sowie aus  $\alpha$ -Linolensäure 9(*R,S*)-, 12(*R,S*), 13(*R,S*) und 16(*R,S*)-HPOTE gebildet. Für die Herstellung von HODE wurden 50 mg Linolsäure in 5 ml Methanol gelöst und in einem unverschlossenen 100 ml Rundkolben 4 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurden die gebildeten HPODE im Vakuum auf 1 ml eingeeengt und mit Natriumborhydrid oder Zinn-(II)-chlorid zu HODE reduziert. Im ersten Fall wurde der Ansatz mit 80 mg Natriumborhydrid versetzt und 20 min auf Eis sowie, nach anschließender Zugabe von weiteren 20 mg Natriumborhydrid, für 5 min bei Raumtemperatur gerührt. Um überschüssiges Reagenz zu entfernen, wurde der Ansatz mit 50 ml Wasser versetzt, mit 1 M Citronensäure auf pH 2 eingestellt und zweimal mit 50 ml Diethyläther ausgeschüttelt. Die vereinigten Ätherphasen wurden unter Vakuum bis zur Trockne eingeeengt, der Rückstand in 3 ml Diethyläther/Essigsäure 98:2 (*v/v*) gelöst und über eine mit 500 mg Silica-Material gefüllte Festphasenextraktions-Säule filtriert. Das Filtrat wurde zur Trockne eingeeengt und der Rückstand in Methanol aufgenommen. Alternativ zur Reduktion mit Natriumborhydrid wurden die Hydroperoxy-Fettsäuren in Methanol gelöst, mit 500 mg Zinn-(II)-chlorid, das zuvor in 10 ml Wasser angelöst wurde, für 20 min auf Eis und anschließend für 20 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abschluss der Reaktion wurden weitere 80 ml Wasser zugegeben, um den Anteil des organischen Lösungsmittels auf unter 1 % zurückzudrängen, und zweimal mit jeweils 100 ml Diethyläther ausgeschüttelt. Die vereinigten Ätherphasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert, im Vakuum zur Trockne eingeeengt und in Methanol aufgenommen. Die anschließende Reinigung der OH-FS wurde zum einen mittels präparativer DC und zum anderen mit präparativer RP-HPLC durchgeführt, wobei eine Bestimmung der Ausbeute an HODE nur nach der Aufreinigung mittels RP-HPLC und Reduktion mit Natriumborhydrid durchgeführt wurde. Diese betrug 1,3 % bei 20 mg an eingesetzter Linolsäure. Analog wurde in einem weiteren Experiment auch HOTE mittels Autoxidation aus  $\alpha$ -Linolensäure hergestellt, wobei die Berechnung der Ausbeuten nach der Aufreinigung mittels RP-HPLC durchgeführt wurde und eine Ausbeute von 3,1 % nach der Reduktion mit Natriumborhydrid sowie 0,5 % nach der Reduktion mit Zinn-(II)-chlorid, bei jeweils 20 mg eingesetzter  $\alpha$ -Linolensäure, ergab.

## 1.3 Reinigung von Hydroxy-Fettsäuren mittels präparativer Dünnschichtchromatographie

Die dünnschichtchromatographische Auftrennung sowie die präparative Isolierung von HODE/HOTE wurde auf Polygram®SIL G/UV<sub>254</sub> Kieselgelfolien mit Fluoreszenzindikator (Macherey und Nagel, Düren) durchgeführt. Die DC-Platten wurden hierbei in Hexan/Diethyläther/Essigsäure 66:33:1 (*v/v/v*) entwickelt. Eine Unterscheidung der OH-FS

von weiteren Oxidationsprodukten aus dem Reaktionsgemisch erfolgte auf der DC-Platte mittels UV-Absorption oder durch Anfärben mit Jod-Dämpfen (siehe III.5.1). Hierbei wurden  $R_f$ -Werte von 0,28 - 0,30 für 9- und 13-HODE, von 0,15 - 0,24 für 9-HOTE sowie von 0,27 - 0,37 für 13-HOTE ermittelt. In folgenden Experimenten war eine schnelle Zuordnung der OH-FS über ihre  $R_f$ -Werte möglich. Die Bereiche, die OH-FS enthielten, wurden von der DC-Folie isoliert und das SiOH-Material mit 1 ml Methanol extrahiert. Um Feststoffpartikel zu entfernen, wurde die Lösung filtriert und die OH-FS anschließend mittels GC-MS-Analytik im NICI-Modus identifiziert. Eine Bestimmung der Ausbeute wurde nur für HODE nach enzymatischer Gewinnung berechnet. Die Ausbeute betrug 4,5 %, bezogen auf die eingesetzte Linolsäure im LOX-Ansatz.

#### 1.4 Präparative Reinigung von Hydroxy-Fettsäuren mittels RP-HPLC

Als alternative Methode zu einer Aufreinigung über präparative DC wurden OH-FS mittels präparativer HPLC an einer analytischen RP18-Trennsäule (Merck Purospher Star 100 RP18 endcapped, 250 x 4 mm, Partikelgröße: 5  $\mu$ m) von ihren Ausgangsverbindungen abgetrennt, wobei die OH-FS bei einer Wellenlänge von 234 nm, dem Absorptionsmaximum konjugierter Diene, detektiert wurden (vgl. III.5.3.1). Weiterhin konnten als Neben- und Folgeprodukte entstandene höher oxidierte Oxylipine beseitigt werden, wie z.B. Di- oder Tri-OH-FS, Ketone sowie zyklische Verbindungen. Hierzu wurden die OH-FS (200 bis 300  $\mu$ g in 100  $\mu$ l Methanol) in die HPLC-Anlage injiziert. Die von der Trennsäule eluierenden OH-FS wurden anhand ihres charakteristischen Absorptionsspektrums identifiziert und somit ihre Retentionszeiten auf der Trennsäule ermittelt. Die Eluate wurden in Rundkolben aufgefangen und unter Vakuum zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde wahlweise zur anschließenden Derivatisierung für die GC-MS-Analytik in Methanol oder für eine anschließende Reinigung mittels NP-HPLC in Hexan aufgenommen.

In Abbildung IV.2, A ist exemplarisch ein RP-HPLC Chromatogramm einer Reaktionsmischung von über 4 Tage autoxidierter  $\alpha$ -Linolensäure nach Reduktion mit Natriumborhydrid dargestellt. Der Peak bei einer Retentionszeit von 23,9 min enthielt 9(*R,S*)-, 12(*R,S*), 13(*R,S*) und 16(*R,S*)-HOTE, die sich mit RP-HPLC nicht auftrennen ließen. Das während der Elution der HOTE-Isomere vom UV-Detektor ermittelte Absorptionsspektrum zeigt ein charakteristisches Maximum bei einer Wellenlänge von 234 nm für konjugierte Diene. Nach der präparativen Reinigung von HOTE aus dem Reaktionsansatz wurde ein Aliquot in die HPLC-Anlage injiziert, um die chromatographische Reinheit zu bestimmen. In Abbildung IV.2, B ist ein Chromatogramm von HOTE abgebildet, aus dessen Peakflächen bei einer Wellenlänge von 234 nm ein Reinheitsgrad von 98,2 % hervorgeht.



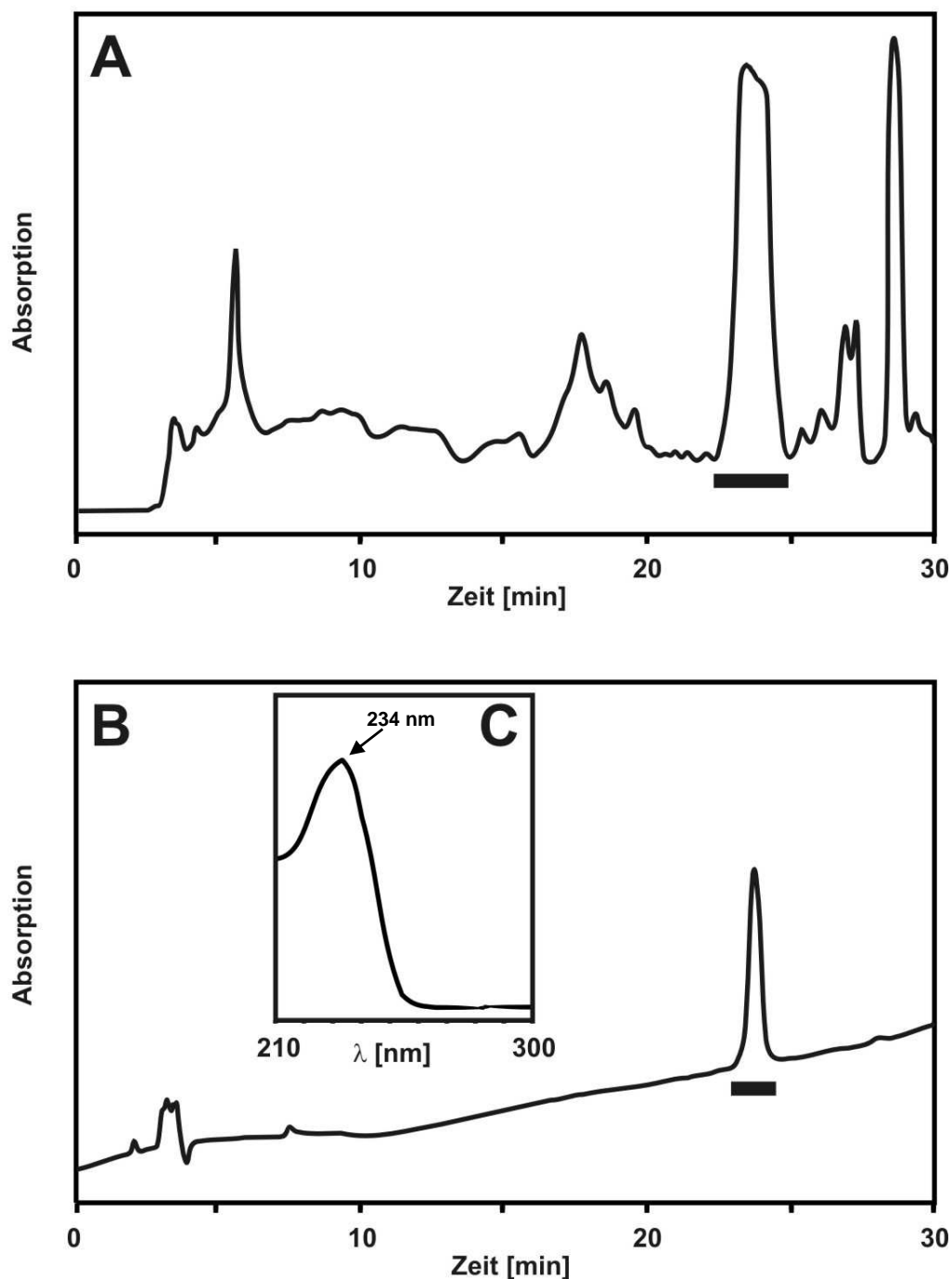


Abbildung IV.2: RP-HPLC-Chromatogramme: (A) autoxydierte  $\alpha$ -Linolensäure nach Reduktion mit Natriumborhydrid. Für die Reinigung über präparative HPLC wurde die Trennsäule mit 200 bis 300  $\mu\text{g}$  HOTE beladen. (B) Isomergemisch aus 9(R,S)-, 12(R,S), 13(R,S) und 16(R,S)-HOTE nach präparativer Reinigung mittels RP-HPLC. Schwarzer Balken: HOTE, Retentionszeit ( $R_t$ ): 23,9 min. (C) Absorptions-Spektrum von HOTE (Waters HPLC-Anlage, Trennsäule Purospher Star 100 RP18 endcapped, 250 x 4 mm, Partikelgröße: 5  $\mu\text{m}$  von Merck, Flussrate: 0,8 ml/min, Detektion bei einer Wellenlänge von 234 nm, LM A: Wasser/Essigsäure 99,9 : 0,1 (v/v), LM B: Methanol/Essigsäure 99,9 : 0,1 (v/v), Gradient: 0 min, 30 % A; 20 min, 0 % A; 30 min, 0 % A).

Um zu betätigen, dass sich HODE und HOTE auf der verwendeten stationären Phase trennen lassen, wurde eine Mischung beider Referenzsubstanzen hergestellt und mittels HPLC analysiert. Wie der Abbildung IV.3 zu entnehmen ist, eluierte HODE bei den gewählten Bedingungen nach 23,4 min und damit vor HOTE mit einer Retentionszeit von 23,9 min. Eine weitere Auftrennung von HODE sowie HOTE in die einzelnen Regioisomere war mittels RP-HPLC nicht möglich.

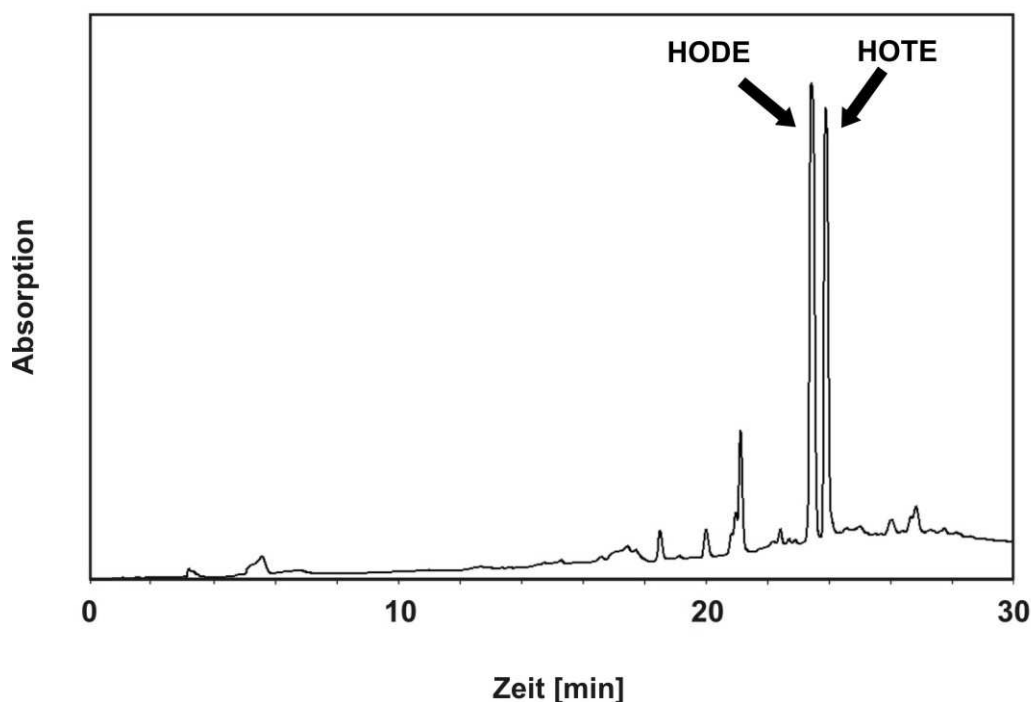


Abbildung IV.3: RP-HPLC-Chromatogramm: Trennung von HODE- ( $R_t$ : 23,4 min) und HOTE-Standards ( $R_t$ : 23,9 min). (Surveyor HPLC-Anlage, Trennsäule Purospher Star 100 RP18 endcapped, 250 x 4 mm, Partikelgröße: 5  $\mu$ m von Merck, Flussrate: 0,8 ml/min, Detektion bei einer Wellenlänge von 234 nm, LM A: Wasser/Essigsäure 99,9 : 0,1 (v/v), LM B: Methanol/Essigsäure 99,9 : 0,1 (v/v), Gradient: 0 min, 30 % A; 20 min, 0 % A; 30 min, 0 % A).

### 1.5 Präparative Reinigung von Hydroxy-Fettsäuren mittels NP-HPLC

Nach der Aufreinigung mittels DC oder RP-HPLC wurden die OH-FS in n-Hexan aufgenommen und mittels NP-HPLC in ihre Regioisomere aufgetrennt. Die Chromatographie mittels NP-HPLC konnte für die präparative Trennung von HODE und HOTE erst nach vorheriger Aufreinigung verwendet werden, da ansonsten eine zu große Anzahl weiterer Oxidationsprodukte aus dem Reaktionsansatz mit den OH-FS koeluiert hätten. Es wurden absolute Mengen von 100 bis 200  $\mu$ g in n-Hexan gelöster HODE bzw. HOTE mittels HPLC analysiert und diese über eine analytische Silica-Trennsäule (Knauer Li Chrospher Si 60, 250 x 4 mm, Partikelgröße: 5 $\mu$ m) in ihre Regioisomere aufgetrennt. Dabei erfolgte eine Auftrennung von HODE in die 9(R,S)- und 13(R,S)-Regioisomere. HOTE wurde in die

9(*R,S*)-,12(*R,S*)-,13(*R,S*)- und 16(*R,S*)-Regioisomere getrennt. Die Regioisomere wurden nach der Elution von der Säule in Rundkolben aufgefangen und nach Entfernung des Eluenten im Vakuum für die Verwendung als Standardsubstanzen in 1 ml Methanol gelöst. Ihre Identifizierung wurde mittels GC-MS durchgeführt (s. u.).

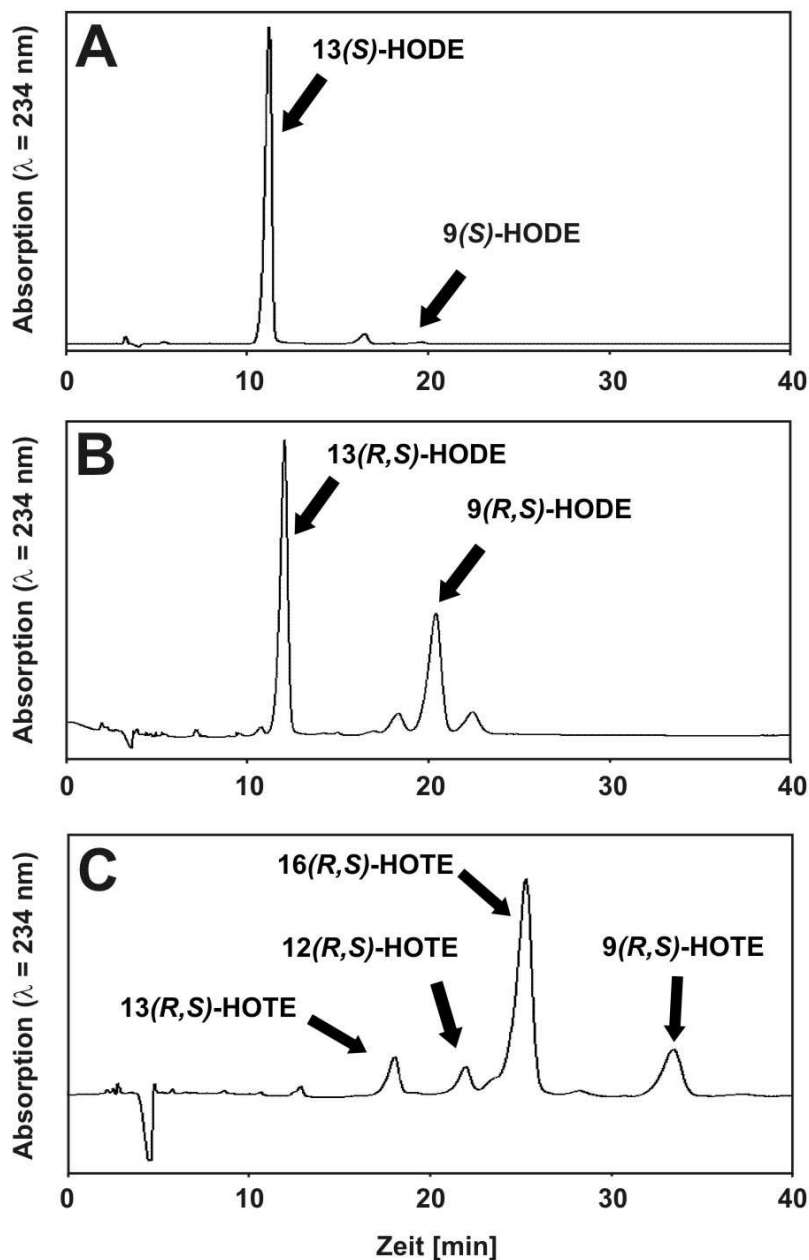


Abbildung I.V.4: NP-HPLC-Chromatogramme: Trennung der Regioisomere von (A) HODE nach enzymatischer Bildung aus Linolsäure mittels Sojabohnen-LOX, (B) von HODE nach Autoxidation von Linolsäure, (C) von HOTE nach Autoxidation von  $\alpha$ -Linolensäure (Merck Hitachi HPLC-Anlage, Knauer Li Chrospher Si 60 Trennsäule, 250 x 4 mm, Partikelgröße: 5  $\mu$ m, Detektion bei einer Wellenlänge von 234 nm, Flussrate: 1 ml/min, isokratischen Bedingungen, Eluent: *n*-Hexan/Isopropanol/ Essigsäure, 98 : 1,95 : 0,05 (v/v/v)).

In Abbildung IV.4, A ist ein NP-Chromatogramm von HODE nach enzymatischer Herstellung aus Linolsäure und Reduktion mit Natriumborhydrid dargestellt. Dabei kann ein Verhältnis von 99 % 13(S)-HODE ( $R_t$ : 11,2 min) im Vergleich zu 1 % 9(S)-HODE ( $R_t$ : 19,1 min) nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu ist in Abbildung IV.4, B ein NP-Chromatogramm von HODE nach Herstellung mittels Autoxidation von Linolsäure und anschließender Reduktion mit Natriumborhydrid dargestellt. Hierbei wurde ein Verhältnis von 60 % 13(R,S)-HODE im Vergleich zu 40 % 9(R,S)-HODE nachgewiesen. Eine Trennung von HOTE nach Umsetzung von  $\alpha$ -Linolensäure mit LOX mittels NP-HPLC wurde nicht durchgeführt. Die Auftrennung von HOTE nach Autoxidation von  $\alpha$ -Linolensäure und Reduktion mit Natriumborhydrid ist in Abbildung IV.4, C dargestellt, wobei eine Trennung in 15 % 9(R,S)-HOTE ( $R_t$ : 33,5 min), 8 % 12(R,S)-HOTE ( $R_t$ : 22,0 min), 10 % 13(R,S)-HOTE ( $R_t$ : 18,1 min) und 67 % 16(R,S)-HOTE ( $R_t$ : 25,3 min) erfolgte. Das ermittelte Flächenverhältnis nach NP-HPLC gab die Anteile der einzelnen Regioisomere von den insgesamt gebildeten HOTE wieder. Eine von Frankel *et al.* (1977) durchgeführte Studie ergab auf der Ebene der Hydroperoxy-Fettsäuren bei der Peroxidierung von  $\alpha$ -Linolensäure eine Isomerenverteilung von 30,6 % 9-HPOTE, 10,1 % 12-HPOTE, 10,8% 13-HPOTE und 48,6 % 16-HPOTE. Trotz der Abweichungen der Anteile von 9- und 16-HPOTE zu den in Abbildung IV.4, C gezeigten Ergebnissen ist auch hier eine bevorzugte Bildung der Hydroperoxide zu beobachten, die bezogen auf ihre Position innerhalb des Octadecatriensystems des HOTE-Moleküls eine „äußere“ Hydroperoxy-Gruppe besitzen. Die geringeren Anteile an 12- und 13-HPOTE im Vergleich zu den Isomeren mit „äußeren“ Hydroperoxy-Gruppen ergeben sich aus den bei diesen beiden Isomeren verstärkt ablaufenden Folgereaktionen, bei denen zyklische Produkte gebildet werden (Frankel, 1998). Eine Quantifizierung der durch NP-HPLC isolierten 9(R,S)-,12(R,S)-,13(R,S)- und 16(R,S)-HOTE-Isomere erfolgte mittels RP-HPLC gegen 15(S)-HETE als externem Standard, wie unter IV.1.4 beschrieben. Es wurden Ausbeuten von 0,2 bis 1,7 % der einzelnen Regioisomere beim Einsatz von 50 mg  $\alpha$ -Linolensäure erzielt.

## 1.6 Identifizierung von Hydroxy-Fettsäuren

Zur Identifizierung der HODE, HOTE bzw. HETE-Regioisomere nach präparativer Trennung mittels HPLC wurden diese im EI-Modus des GC-MS nachgewiesen. Dazu wurden die Doppelbindungen der OH-FS katalytisch hydriert, die Carboxyl-Gruppen zum Methylester umgesetzt und die im Molekül verbleibende Hydroxy-Gruppe zum Trimethylsilyläther derivatisiert (siehe III.7.1). Die Derivatisierungsschritte sind in der Abbildung IV.5 exemplarisch für 13-HOTE dargestellt.

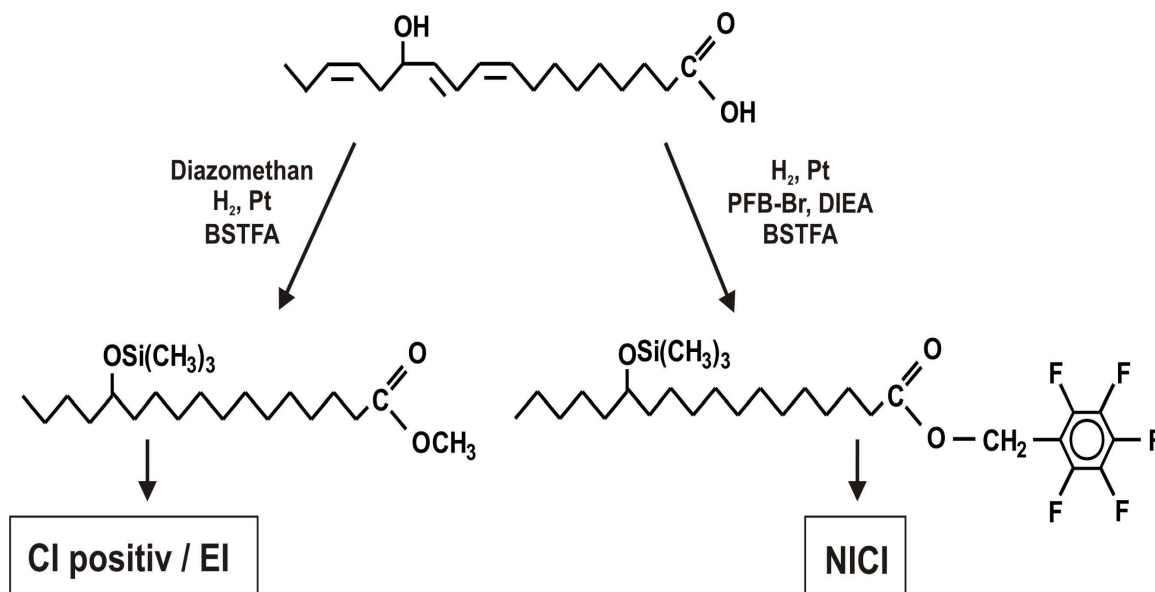


Abbildung IV.5: Derivatisierung von 13-HOTE für die GC-MS-Analytik im positiven CI- und EI-Modus sowie im NICI-Modus. 13-HOTE wurde jeweils katalytisch hydriert, die Hydroxy-Gruppe zum Trimethylsilyläther derivatisiert und die Carboxyl-Gruppe zum Methyl- bzw. PFB-Ester umgesetzt.

Im EI-Modus war das Moleküllion  $[M]^+$  nur mit geringer Intensität nachweisbar. Es erfolgte eine reproduzierbare Fragmentierung der derivatisierten OH-FS-Moleküle jeweils zwischen dem C-Atom, das zum Trimethylsilyläther umgesetzt wurde, also der ursprünglichen Position der Hydroxy-Gruppe, und einem der beiden benachbarten C-Atome. Dies führte zur Bildung von zwei verschiedenen Fragmenten, die jeweils den Trimethylsilyläther tragen. Daneben entstanden ungeladene, nicht detektierbare Fragmente, so genannte Neutralteilchen. Im Falle der geladenen Fragmente unterscheidet man zwischen Fragmenten A, welche das Methyl-Ende des OH-FS-Derivates tragen, und Fragmenten B, die das methylierte Carboxyl-Ende besitzen (siehe Abbildung IV.6). Eine katalytische Hydrierung war an dieser Stelle notwendig, da es bei der Analyse von nicht hydrierten OH-FS-Molekülen zu keiner Bildung von zwei charakteristischen Fragment in einem stabilen Verhältnis kommt, sondern zu einer Vielzahl von Fragmenten mit vergleichsweise geringer Intensität. Ein Nachteil der katalytischen Hydrierung war ein Verlust an Information, da eine Unterscheidung zwischen HODE und HOTE somit nicht mehr möglich war.

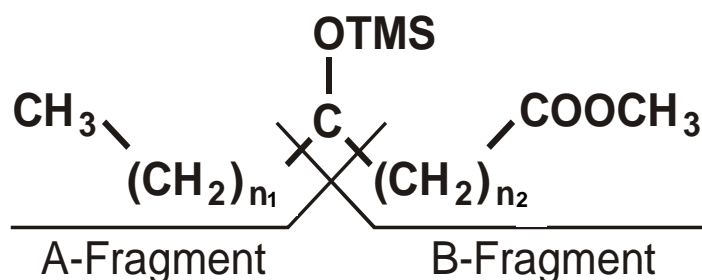


Abbildung IV.6: Charakteristische Fragmentierung von OH-FS nach katalytischer Hydrierung, als Methylester und Trimethylsilyläther. Es resultierten ein A- sowie ein B-Fragment.  $n_1$ ,  $n_2$ : Anzahl der  $\text{CH}_2$ -Gruppen.

In der Abbildung IV.7 sind exemplarisch die Massenspektren von 13-OH-FS, als Vertreter der auch enzymatisch gebildeten OH-FS, und von 16-OH-FS, als nicht-enzymatisch gebildete OH-FS, gezeigt. Dabei werden für 13- bzw. 16-OH-FS jeweils zwei charakteristische Fragmente mit den relativen Massen 173 bzw. 131 für die A-Fragmente sowie 315 und 357 für die B-Fragmente gebildet.

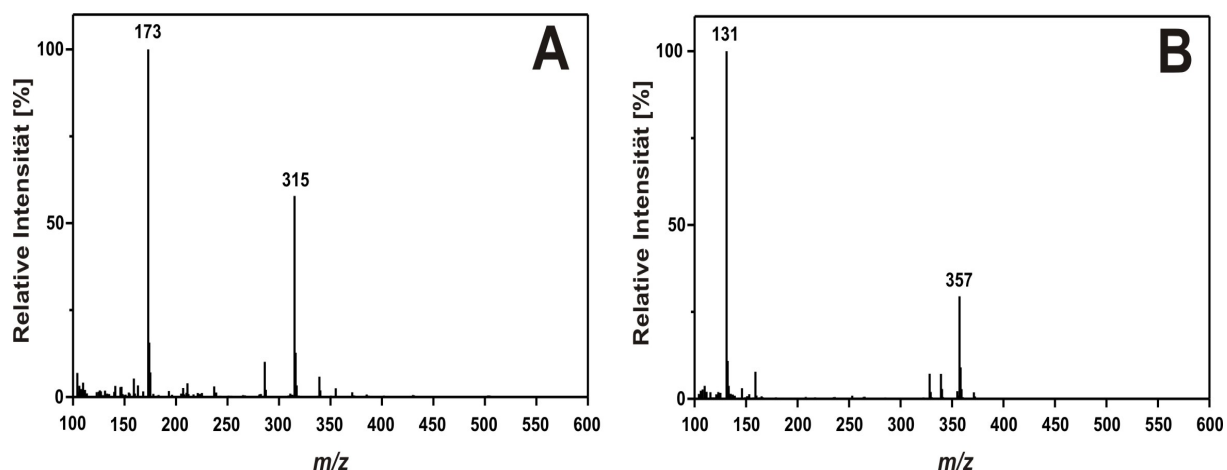


Abbildung IV.7: Massenspektren (EI) von (A) 13-HOTE: Detektion des A-Fragments ( $m/z$  173) und des B-Fragments ( $m/z$  315) und (B) 16-HOTE: Detektion des A-Fragments ( $m/z$  131) und des B-Fragments ( $m/z$  357). 13- und 16-HOTE wurden nach katalytischer Hydrierung als Methylester und Trimethylsilyläther-Derivate analysiert.

Im Anschluss an die Identifizierung der OH-FS im EI-Modus wurden dieselben Proben im positiven CI-Modus vermessen, um die Retentionszeiten der OH-FS auf der Trennsäule des GC-MS-Systems zu bestimmen. Die OH-FS, die ausgehend von Linol- sowie  $\alpha$ -Linolensäure gebildet wurden, wurden bei  $m/z$  387 oder nach Abspaltung der Hydroxy-Trimethylsilyl-Gruppe bei  $m/z$  297 nachgewiesen. In der Abbildung IV.8 ist exemplarisch ein CI-Chromatogramm des 13-OH-FS-Derivates dargestellt.

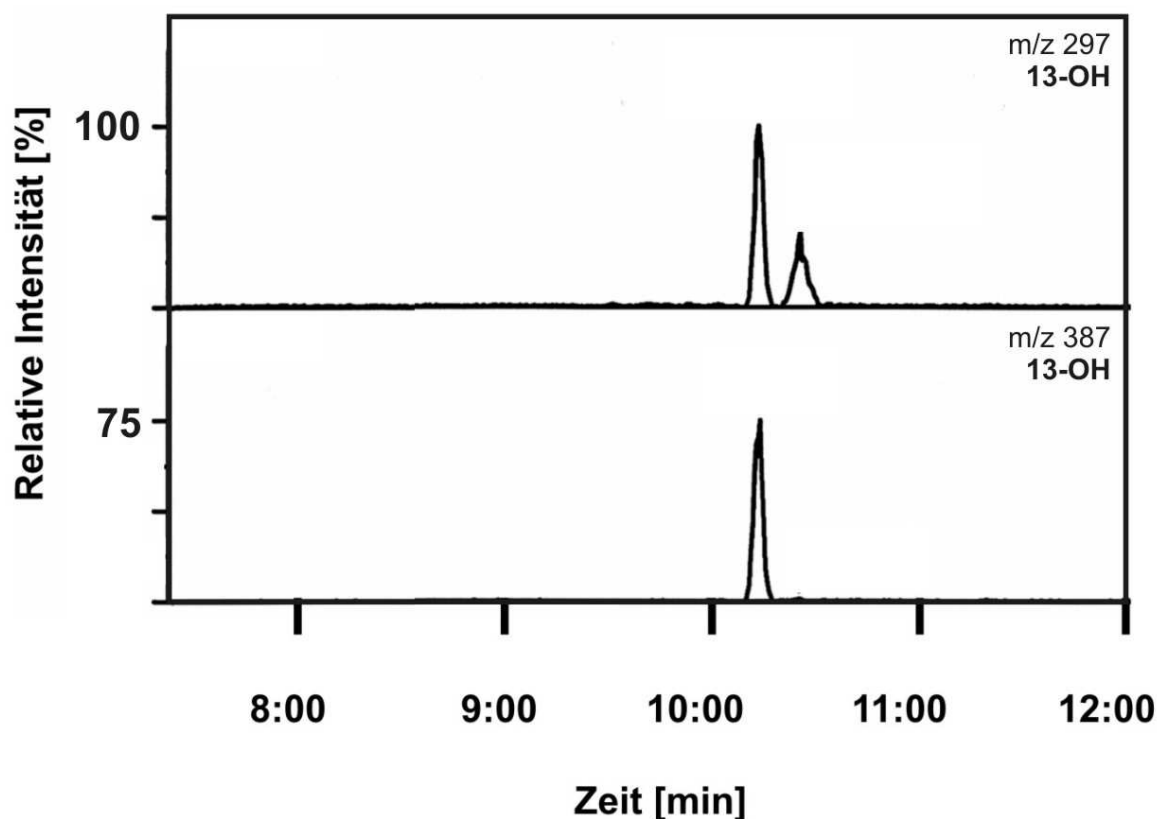


Abbildung IV.8: GC-MS-Chromatogramme (CI) von 13-HOTE nach katalytischer Hydrierung als Methylester und Trimethylsilyläther-Derivat. Es sind die  $[M+H]^+$ -Ionen bei ( $m/z$  387) sowie die  $[M-HO-TMS]^+$ -Ionen bei ( $m/z$  297) dargestellt.

Im Anschluss an die Identifizierung der OH-FS im EI-Modus und die Bestimmung ihrer Retentionszeiten im CI-Modus wurden die OH-FS-Isomere im NICI-Modus des GC-MS analysiert. Eine massenspektrometrische Bestimmung im NICI-Modus ist eine sehr empfindliche Nachweismethode für Fettsäuren und ihre Derivate. Sie wurde durchgeführt, um eine geringere Nachweisgrenze für die folgende Analytik an *A. thaliana* zu erreichen. Die Doppelbindungen der OH-FS wurden dazu katalytisch hydriert, die Carboxyl-Gruppe anschließend zum PFB-Ester umgesetzt und die interne Hydroxy-Gruppe zum Trimethylsilyläther derivatisiert (siehe Abbildung IV.6 sowie III.7). Die  $C_{18}$ -OH-FS wurden im Massenspektrometer als  $[M-PFB]^-$ -Anionen mit  $m/z$  371 und nach Abspaltung der Hydroxy-Trimethylsilyl-Gruppe als  $[M-PFB-HO-TMS]^-$ -Ionen mit  $m/z$  281 nachgewiesen, die HETE-Derivate als  $[M-PFB]^-$ -Anionen mit  $m/z$  399 sowie mit  $m/z$  309 nach Abspaltung der Hydroxy-Trimethylsilyl-Gruppe. In Abbildung IV.9 sind exemplarisch die Chromatogramme von 16-OH-FS sowie von 15-HETE dargestellt.

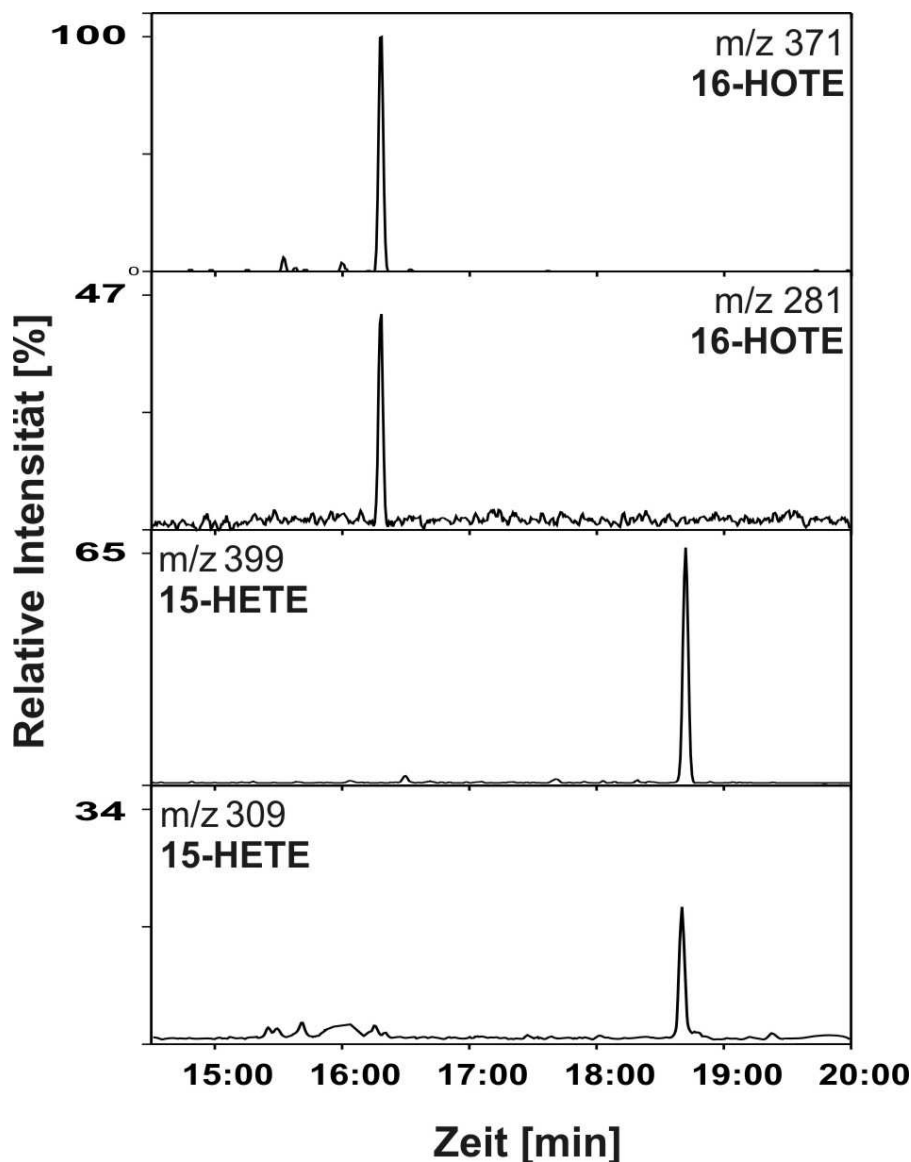


Abbildung IV.9: GC-MS-Chromatogramme (NICI) des 16-OH-FS- und 15-HETE-Standards. Es wurden äquimolare Mengen beider Standards katalytisch hydriert, die Carboxyl-Gruppen zu PFB-Estern umgesetzt sowie die Hydroxy-Gruppe zum Trimethylsilyläther derivatisiert. 16-OH-FS:  $[M-PFB]^-$  bei (m/z 371),  $[M-PFB-O-TMS]^-$  bei (m/z 281); 15-HETE:  $[M-PFB]^-$  bei (m/z 399),  $[M-PFB-HO-TMS]^-$  bei (m/z 309).

In den folgenden Untersuchungen an *A. thaliana* erfolgte die Identifizierung von OH-FS-Regioisomeren anhand ihrer Retentionszeiten und der charakteristischen Fragmente. Im Laufe der Studie wurden in Pflanzenmaterial zusätzlich 8-, 10-, 11- und 15-OH-FS identifiziert. In Tabelle IV.1 sind die Fragment-Massen der A- und B-Fragmente der OH-FS-Isomere sowie deren relative Intensitäten im Massenspektrum dargestellt. Die abgebildeten Retentionszeiten wurden auf einer Phenomenex Zebron ZB 5 Trennsäule (30 m x 0,25 mm, Filmdicke 0,25  $\mu$ m) des GC-MS-Systems 2 ermittelt (Temperaturgradient siehe III.5.4).



	<b>A-Fragment [m/z]</b> (relative Intensität [%])	<b>B-Fragment [m/z]</b> (relative Intensität [%])	<b>Retentionszeit [min]</b>
<b>8-HOTE</b>	243 (53)	245 (100)	9:58,2
<b>9-HOTE</b>	229 (81)	259 (100)	9:58,8
<b>10-HOTE</b>	215 (93)	273 (100)	9:59,4
<b>11-HOTE</b>	201 (100)	287 (94)	10:01,9
<b>12-HOTE</b>	187 (100)	301 (59)	10:04,9
<b>13-HOTE</b>	173 (100)	315 (43)	10:09,8
<b>15-HOTE</b>	145 (100)	343 (35)	10:28,6
<b>16-HOTE</b>	131 (100)	357 (12)	10:49,3
<b>5-HETE</b>	313 (39)	203 (100)	12:28,0
<b>12-HETE</b>	215 (100)	301 (67)	12:15,2
<b>15-HETE</b>	173 (100)	343 (72)	12:31,6

Tabelle IV.1: Fragment-Massen und relative Intensitäten der A- und B-Fragmente von OH-FS nach katalytischer Hydrierung, als Methylester und Trimethylsilyläther sowie Retentionszeiten auf der Trennsäule des GC-MS-Systems 2 (Temperaturgradient siehe III.5.4).

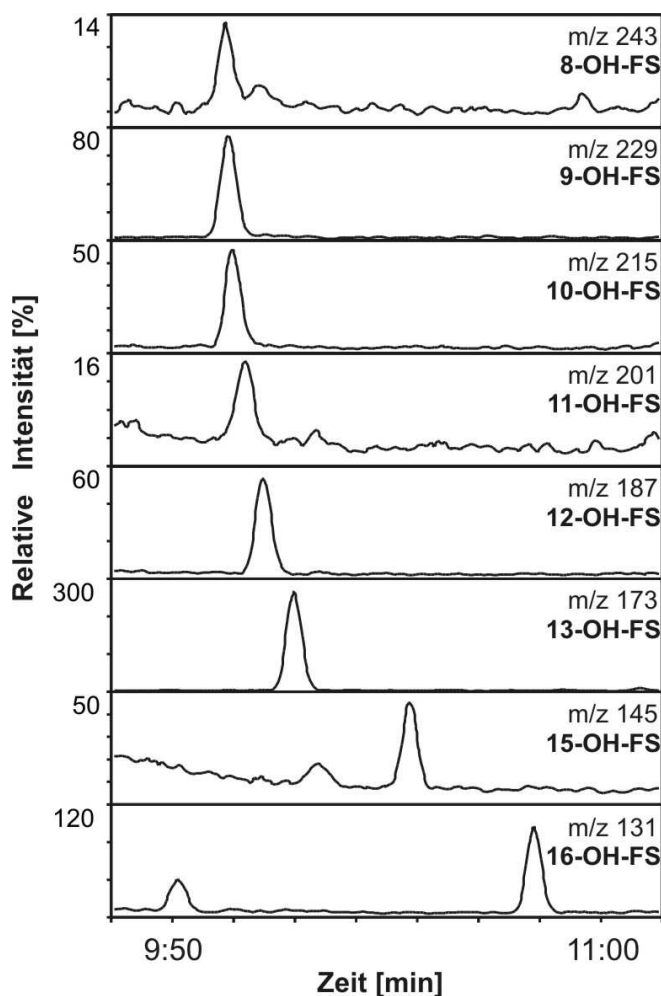


Abbildung IV.10: GC-MS-Chromatogramme (EI) eines Pflanzenextraktes von *A. thaliana*. Detektion der A-Fragmente der OH-FS nach katalytischer Hydrierung, als Methylester und Trimethylsilyläther-Derivate.

Die Quantifizierung von OH-FS in *A. thaliana* wurde ebenfalls im EI-Modus durchgeführt (Mueller *et al.*, 2006). Es wurden jeweils die Peak-Fläche des A-Fragments eines OH-FS-Isomers gegen die Peak-Fläche des A-Fragments des internen Standards 15-HETE verglichen und daraus die Konzentration an OH-FS berechnet. In der Abbildung IV.10 sind die GC-MS-Chromatogramme nach Reinigung und Derivatisierung von OH-FS aus *A. thaliana* gezeigt, wobei exemplarisch die A-Fragmente der untersuchten Verbindungen abgebildet sind. Analoge Chromatogramme ergab die Auswertung einer Referenzprobe für die B-Fragmente, wobei sich bei der Konzentrationsberechnung keine Abweichungen im Vergleich zu einer Berechnung über die A-Fragmente ergaben. Da die Massenspur der A-Fragmente ( $m/z$  173) des internen Standards 15-HETE in manchen Analysen durch pflanzliche Matrixbestandteile mit gleicher Retentionszeit überlagert war, wurde in Pflanzenproben über die B-Fragmente ausgewertet.

### 1.7 Herstellung von 15(S)-Hydroxyeikosatetraensäure

Die Herstellung von HETE erfolgte mittels LOX aus Arachidonsäure, nach anschließender Reduktion mit Natriumborhydrid sowie einer Aufreinigung mittels RP-HPLC, wobei in gleicher Weise vorgegangen wurde, wie bei der enzymatischen Herstellung von HODE (s. o.). Bei der nachfolgenden Quantifizierung mittels UV-Spektroskopie wurde eine Ausbeute von 12,3 % HETE beim Einsatz von 50 mg Arachidonsäure erzielt. Bei der Untersuchung der isolierten HETE auf ihre Isomerenreinheit mittels GC-MS wurde nachgewiesen, dass diese aus drei verschiedenen Regioisomeren bestand, wobei 15(S)-HETE mit einem Anteil von 97,6 % im Vergleich zu 12(S)-HETE (0,8 %) und 5(S)-HETE (1,6 %) bevorzugt gebildet wurde. Die HETE-Synthese mittels LOX war somit in hohem Maße regioselektiv. Deshalb konnte die erhaltene 15(S)-HETE nach der Reinigung mit RP-HPLC ohne weitere Trennung mittels NP-HPLC als interner Standard für die GC-MS-Analytik von OH-FS aus *A. thaliana* eingesetzt werden. Die Berechnung der Responsefaktoren von 9-,12-,13- und 16-OH-FS erfolgte ebenfalls gegen 15(S)-HETE (vgl. III.5.4.1). Die GC-MS-Chromatogramme der A- und B-Fragmente, die aus den drei HETE-Regioisomeren hervorgehen, sind in der Abbildung IV.11 dargestellt.

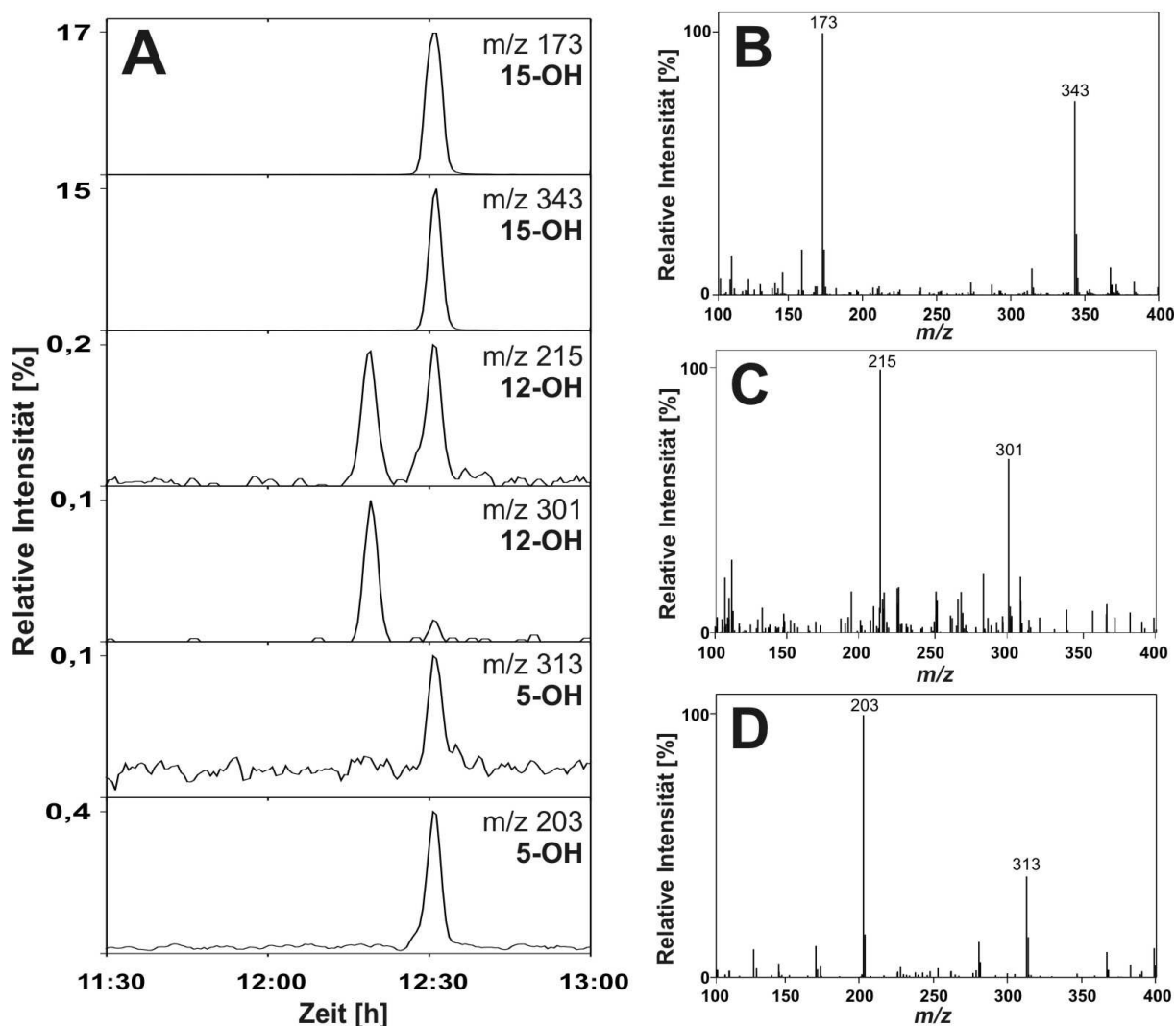


Abbildung IV.11: (A) GC-MS-Chromatogramme (EI) der A- und B-Fragmente des HETE-Standards. Detektion der A-Fragmente ( $m/z$  173, 215 und 313) sowie der B-Fragmente ( $m/z$  343, 301 und 203) nach katalytischer Hydrierung, als Methylester und Trimethylsilyläther-Derivate. (B-D) Massenspektren (EI) des HETE-Standards mit charakteristischen Fragmenten. (B) 15-HETE mit  $m/z$  173, 343, (C) 12-HETE mit  $m/z$  215, 301 und (D) 5-HETE mit  $m/z$  203, 313.

## 2. Bildung von Hydroxy-Fettsäuren in *A. thaliana* nach Kälteeinwirkung

Als eine langfristige Anpassung der Pflanze bei Kälteeinwirkung erhöht sich innerhalb weniger Tage die Fluidität der pflanzlichen Zellmembranen. Nach Kälteexposition konnte dabei eine Veränderung der Lipid-Zusammensetzung sowie ein verstärktes Vorkommen von ungesättigten Fettsäuren in den Membranen nachgewiesen werden (Thomashow, 1999; Tasseva *et al.*, 2004). Ungesättigte Fettsäuren sind die Ausgangsverbindungen von OH-FS. An *A. thaliana* (angezogen bei 20°C, siehe II.4) sollte demzufolge untersucht werden, ob bereits eine kurzzeitige Kälteeinwirkung (4°C) für 2 h Stunden zu einer gesteigerten Synthese von OH-FS führt.

Hierzu sollten jeweils die freien, nicht veresterten OH-FS (im Folgenden: „freie“) und die Gesamtheit der freien und der in den pflanzlichen Membranen veresterten OH-FS (im Folgenden: „gesamte“) aus dem gleichen Pflanzenmaterial ermittelt werden. Durch Differenzbildung („gesamte“ abzüglich „freier“ OH-FS) wurde der Gehalt an veresterten OH-FS errechnet. Eine parallele Bestimmung der freien und veresterten OH-FS wurde mit dem Hintergrund durchgeführt, dass nicht-enzymatisch gebildete Oxylipine vermutlich in Membranen entstehen und über eine Lipase frei gesetzt werden, aber auch wieder in die Membranen zurück verestert werden können. Dagegen findet die enzymatische Peroxidierung durch LOX an freien Fettsäuren statt. Eine Aussage über die Orte innerhalb der Pflanzengewebe, in denen eine bevorzugte Oxylipin-Synthese statt findet, sollte somit gegeben werden. Wie bereits erwähnt, war durch die katalytische Hydrierung der Doppelbindungen der OH-FS zwar eine Unterscheidung der Regioisomere, bezogen auf die Position der internen Hydroxy-Gruppe, möglich, es konnte allerdings nicht auf die ungesättigte Fettsäure zurück geschlossen werden, aus der die jeweilige OH-FS *in planta* gebildet wurde. Es wurden die Konzentrationen von 12- und 16-OH-FS als Marker für die nicht-enzymatische Lipidperoxidation sowie von 9- und 13-OH-FS als Vertreter der auch enzymatisch gebildeten OH-FS untersucht.

In einem ersten Experiment wurden die Versuchspflanzen für 2 h bei 4°C (Lichtstärke:  $100 \mu\text{Es}^{-1}\text{m}^{-2}$ ) in einem Kühlraum gelagert und nach 15, 30, 60 und 120 min abgeerntet. Für die Untersuchung der freien OH-FS wurden 0,5 bis 1 g Pflanzenmaterial sowie 0,5  $\mu\text{g}$  15(S)-HETE eingesetzt, für die Untersuchung der gesamten OH-FS 0,2 bis 0,5 g Blattmaterial sowie 1  $\mu\text{g}$  interner Standard. Nach Extraktion des Pflanzenmaterials in Anlehnung an die Methode nach Blight und Dyer (1959) wurden die freien OH-FS mittels Festphasenextraktion gereinigt, wohingegen die gesamten OH-FS nach alkalischer Hydrolyse gewonnen und danach ebenfalls mittels Festphasenextraktion aufgereinigt wurden. Im Anschluss an die Derivatisierung wurden die OH-FS in 50 bis 500  $\mu\text{l}$  n-Hexan gelöst und davon 2  $\mu\text{l}$  mittels GC-MS (EI) analysiert (siehe III.4 und III.7.1). Die ermittelten Anstiege der OH-FS-Konzentrationen sind in der Abbildung IV.12 dargestellt.

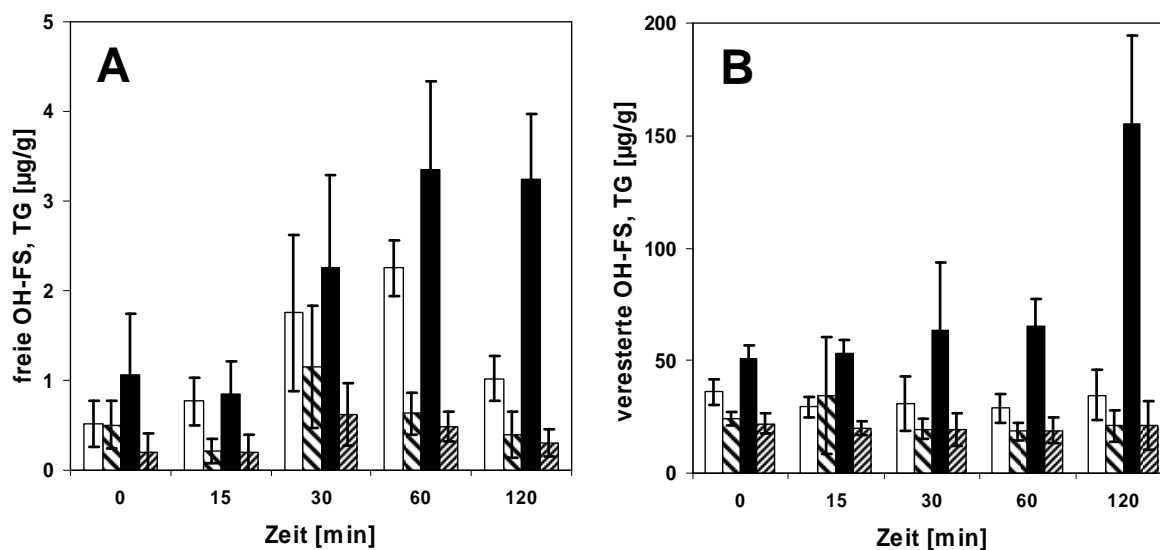


Abbildung IV.12: OH-FS-Bildung in *A. thaliana* während einer Inkubation bei 4°C, Berechnung auf das Trockengewicht (TG): (A) freie OH-FS, (B) veresterte OH-FS: 9-OH-FS (weiß), 12-OH-FS (grobe Schraffierung), 13-OH-FS (schwarz) und 16-OH-FS (feine Schraffierung).

Im Vergleich zu den basal in *A. thaliana* frei vorliegenden Gehalten an OH-FS konnten 10- bis 100-fach höhere Konzentrationen für die veresterten OH-FS nachgewiesen werden. Die basalen Konzentrationen an veresterten OH-FS wurden mit Literaturdaten verglichen, wobei sich sowohl die von Montillet *et al.* (2004) HPLC-chromatographisch durchgeführten Untersuchungen als auch die colorimetrische Quantifizierung der Gehalte an 9-, 12-, 13- und 16-OH-FS (20 bis 300 nmol/g FG) von Griffiths *et al.* (2000) in *A. thaliana* in einem ähnlichen Konzentrationsbereich befinden. Die Bestimmung der veresterten OH-FS machte deutlich, dass im Laufe eines zweistündigen Kältereizes ein etwa 3-facher Konzentrationsanstieg der vorwiegend enzymatisch gebildeten 13-OH-FS (basal: 50,6 µg/g TG, nach 2 h: 155,3 µg/g TG) erfolgte. Bei Betrachtung der frei vorliegenden OH-FS konnte über einen Zeitraum von 1 h eine stetige Zunahme der Konzentrationen von 9- und 13-OH-FS beobachtet werden (9-OH-FS: basal: 0,5 µg/g TG, nach 1 h: 2,3 µg/g TG und 13-OH-FS: basal: 1,1 µg/g TG, nach 1 h: 3,4 µg/g TG). Nach 2 h war, entgegen der noch gleich bleibend hohen 13-OH-FS-Konzentration, der Gehalt des 9-OH-FS-Regioisomers fast bis auf das Ausgangsniveau abgesunken. Für die nicht-enzymatisch gebildeten freien 12- und 16-OH-FS konnte nach 30 min jeweils ein schwaches Konzentrationsmaximum (12-OH-FS: 1,1 µg/g TG und 16-OH-FS: 0,6 µg/g TG) nachgewiesen werden, wohingegen der Gehalt der veresterten 12- und 16-OH-FS während der Untersuchung unverändert blieb.

Demnach ist bei einer Kälteexposition von *A. thaliana* bei 4°C vor allem ein Anstieg der enzymatisch gebildeten 13-OH-FS sowie, mit Blick auf die freien OH-FS, der auch enzymatisch gebildeten 9-OH-FS zu beobachten. Der Anstieg der 13-OH-FS wurde vermutlich durch eine verstärkte Aktivität durch 13-LOX bewirkt. 13-LOX oxidiert freie  $\alpha$ -Linolensäure und Linolsäure zu 13-Hydroperoxy-Fettsäuren, die anschließend zu 13-OH-FS reduziert werden und in die Membranen verestert werden. Einen Hinweis hierauf stellt der zeitlich verzögerte Konzentrationsanstieg der veresterten 13-OH-FS dar. Die veresterten 13-OH-FS haben dabei einen Anteil von etwa 98 % an den gesamten OH-FS. Im Weiteren wurde auf Kälte-Experimente verzichtet, da für die Betrachtung nicht-enzymatisch gebildeter Oxylipine nur sehr geringe transiente Anstiege über die basalen Konzentrationen hinaus gemessen wurden.

### 3. Entstehung von F<sub>1</sub>-Phytoprostanen nach Einfrieren/Auftauen von *A. thaliana*

Bei der später folgenden Untersuchung von Oxylipinen im Laufe einer Infektion von *A. thaliana* mit *Pst* (s. u.) kommt es zum Absterben von pflanzlichem Gewebe. Von Interesse für die folgenden Experimente war, über welchen Zeitraum die antioxidativ wirkenden Substanzen in abgetöteten *A. thaliana* eine Peroxidation von ungesättigten Fettsäuren und somit eine gesteigerte Bildung von Oxylipinen verzögern. Ziel des Versuches war es, eine autoxidative Oxylipin-Synthese in totem Gewebe in späteren Versuchen von einer durch die jeweiligen Stressbedingungen induzierten Bildung von Oxylipinen *in vivo* abgrenzen zu können. Für die Beurteilung einer nicht-enzymatisch ablaufenden Oxylipin-Bildung über freie Radikale eignen sich, neben nicht-enzymatisch gebildeten OH-FS-Regioisomeren, besonders F<sub>1</sub>-Phytoprostane (PPF<sub>1</sub>) als Marker. Sie stellen stabile Endprodukte der Peroxidation von  $\alpha$ -Linolensäure dar. Es sollte untersucht werden, ob und zu welchem Zeitpunkt PPF<sub>1</sub> auch in toten Pflanzenzellen akkumulieren.

Beim Einfrieren von pflanzlichem Blattmaterial und anschließendem langsamen Auftauen bilden sich sowohl im Protoplasma der Pflanzenzelle als auch in den Interzellularen Eiskristalle. Dabei werden Biomembranen geschädigt, so dass sie als selektive Barriere zwischen dem Inneren und dem Äußeren der Zellen nicht mehr fungieren können, das Protoplasma tritt aus der Zelle in die Interzellularräume und der Zell-Metabolismus kommt zum Erliegen. Eine autoxidative Oxylipin-Entstehung kann allerdings weiterhin erfolgen, da diese nur von einem Angebot an molekularem Sauerstoff, ungesättigten Fettsäuren, endogen in der Pflanze vorhandenen Hydroperoxiden als Reaktionsstarter und Metallionen als Katalysatoren abhängig ist. Ein verstärktes Angebot an Metallionen ist beispielsweise durch die Freisetzung aus geschädigten Enzymen denkbar. Die anschließende Freisetzung von oxidierten Fettsäuren und Phytoprostanen aus den Membranen durch eine putative Lipase findet nach Einfrieren/Auftauen möglicherweise nur eingeschränkt statt.

Für die Untersuchungen wurden die Pflanzen zur Abtötung in flüssigem Stickstoff eingefroren, anschließend für 2 h bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert und dann 96 h unter sterilen Bedingungen bei Raumtemperatur gelagert. Die Pflanzen waren nach 5 min bei Raumtemperatur aufgetaut, wobei die oberirdischen Blattorgane eine dunklere Farbe zeigten als unbehandelte Vergleichspflanzen und kaum Turgordruck besaßen. Dies wurde als klares Symptom für den Tod der Gewebe gewertet. Im Laufe der 96-stündigen Versuchsdauer dehydrierten die Blätter in zunehmendem Maße. Nach 0, 16, 40, 64 und 96 h wurden jeweils die Konzentrationen der freien sowie der gesamten  $\text{PPF}_1$  bestimmt und durch Differenzbildung die Gehalte an Membran-veresterten  $\text{PPF}_1$  errechnet. Für die Untersuchung der freien  $\text{PPF}_1$  wurden 0,5 bis 1 g Pflanzenmaterial sowie  $0,25\ \mu\text{g}$   $^{18}\text{O}_3$ - $\text{PPF}_1$ -Standard eingesetzt, für die Untersuchung der gesamten  $\text{PPF}_1$  wurden 0,5 g Pflanzenmaterial sowie  $0,5\ \mu\text{g}$  des internen Standards verwendet. Nach Extraktion des Blattmaterials wurden die freien  $\text{PPF}_1$  mittels Festphasenextraktion gereinigt, wohingegen die gesamten  $\text{PPF}_1$  nach alkalischer Hydrolyse gewonnen wurden und danach ebenfalls mittels Festphasenextraktion aufgereinigt wurden. Im Anschluss an die katalytische Hydrierung der Doppelbindungen, die Umsetzung der Carboxyl-Gruppe zum PFB-Ester und die Derivatisierung der Hydroxy-Gruppen zum Trimethylsilyläther wurden die  $\text{PPF}_1$  in 20 bis  $200\ \mu\text{l}$  n-Hexan gelöst und davon  $2\ \mu\text{l}$  mittels GC-MS (NICI) analysiert (für die Durchführung der Extraktion und der Derivatisierung siehe III.4 sowie III.7). Die Summen der Peak-Flächen der letzten beiden Peaks von  $\text{PPF}_1$  und  $^{18}\text{O}_3$ - $\text{PPF}_1$  wurden miteinander verglichen und aus ihnen die Konzentrationen an  $\text{PPF}_1$  berechnet. Die jeweils ersten beiden Peaks wurden aufgrund von störenden Matrix-Verbindungen aus *A. thaliana*, die ähnliche chromatographische Eigenschaften besitzen, nicht zur Quantifizierung verwendet.

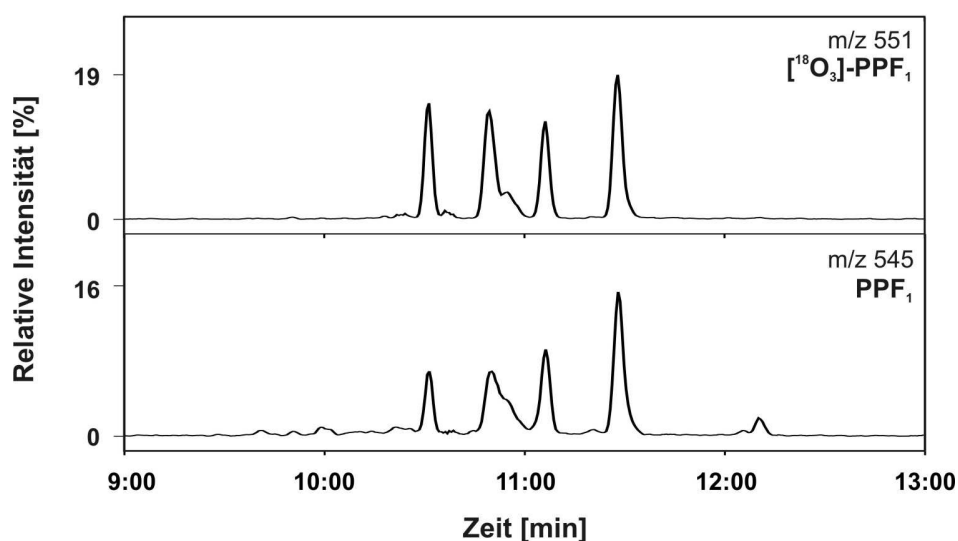


Abbildung IV.13: GC-MS-Chromatogramme (NICI) eines Pflanzenextraktes von *A. thaliana* nach katalytischer Hydrierung, als PFB-Ester und Trimethylsilyläther-Derivate. Die  $[\text{M-PFB}]^-$ -Ionen von  $\text{PPF}_1$  wurden bei  $m/z$  545 und von  $^{18}\text{O}_3$ - $\text{PPF}_1$  bei  $m/z$  551 detektiert.

In Abbildung IV.13 sind die Chromatogramme von endogenen PPF<sub>1</sub> aus einem Extrakt von *A. thaliana* bei  $m/z$  545 und von [<sup>18</sup>O<sub>3</sub>]-PPF<sub>1</sub>-Standard bei  $m/z$  551 dargestellt.

In der Abbildung IV.14 sind sowohl die Konzentrationsanstiege der freien als auch der veresterten PPF<sub>1</sub> während der Versuchsdauer von 96 h abgebildet. Wie der Abbildung zu entnehmen ist, stieg die Konzentration an freien PPF<sub>1</sub> von basal 0,038 µg/g TG in unbehandelten Pflanzen in einem fast linearen Verlauf auf 5,4 µg/g TG. Der Gehalt der Membran-veresterten PPF<sub>1</sub> stieg innerhalb der ersten 16 h um das 17-fache (basal: 0,38 µg/g TG, nach 16 h: 6,2 µg/g TG), blieb dann bis zum 60 h-Messwert konstant und erreichte weitere 30 h später ein Maximum mit 9,8 µg/g TG. Somit war eine stetige Zunahme der Konzentration von freien PPF<sub>1</sub> mit dem Beginn des Zelltods über den gesamten Zeitraum des Versuchs zu beobachten, während die Konzentration der veresterten PPF<sub>1</sub> bis zum 16 h-Wert anstieg und anschließend für 48 h konstant blieben. Antioxidativ wirksame Substanzen in der Pflanzenzelle verhindern demnach im abgetöteten Gewebe nicht die Zunahme veresteter PPF<sub>1</sub>. In dem Zeitraum von 16 bis 64 h nach dem Abtöten der Pflanzen bleibt die Konzentration an veresterten PPF<sub>1</sub> allerdings konstant. Die PPF<sub>1</sub>-Zunahme innerhalb der ersten 16 h könnte aufgrund einer schnellen Oxylipin-Bildung durch Autoxidation begründet werden, der ihre vergleichsweise langsame Reduktion durch Antioxidantien entgegen wirkt. Die stetige Zunahme der Konzentration an freien PPF<sub>1</sub> erfolgt möglicherweise über die kontinuierliche Freisetzung der Membran-veresterten PPF<sub>1</sub> durch eine Lipase.

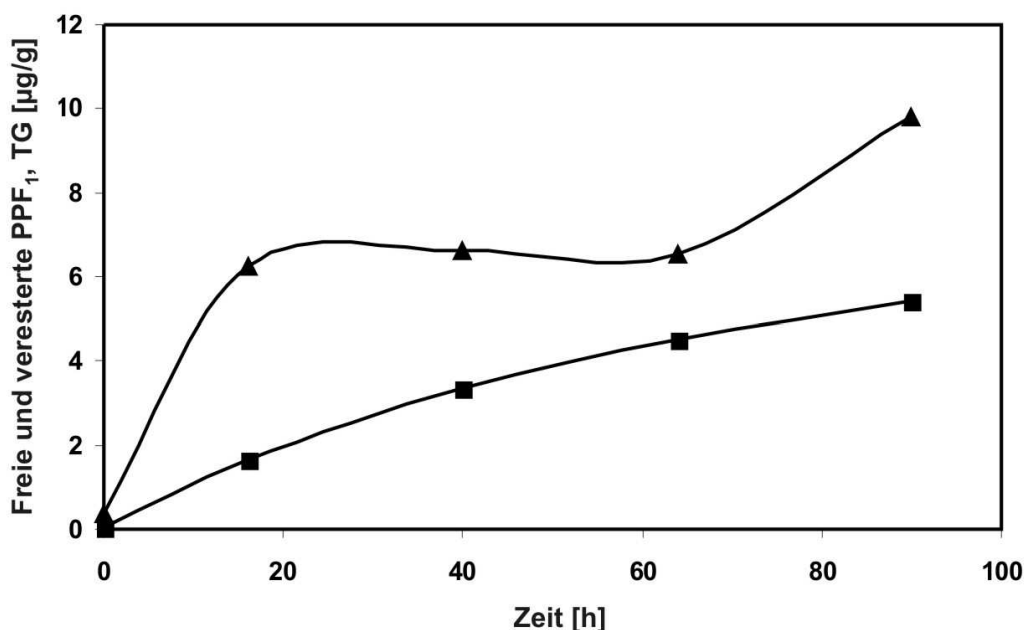


Abbildung IV.14: PPF<sub>1</sub>-Bildung in totem Gewebe von *A. thaliana* innerhalb von 96 h nach Einfrieren/Auftauen, freie PPF<sub>1</sub> (■), veresterte PPF<sub>1</sub> (▲).



In totem Gewebe kommt es somit innerhalb von 16 h zu einem erheblichen Anstieg von PPF<sub>1</sub>. Dies bedeutet, dass in nekrotischen Läsionen PPF<sub>1</sub> auch *post-mortem* stark ansteigen können.

#### 4. Vergleichende Untersuchung von Oxylipinen in *A. thaliana* in der kompatiblen und der inkompatiblen Interaktion nach Infektion mit *P. syringae*

Ziel des folgenden Versuchs war es, die Bildung von enzymatisch und nicht-enzymatisch gebildeten Oxylipinen in *A. thaliana* im Laufe einer Infektion mit *P. syringae* pv. *tomato* über einen Zeitraum von 60 h zu ermitteln. Hierbei wurde zum einen der auf *A. thaliana* virulente Stamm *Pst* DC3000 und zum anderen der avirulente Stamm *avrRPM1* benutzt. Es wurden Unterschiede in den zeitlichen Verläufen sowie in der Stärke der Oxylipin-Synthese zwischen den beiden Wirts-Pathogen-Interaktionen erwartet, da im Falle von *Pst avrRPM1* eine inkompatible und bei Anwendung des virulenten *Pst*-Stammes eine kompatible Interaktion untersucht wurde (siehe I.2).

Für beide Wirts-Pathogen-Interaktionen wurde der zeitliche Verlauf der Akkumulation des Signalstoffes JA, dessen biologisch aktiver Vorstufe 12-Oxo-Phytodiensäure (OPDA) sowie die Bildung von SA ermittelt. Neben diesen enzymatisch gebildeten Phytohormonen wurden sowohl die Gehalte an enzymatisch als auch an nicht-enzymatisch gebildeten C<sub>16</sub>- und C<sub>18</sub>-OH-FS sowie ausschließlich nicht-enzymatisch entstandener PPF<sub>1</sub> untersucht. Ein weiteres Ziel des Versuches war es, die Akkumulation von nicht-enzymatisch gebildeten Oxylipinen mit der Jasmonat- bzw. SA-gesteuerten Immunantwort in *A. thaliana* korrelieren zu können. Sowohl bei der Analyse von OH-FS als auch von PPF<sub>1</sub> wurden dazu jeweils die Konzentrationen an freien und gesamten Oxylipinen aus dem gleichen Pflanzenmaterial ermittelt. Durch Differenzbildung wurde wiederum der Gehalt an veresterten OH-FS und PPF<sub>1</sub> errechnet. Die parallele Bestimmung der freien und veresterten OH-FS erfolgte, wie bereits erwähnt, mit dem Hintergrund, dass nicht-enzymatisch gebildete Oxylipine in den Membranen gebildet werden und aus diesen frei gesetzt werden können, wohingegen die enzymatische Peroxidation mittels LOX an freien Fettsäuren stattfindet. Der Vergleich der ermittelten Kinetiken freier und veresteter OH-FS und PPF<sub>1</sub> sollte diese Hypothese gegebenenfalls stützen.

Experimentell wurde die Infiltration und Ernte der Pflanzen wie unter III.3 beschrieben durchgeführt. Für beide Interaktionstypen wurden Pflanzen untersucht, die 0, 1, 2, 5, 10, 24, 36, 48 und 60 h nach Inokulation geerntet wurden. Die Abbildung IV.15 zeigt das Ausmaß der Schädigungen der Blätter von *A. thaliana* nach Infiltration der Bakterien-Suspensionen.

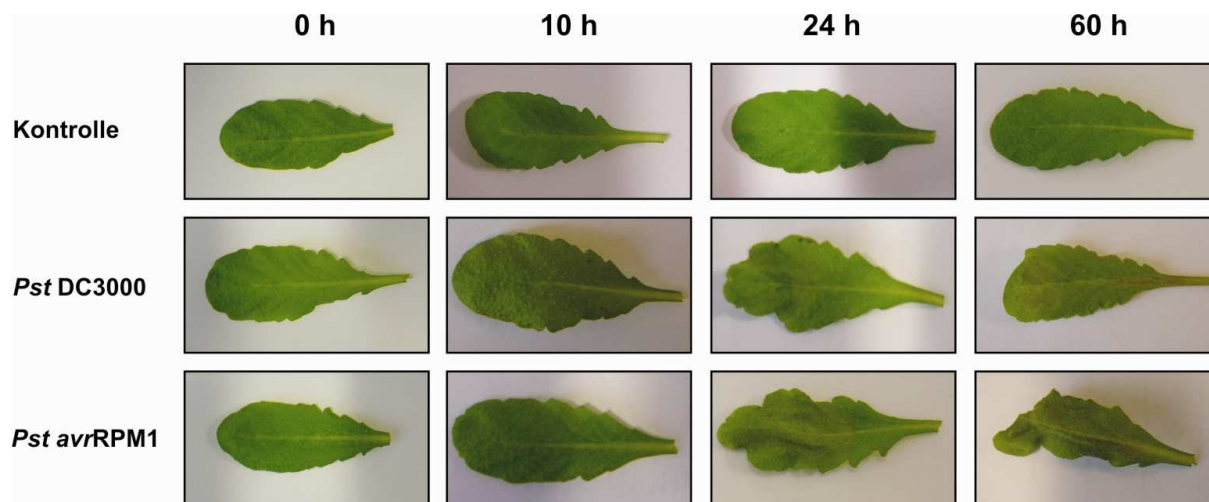


Abbildung IV.15: Blätter von *A. thaliana*: 0, 10, 24 und 60 h nach Infiltration mit 10 mM  $MgCl_2$ -Lösung (Kontrolle) sowie mit Suspensionen von *Pst DC3000* und *Pst DC3000avrRPM1* jeweils in Konzentrationen von  $10^8$  Kolonie-bildende Einheiten/ml.

Bei den mit dem virulenten *Pst*-Stamm behandelten Pflanzen konnte 10 h nach Infiltration erste Chlorosen rund um die Infiltrationsstelle beobachtet werden, welche sich mit zunehmender Dauer der Infektion ausbreiteten. Nach 24 h zeigten die Pflanzen Symptome einer Dehydratisierung. 60 h nach Infiltration waren großräumige chlorotische sowie nekrotische Flecken auf den gesamten Blättern zu erkennen, der Gesamtzustand der infizierten Pflanzen war gekennzeichnet durch Austrocknungssymptome. Im Falle der mit den avirulenten *Pst* infiltrierten Pflanzen, im Vergleich zur kompatiblen Interaktion, konnten 10 h nach Infiltration ebenfalls, jedoch stärkere Chlorosen rund um die Infiltrationsstellen beobachtet werden. Die Läsionen vergrößerten sich außerdem schneller als bei der kompatiblen Interaktion, so dass die infizierten Pflanzen bereits nach 24 h eine ausgeprägte Dehydratisierung sowie großräumige Nekrosen und Chlorosen an den infiltrierten Blättern aufwiesen. Diese Entwicklung setzte sich bis zum Ende des Experiments nach 60 h fort. Die gleichzeitig mit 10 mM  $MgCl_2$ -Lösung infiltrierten Kontrollpflanzen wiesen keinerlei Symptome auf.

#### 4.1 Analytik von Hydroxy-Fettsäuren in *A. thaliana*

Zur Bestimmung der freien OH-FS wurden 0,5 bis 1 g Pflanzenmaterial sowie 0,5  $\mu$ g 15(S)-HETE eingesetzt, wohingegen für die Untersuchung der gesamten OH-FS 0,2 bis 0,5 g Pflanzenmaterial sowie 1  $\mu$ g interner Standard verwendet wurden. Nach der Extraktion des Pflanzenmaterials wurden die freien OH-FS mittels Festphasenextraktion gereinigt. Die gesamten OH-FS wurden nach alkalischer Hydrolyse des Pflanzenextraktes erhalten und ebenso mittels Festphasenextraktion aufgereinigt. Im Anschluss wurden die OH-FS für die

Analytik mittels GC-MS (EI) derivatisiert und in 50 bis 500  $\mu\text{l}$  n-Hexan gelöst. 2  $\mu\text{l}$  der Lösung wurden in das GC-MS-System injiziert (siehe III.4 und III.7).

#### 4.2 Entstehung von freien und veresterten Hydroxy-Fettsäuren in der kompatiblen Interaktion

Wie der Abbildung IV.16 zu entnehmen ist, kam es 10 h nach Inokulation mit *Pst* DC3000 zu einem 1,7- bis 1,9-fachen Anstieg der Gehalte von freien 9-,12-,13- und 16-OH-FS. Während der folgenden vier Messzeitpunkte (24, 36, 48 und 60 h) stiegen die OH-FS-Konzentrationen kontinuierlich an, wobei nach 60 h Konzentrationsanstiege um das 7,4-fache für 13-OH-FS und um das 23-fache für 9-OH-FS im Vergleich zu den Kontrollpflanzen ermittelt wurden. Bezogen auf die absoluten Konzentrationen wurden mehr OH-FS-Isomere gebildet, die als Marker der enzymatischen Lipidperoxidation gelten (9-HOTE: 1,1  $\mu\text{g/g}$  TG basal, 33,1  $\mu\text{g/g}$  TG nach 60 h; 13-HOTE: 1,7  $\mu\text{g/g}$  TG basal, 20,9  $\mu\text{g/g}$  TG nach 60 h) als von denjenigen, die über einen nicht-enzymatischen Weg gebildet werden (12-HOTE: 0,9  $\mu\text{g/g}$  TG basal, 7,2  $\mu\text{g/g}$  TG nach 60 h; 16-HOTE: 0,5  $\mu\text{g/g}$  TG basal, 8,8  $\mu\text{g/g}$  TG nach 60 h).

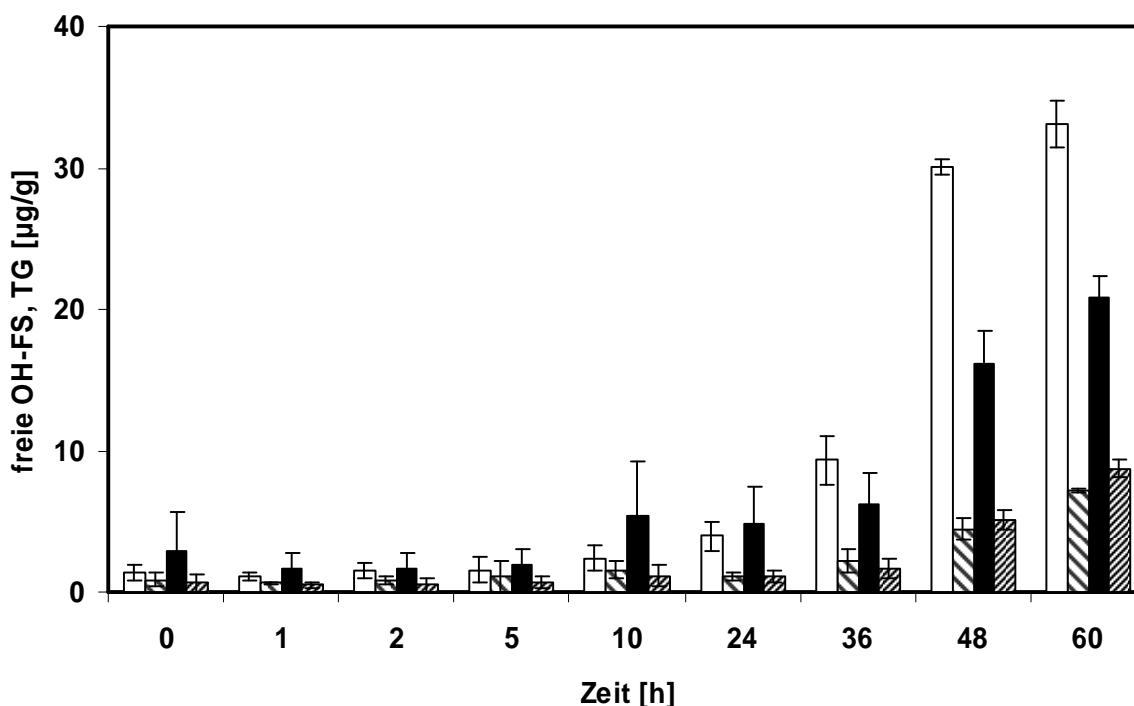


Abbildung IV.16: Bildung freier OH-FS in *A. thaliana* in der kompatiblen Interaktion mit *Pst* DC3000, 9-OH-FS (weiß), 12-OH-FS (grobe Schraffierung), 13-OH-FS (schwarz) und 16-OH-FS (feine Schraffierung).

Die Untersuchung der Membran-veresterten OH-FS nach Infiltration von *A. thaliana* mit virulenten *Pst* DC3000 ergab, analog der Betrachtung der freien OH-FS, monophasische kontinuierliche Anstiege für die vier untersuchten OH-FS-Isomere, unabhängig von ihrem Bildungsweg (siehe Abbildung IV.17). Die absoluten Konzentrationen der enzymatisch gebildeten OH-FS waren, sowohl basal als auch bezüglich der 60 h nach Infektion ermittelten Werte, etwa 3-fach höher als die der nicht-enzymatisch gebildeten OH-FS (9-OH-FS: 110,7  $\mu\text{g/g}$  TG basal, 169,7  $\mu\text{g/g}$  TG nach 60 h; 12-OH-FS: 75,6  $\mu\text{g/g}$  TG basal, 75,7  $\mu\text{g/g}$  TG nach 60 h; 13-OH-FS: 221,0  $\mu\text{g/g}$  TG basal, 360,1  $\mu\text{g/g}$  TG nach 60 h; 16-OH-FS: 68,2  $\mu\text{g/g}$  TG basal, 105,0  $\mu\text{g/g}$  TG nach 60 h). Es war ein starker Konzentrationsanstieg an freien OH-FS im Vergleich zu den schwachen Anstiegen der veresterten OH-FS zu beobachten. Nach ihrer Entstehung in den Membranen werden OH-FS möglicherweise über Lipasen freigesetzt. Da in *A. thaliana* basal 10-fach weniger OH-FS frei vorliegen als in den Membranen verestert sind, machte sich die Freisetzung von OH-FS aus den Membranen durch einen starken Konzentrationsanstieg der freien OH-FS bemerkbar.

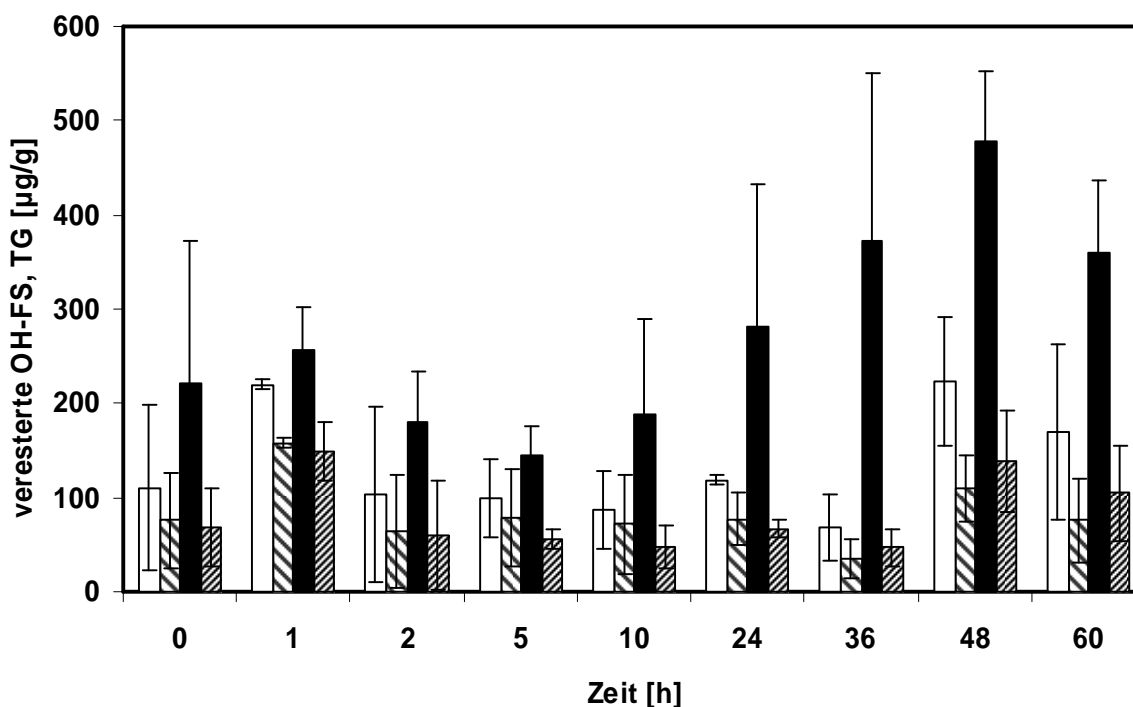


Abbildung IV.17: Bildung von veresterten OH-FS in *A. thaliana* in der kompatiblen Interaktion mit *Pst* DC3000, 9 OH-FS (weiß), 12-OH-FS (grobe Schraffierung), 13-OH-FS (schwarz) und 16-OH-FS (feine Schraffierung).

### 4.3 Entstehung von freien und veresterten Hydroxy-Fettsäuren in der inkompatiblen Interaktion

Bei der inkompatiblen Interaktion nach Infektion mit *Pst avrRPM1* kam es zu einer parallelen Akkumulation der vier untersuchten OH-FS-Isomere, die biphasisch mit zwei Konzentrationsmaxima verlief (siehe Abbildung IV.18). Ab dem 2 h-Messwert erreichten sowohl die freien 9- und 13-OH-FS als auch 12- und 16-OH-FS nach 10 h ein erstes Konzentrationsmaximum, gefolgt von einem zweiten Maximum nach 48 h. Bei Vergleich der basalen Konzentrationen (9-OH-FS: 1,5 µg/g TG, 12-OH-FS: 1,0 µg/g TG, 13-OH-FS: 3,7 µg/g TG, 16-OH-FS: 0,8 µg/g TG) mit den OH-FS-Konzentrationen des ersten Maximums (9-OH-FS: 17,1 µg/g TG, 12-OH-FS: 6,5 µg/g TG, 13-OH-FS: 20,2 µg/g TG, 16-OH-FS: 5,6 µg/g TG) konnten Konzentrationsanstiege um das 5- bis 10-fache und nach 48 h um das 5- bis 14-fache ermittelt werden (9-OH-FS: 22,9 µg/g TG, 12-OH-FS: 7,1 µg/g TG, 13-OH-FS: 16,1 µg/g TG, 16-OH-FS: 6,8 µg/g TG).

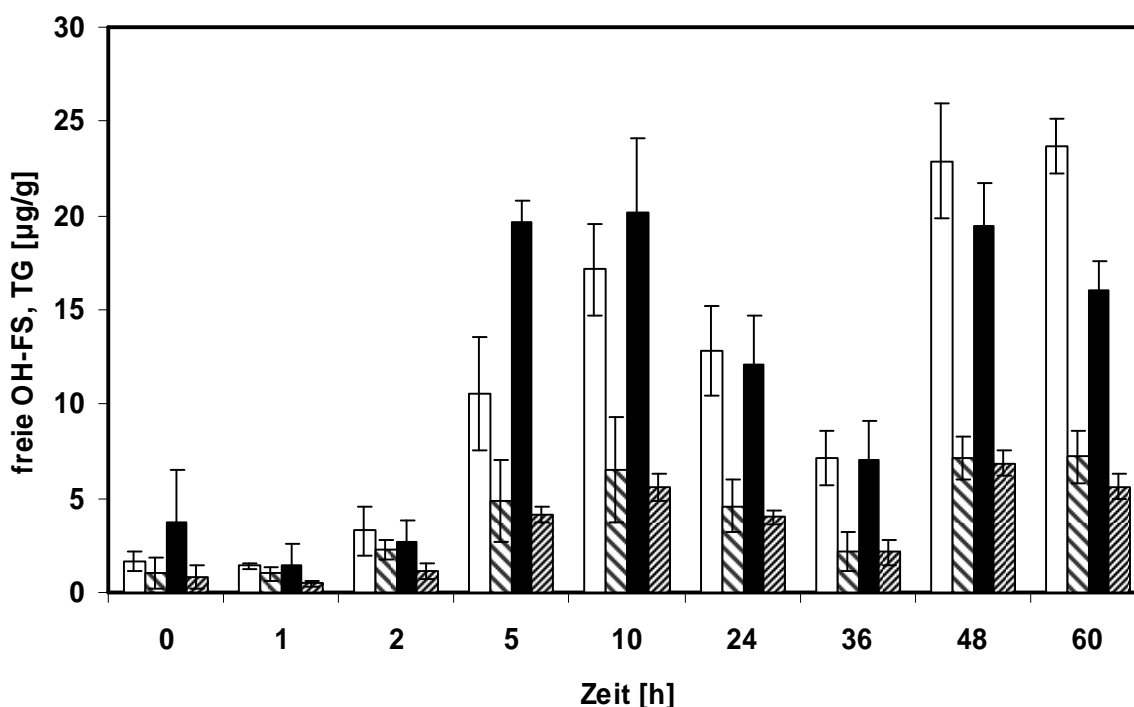


Abbildung IV.18: Bildung von freien OH-FS in *A. thaliana* in der inkompatiblen Interaktion mit *Pst avrRPM1*, 9-OH-FS (weiß), 12-OH-FS (grobe Schraffierung), 13-OH-FS (schwarz) und 16 OH-FS (feine Schraffierung).

Wie bei der kompatiblen Interaktion zu beobachten, waren die Anstiege der Membranveresterten OH-FS bezogen auf ihren zeitlichen Verlauf (siehe Abbildung IV.19) auch hier mit denen der freien OH-FS zu vergleichen. Bereits nach 5 h war ein erstes Konzentrations-

maximum erreicht, was somit früher erfolgte als bei der Bestimmung der freien OH-FS (10 h). Nach einem Abfall der Konzentration bis hin zum 36 h-Messwert wurde eine weitere Konzentrationszunahme aller vier OH-FS-Isomere bis zum 60 h-Wert festgestellt. Für beide Maxima wurde eine 4- bis 8-fache Konzentrationszunahme der OH-FS-Isomere ermittelt, wobei insbesondere eine starke Akkumulation des 13-OH-FS-Regioisomers auffällt (7,6-fache Konzentration im Vergleich zum Basalwert).

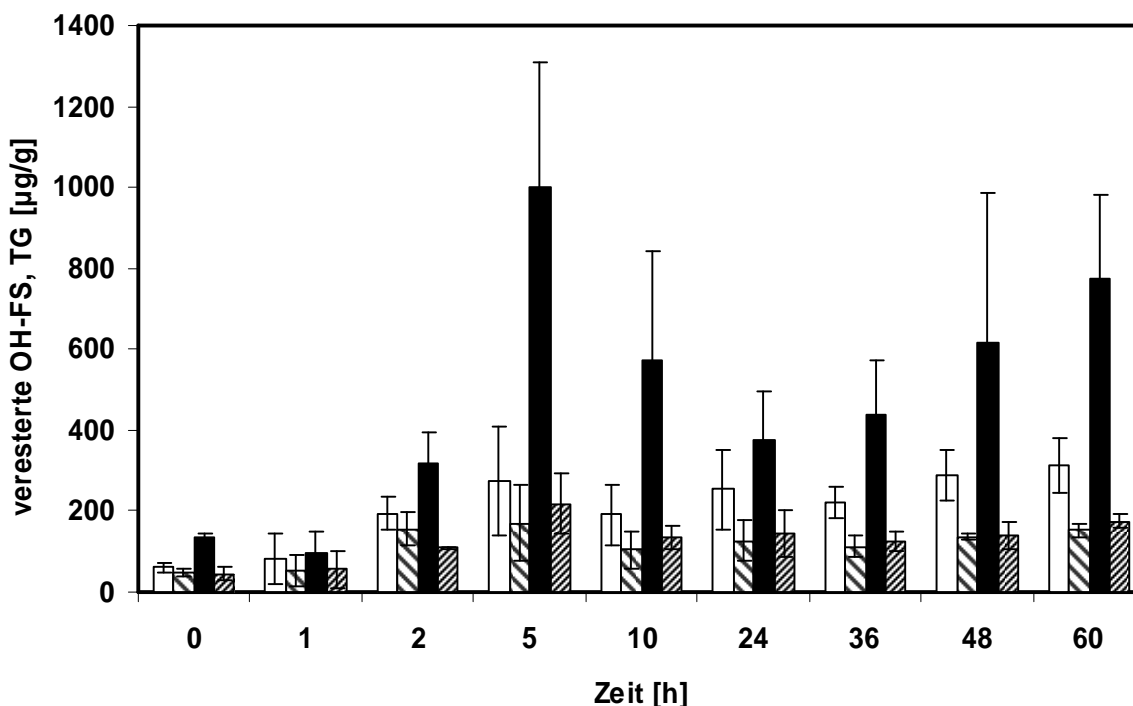


Abbildung IV.19: Bildung von veresterten OH-FS in *A. thaliana* in der inkompatiblen Interaktion mit *Pst avrRPM1*, 9-OH-FS (weiß), 12-OH-FS (grobe Schraffierung), 13-OH-FS (schwarz) und 16-OH-FS (feine Schraffierung).

Somit wurden monophasische Konzentrationsanstiege der OH-FS-Isomere in der kompatiblen Interaktion und biphasische Kinetiken in der inkompatiblen Interaktion ermittelt. Der Verlauf der Akkumulation der vier OH-FS-Isomere war hierbei in beiden Interaktionen parallel und deutet somit auf eine gleichzeitige Synthese der OH-FS über die unterschiedlichen Bildungswege hin. Veresterte 13-OH-FS wurde in beiden Interaktionen am stärksten gebildet, was auf eine verstärkte Aktivität der 13-LOX während der Pathogen-Interaktion zurückgeführt werden kann. Mit Blick auf die freien OH-FS konnte ebenfalls in beiden Interaktionen eine noch verstärkte 9-OH-FS-Synthese, im Vergleich zur Bildung von 13-OH-FS, nachgewiesen werden. Eine quantitative Aussage über den enzymatisch gebildeten Anteil von 9- und 13-OH-FS konnte an dieser Stelle allerdings nicht gegeben werden, da hierfür die Auftrennung in (*R/S*)-Stereoisomere notwendig gewesen wäre. Der

Anteil von nicht-enzymatisch entstandenen 9- und 13-HOTE-Isomeren in *A. thaliana* nach ROS-vermittelter Peroxidation von  $\alpha$ -Linolensäure wird in einer Arbeit von Montillet *et al.* (2004) mit 19 % für 9-HOTE und 32 % für 13-HOTE angegeben (siehe Tabelle V.1).

#### 4.4 Entstehung von C<sub>16</sub>-Hydroxy-Fettsäuren in der kompatiblen und der inkompatiblen Interaktion

Neben den ungesättigten C<sub>18</sub>-Mono-OH-FS werden in *A. thaliana* auch die C<sub>16</sub>-Mono-OH-FS aus (*cis, cis, cis*)- $\Delta$ 7-, $\Delta$ 10-, $\Delta$ 13-Hexadecatriensäure (16:3), aus (*cis, cis*)- $\Delta$ 7-, $\Delta$ 10-Hexadecaensäure (16:2) und aus Palmitoleinsäure ((*cis*)- $\Delta$ 7-Hexadecaensäure, 16:1) gebildet. Die 10-Hydroxy-Fettsäure (10-OH-FS) und 14-OH-FS werden auf nicht-enzymatischem Weg gebildet, wohingegen 7-OH-FS und 11-OH-FS sowohl nicht-enzymatisch als auch mittels LOX entstehen können. C<sub>16</sub>-Hydroxy-Fettsäuren sind von Interesse, da sie hauptsächlich in Chloroplasten vorkommen und somit ein Maß für die OH-FS-Entstehung in den Chloroplasten, im Vergleich zu anderen Zellbestandteilen, darstellen. Für die Untersuchungen der Gehalte an C<sub>16</sub>-OH-FS wurde das unter IV.4.1 - IV.4.7 verwendete Pflanzenmaterial eingesetzt. Wie bei der Bestimmung der freien und veresterten C<sub>18</sub>-OH-FS wurden zwischen 0,2 und 1 g Pflanzenmaterial sowie 0,5  $\mu$ g bzw. 1  $\mu$ g 15(S)-HETE als interner Standard eingesetzt. Die Extraktion des Pflanzenmaterials, die Aufreinigung mittels Festphasenextraktion, die alkalische Hydrolyse bei der Bestimmung der veresterten C<sub>16</sub>-OH-FS sowie die Derivatisierung für die GC-MS-Analytik erfolgten in gleicher Weise wie bei der Bestimmung von C<sub>18</sub>-OH-FS. Anschließend wurden die Proben in 50 bis 100  $\mu$ l n-Hexan gelöst und 2  $\mu$ l der Lösungen in das GC-MS-System (EI-Modus) injiziert. Es wurden wie bei den C<sub>18</sub>-OH-FS sämtliche Regioisomere nach Hydrierung der Doppelbindungen ungeachtet ihrer Ausgangsverbindungen gemeinsam als 7-OH-FS, 10-OH-FS, 11-OH-FS oder 14-OH-FS erfasst und mit 15(S)-HETE als internen Standard quantifiziert.

In den Abbildungen IV.20 und IV.21 sind die im Laufe des Experiments ermittelten Konzentrationsanstiege der Membran-veresterten OH-FS in der kompatiblen sowie der inkompatiblen Interaktion dargestellt. In beiden Interaktionstypen waren keine signifikanten Anstiege der Konzentrationen an 7-,10- und 14-OH-FS zu verzeichnen. Der Gehalt an 11-OH-FS stieg in der kompatiblen Interaktion innerhalb von 24 h von 6,4  $\mu$ g/g TG kontinuierlich auf 12,4  $\mu$ g/g TG und fiel nach 36 h (12,1  $\mu$ g/g TG) auf 4,3  $\mu$ g/g TG nach 48 h ab. Der Konzentrationsverlauf der inkompatiblen Interaktion wies bereits nach 5 h ein Maximum der 11-OH-FS Konzentration auf (25,1  $\mu$ g/g TG). Nach 24 h fiel der 11-OH-FS-Gehalt wieder auf den Basalwert ab, um nach 60 h ein weiteres Maximum mit fast 20  $\mu$ g/g TG zu erreichen.

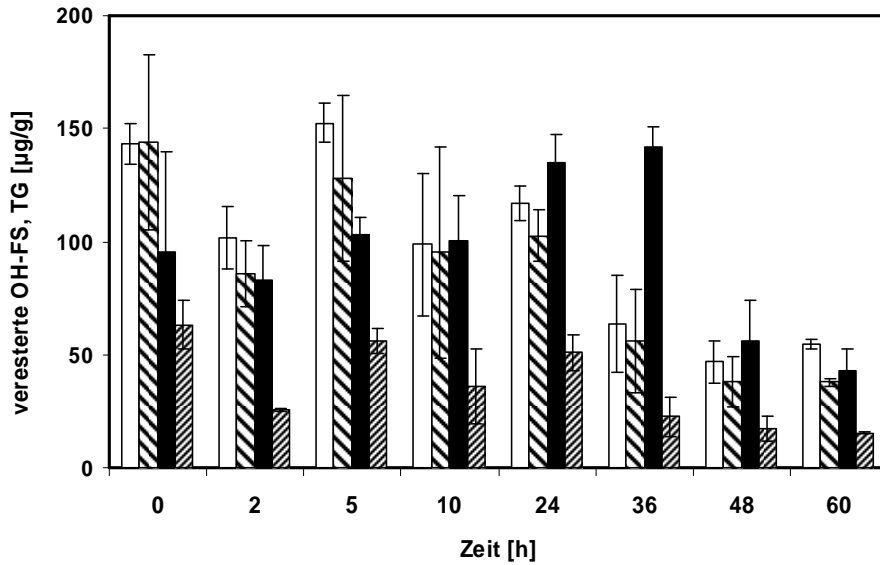


Abbildung IV.20: Bildung von veresterten  $C_{16}$ -OH-FS in *A. thaliana* in der kompatiblen Interaktion mit *Pst* DC3000, 7-OH-FS (weiß), 10-OH-FS (grobe Schraffierung), 11-OH-FS (schwarz) und 14-OH-FS (feine Schraffierung).

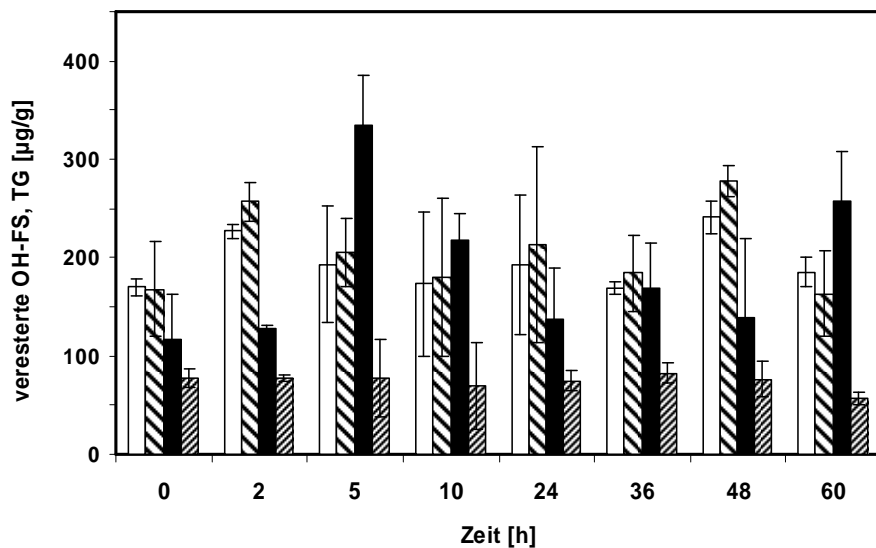


Abbildung IV.21: Bildung von veresterten  $C_{16}$ -OH-FS in *A. thaliana* in der inkompatiblen Interaktion mit *Pst* avrRPM1, 7-OH-FS (weiß), 10-OH-FS (grobe Schraffierung), 11-OH-FS (schwarz) und 14-OH-FS (feine Schraffierung).

In der Abbildung IV.22 sind die Konzentrationsanstiege der freien OH-FS in der kompatiblen Interaktion dargestellt. Die freien OH-FS erreichten, beginnend mit den basalen Konzentrationen von 7-OH-FS: 0,16  $\mu\text{g/g}$  TG, 10-OH-FS: 0,17  $\mu\text{g/g}$  TG, 11-OH-FS: 0,14  $\mu\text{g/g}$  TG, 14-OH-FS: 0,04  $\mu\text{g/g}$  TG nach 48 h einen maximalen Wert (7-OH-FS: 0,52  $\mu\text{g/g}$  TG, 10-OH-FS: 0,29  $\mu\text{g/g}$  TG, 11-OH-FS: 0,28  $\mu\text{g/g}$  TG, 14-OH-FS: 0,12  $\mu\text{g/g}$  TG). In der inkompatiblen Interaktion wurde 10 h nach Infiltration der Pflanzen ein erstes Konzentrationsmaximum aller vier OH-FS-Regioisomeren nachgewiesen (siehe Abbildung



IV.23). Die OH-FS-Konzentrationen nahmen anschließend bis zum 48 h-Wert stetig ab und erreichten nach 60 h einen zweiten maximalen Wert. Mit Blick auf die auch enzymatisch entstehenden freien OH-FS findet in beiden Interaktionen eine verstärkte Bildung von 7-OH-FS gegenüber 11-OH-FS statt.

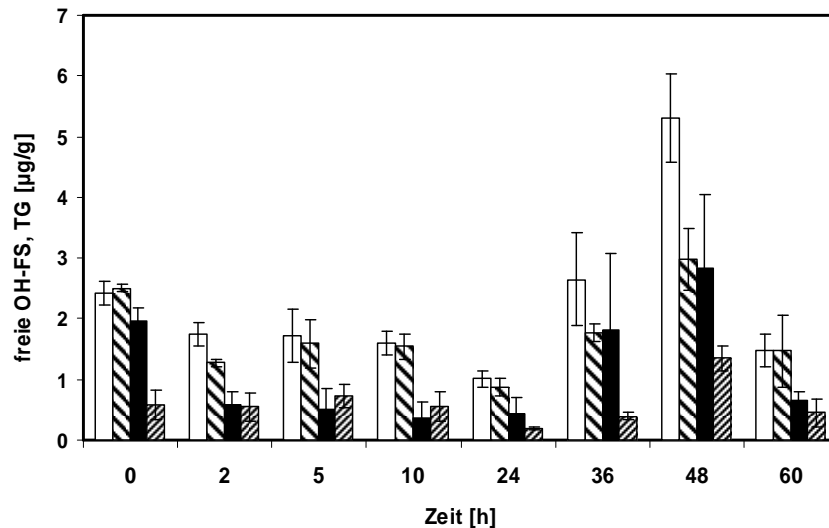


Abbildung IV.22: Bildung von freien  $C_{16}$ -OH-FS in *A. thaliana* in der kompatiblen Interaktion mit *Pst* DC3000 7-OH-FS (weiß), 10-OH-FS (grobe Schraffierung), 11-OH-FS (schwarz) und 14-OH-FS (feine Schraffierung).

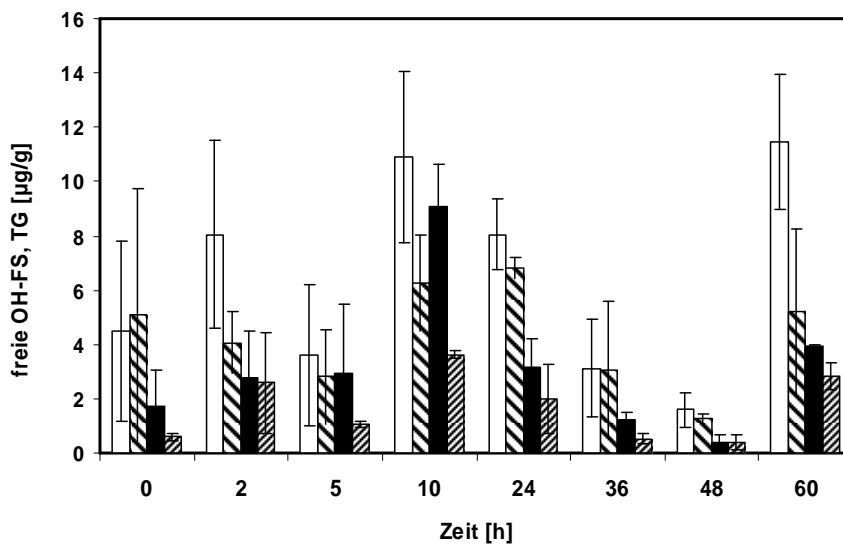


Abbildung IV.23: Bildung von freien  $C_{16}$ -OH-FS in *A. thaliana* in der inkompatiblen Interaktion mit *Pst* avrRPM1, 7-OH-FS (weiß), 10-OH-FS (grobe Schraffierung), 11-OH-FS (schwarz) und 14-OH-FS (feine Schraffierung).

In der kompatiblen Interaktion ähnelte die Kinetik der freien  $C_{16}$ -OH-FS dem Verlauf der  $C_{18}$ -OH-FS, sowohl was den monophasischen Konzentrationsanstieg betrifft, als auch was die Lage der Maxima nach 48 h angeht. Auch bei der inkompatiblen Interaktion konnte ein den

C<sub>18</sub>-OH-FS ähnelnder biphasischer Verlauf mit einem Maximum nach 10 h nachgewiesen werden. Das zweite Maximum nach 60 h wurde in der inkompatiblen Interaktion allerdings später als bei der Untersuchung von C<sub>18</sub>-OH-FS (48 h) erreicht. In beiden Interaktionen entstanden, bei Vergleich der Konzentrationen der C<sub>16</sub>-OH-FS und der C<sub>18</sub>-OH-FS, um den Faktor 3 niedrigere Mengen an C<sub>16</sub>-OH-FS, sowohl bezogen auf die freien als auch auf die veresterten OH-FS. Die enzymatisch gebildeten 7- und 11-Regioisomere werden bevorzugt gegenüber den nicht-enzymatisch entstehenden 10- und 14-Regioisomeren gebildet. Die durchgeführten Untersuchungen deuten allerdings auf keine frühere oder spätere Induktion der OH-FS-Biosynthese in den Chloroplasten hin.

#### 4.5 Entstehung von F<sub>1</sub>-Phytosteranen in der kompatiblen und der inkompatiblen Interaktion

PPF<sub>1</sub> sind stabile Endprodukte der Lipidperoxidation und eignen sich als sensitive Marker für eine nicht-enzymatisch ablaufende Oxylipin-Bildung über freie Radikale. PPF<sub>1</sub> sollten zusätzlich zu den nicht-enzymatisch gebildeten OH-FS untersucht werden, um mögliche Unterschiede ihrer Akkumulation während der kompatiblen und der inkompatiblen Interaktion zwischen *Pst* und *A. thaliana* zu ermitteln. Zur Untersuchung wurde das unter IV.4.1 - IV.4.7 verwendete Pflanzenmaterial eingesetzt. Nach 0, 0,5, 1, 2, 5, 10, 24, 36, 48 und 60 h wurden jeweils die Konzentrationen der freien sowie der gesamten PPF<sub>1</sub> bestimmt und durch Differenzbildung die Gehalte an Membran-veresterten PPF<sub>1</sub> errechnet. Für die Untersuchung der freien PPF<sub>1</sub> wurden 0,5 bis 1 g Pflanzenmaterial sowie 0,25 µg [<sup>18</sup>O<sub>3</sub>]-PPF<sub>1</sub>-Standard verwendet, für die Bestimmung der gesamten PPF<sub>1</sub> wurden 0,5 g Blattmaterial sowie 0,5 µg des internen Standards eingesetzt. Nach Extraktion des Pflanzenmaterials wurden die freien PPF<sub>1</sub> mittels Festphasenextraktion gereinigt. Die gesamten PPF<sub>1</sub> wurden nach alkalischer Hydrolyse ebenfalls mittels Festphasenextraktion aufgereinigt. Im Anschluss an die Derivatisierung wurden die PPF<sub>1</sub> in 20 bis 200 µl n-Hexan gelöst und davon 2 µl mittels GC-MS (NICI) analysiert.

In der Abbildung IV.24 ist die Konzentrationszunahme an freien und veresterten PPF<sub>1</sub> während der kompatiblen Interaktion dargestellt. Es wurden basal 0,03 µg/g TG an freien PPF<sub>1</sub> gefunden. Bereits 24 h nach Infektion mit virulenten *Pst* DC3000 stieg diese Konzentration auf das 9-fache an und erreichte, kontinuierlich steigend, nach 48 h einen maximalen Wert von 2,3 µg/g TG, was einem 73-fachen monophasischen PPF<sub>1</sub>-Anstieg, bezogen auf den basalen Gehalt, entspricht. Die Berechnung der Membran-veresterten PPF<sub>1</sub> ergab einen im Vergleich zu den freien PPF<sub>1</sub> früher ansteigenden Verlauf der Kinetik, in einem um eine Größenordnung höheren Konzentrationsbereich. Bereits nach 24 h war ein 10-facher Konzentrationsanstieg der veresterten PPF<sub>1</sub> erreicht, der sich bis zum Messwert nach 36 h schwach und ab 48 h (30-facher Anstieg) stark erhöhte. Hierbei wurden

ausgehend von einem basalen Gehalt von 0,4 µg/g TG nach 60 h eine PPF<sub>1</sub>-Konzentration von 13,6 µg/g TG ermittelt.

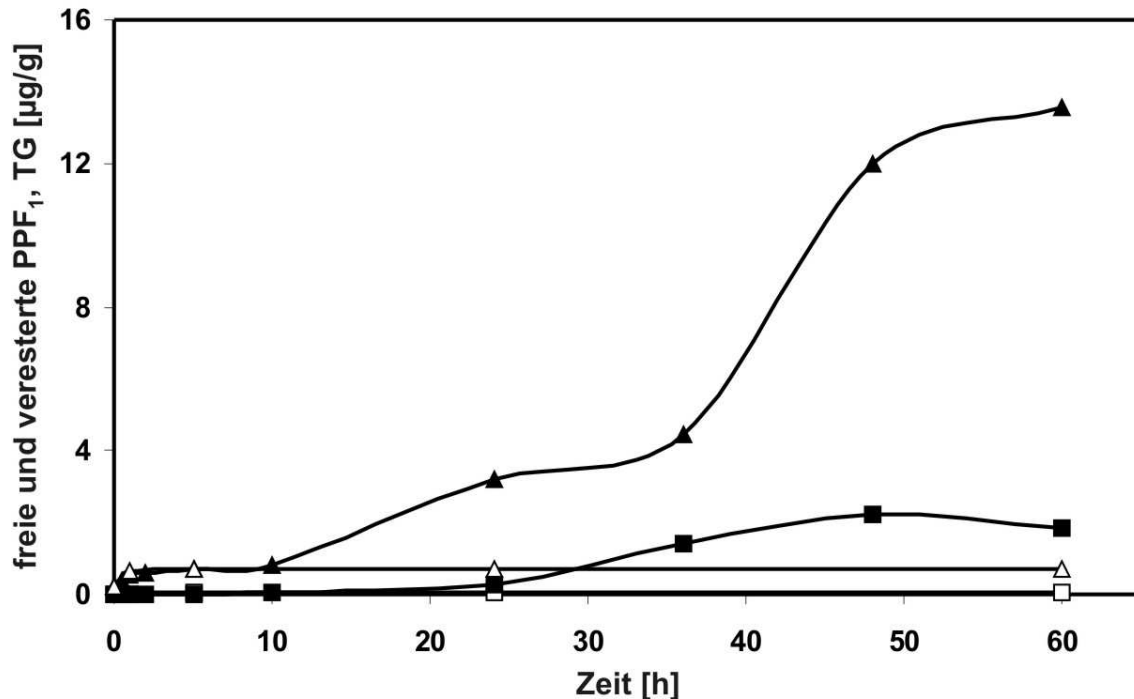


Abbildung IV.24: Bildung von freien und veresterten PPF<sub>1</sub> in *A. thaliana* in der kompatiblen Interaktion mit *Pst avrRPM1*, freie PPF<sub>1</sub> (■), veresterte PPF<sub>1</sub> (▲) und in mit 10 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung infiltrierten Kontrollpflanzen, freie PPF<sub>1</sub> (□), veresterte PPF<sub>1</sub> (△).

Im Vergleich dazu führte eine Inokulation von *Pst avrRPM1* in *A. thaliana* zu einer biphasischen Akkumulation von freien PPF<sub>1</sub> (siehe Abbildung IV.25), wie sie auch bei der Untersuchung der OH-FS-Kinetiken während der inkompatiblen Interaktion beobachtet werden konnte. Ausgehend von einer Konzentration von 0,03 µg/g TG an PPF<sub>1</sub> in mit MgCl<sub>2</sub>-Lösung infiltrierten Kontrollpflanzen (Messwert nach 24 h) wurde ein erstes Konzentrationsmaximum mit 1,1 µg/g TG 24 h nach der *Pst*-Behandlung erreicht. Dies entsprach einem 37-fachen Anstieg der PPF<sub>1</sub>-Konzentration. Ein zweites Maximum wurde nach 48 h erreicht (2,9 µg/g TG), entsprechend einem 97-fachen Anstieg, bezogen auf die PPF<sub>1</sub>-Konzentration in den Kontrollpflanzen. In den Kontrollpflanzen wurden 0,3 µg/g TG an veresterten PPF<sub>1</sub> nachgewiesen. Ausgehend von dieser Konzentration wurde nach 10 h eine Konzentration von 4,1 µg/g TG und beim Erreichen des zweiten Maximums nach 48 h von 5,7 µg/g TG ermittelt. Dies entsprach einem 14-fachen und einem 20-fachen PPF<sub>1</sub>-Anstieg in den Maxima der Kinetik. Auffällig ist der zeitlich stark verzögerte erste maximale Wert der freien PPF<sub>1</sub> nach 24 h, verglichen mit dem ersten Maximum der veresterten PPF<sub>1</sub> nach bereits 10 h.

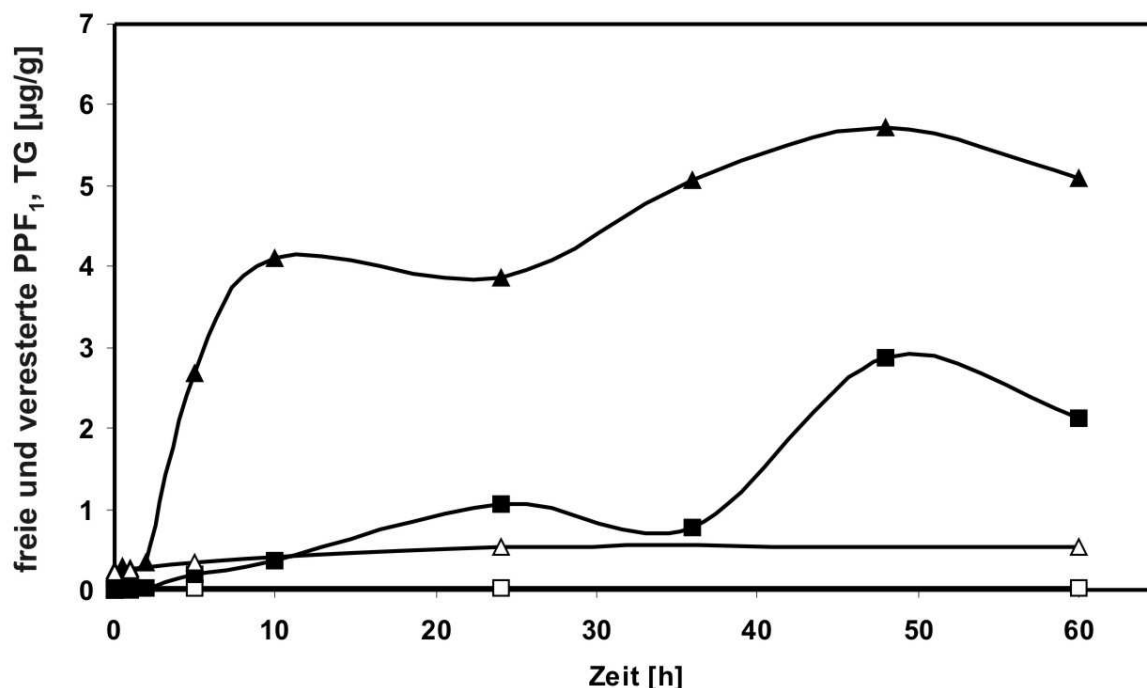


Abbildung IV.25: Bildung von freien und veresterten PPF<sub>1</sub> in *A. thaliana* in der inkompatiblen Interaktion mit *Pst avrRPM1*, freie PPF<sub>1</sub> (■), veresterte PPF<sub>1</sub> (▲) und in mit 10 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung infiltrierten Kontrollpflanzen, freie PPF<sub>1</sub> (□), veresterte PPF<sub>1</sub> (△).

In beiden Interaktionen wurden die maximalen Konzentrationen an freien PPF<sub>1</sub> später als diejenigen der veresterten PPF<sub>1</sub> nachgewiesen. Dies könnte durch die Hypothese erklärt werden, dass die nicht-enzymatische Oxylin-Bildung in den Membranen abläuft und die entstandenen Oxyline anschließend mittels Lipasen freigesetzt werden. Auf die Existenz von derartigen Lipasen in *A. thaliana* deutet eine Untersuchung von Imbusch und Mueller (2000b) hin, in der die Akkumulation von Membran-veresterten Phytoprostanen und deren nahezu simultane Freisetzung nach Verwundung nachgewiesen wurde. Desweiteren war eine frühe Akkumulation von PPF<sub>1</sub> nach 5 bis 10 h auf die inkompatible Interaktion beschränkt. Es konnte für beide Interaktionen eine zeitgleiche Konzentrationszunahme von OH-FS sowie PPF<sub>1</sub> festgestellt werden.

#### 4.6 Entstehung von 12-Oxo-Phytodiensäure und Jasmonsäure in der kompatiblen und der inkompatiblen Interaktion

Beide Interaktionen sollten, neben ihrer Charakterisierung durch die Akkumulation von enzymatisch und nicht-enzymatisch gebildeten OH-FS sowie PPF<sub>1</sub>, auch auf die enzymatisch gebildeten Jasmonate hin untersucht werden. Zur Analyse von JA sowie OPDA wurden 0,2 g Pflanzenmaterial eingesetzt und mit 50 ng 9,10-Dihydro-JA sowie 100 ng [<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]-OPDA als interne Standards versetzt, extrahiert und über Festphasenextraktion

aufgereinigt (siehe III.4.1). Die Proben wurden anschließend für die GC-MS-Analytik zu PFB-Estern umgesetzt (siehe III.7.5), in 20 bis 100 µl n-Hexan gelöst und 2 µl mittels GC-MS untersucht. Es wurden die  $[M-PFB]^-$ -Anionen von JA bei  $m/z$  209, Dihydro-JA bei  $m/z$  211, OPDA bei  $m/z$  291 und  $[^{18}O_2]$ -OPDA bei  $m/z$  295 im NICI-Modus des GC-MS vermessen (siehe Abbildung IV.26).

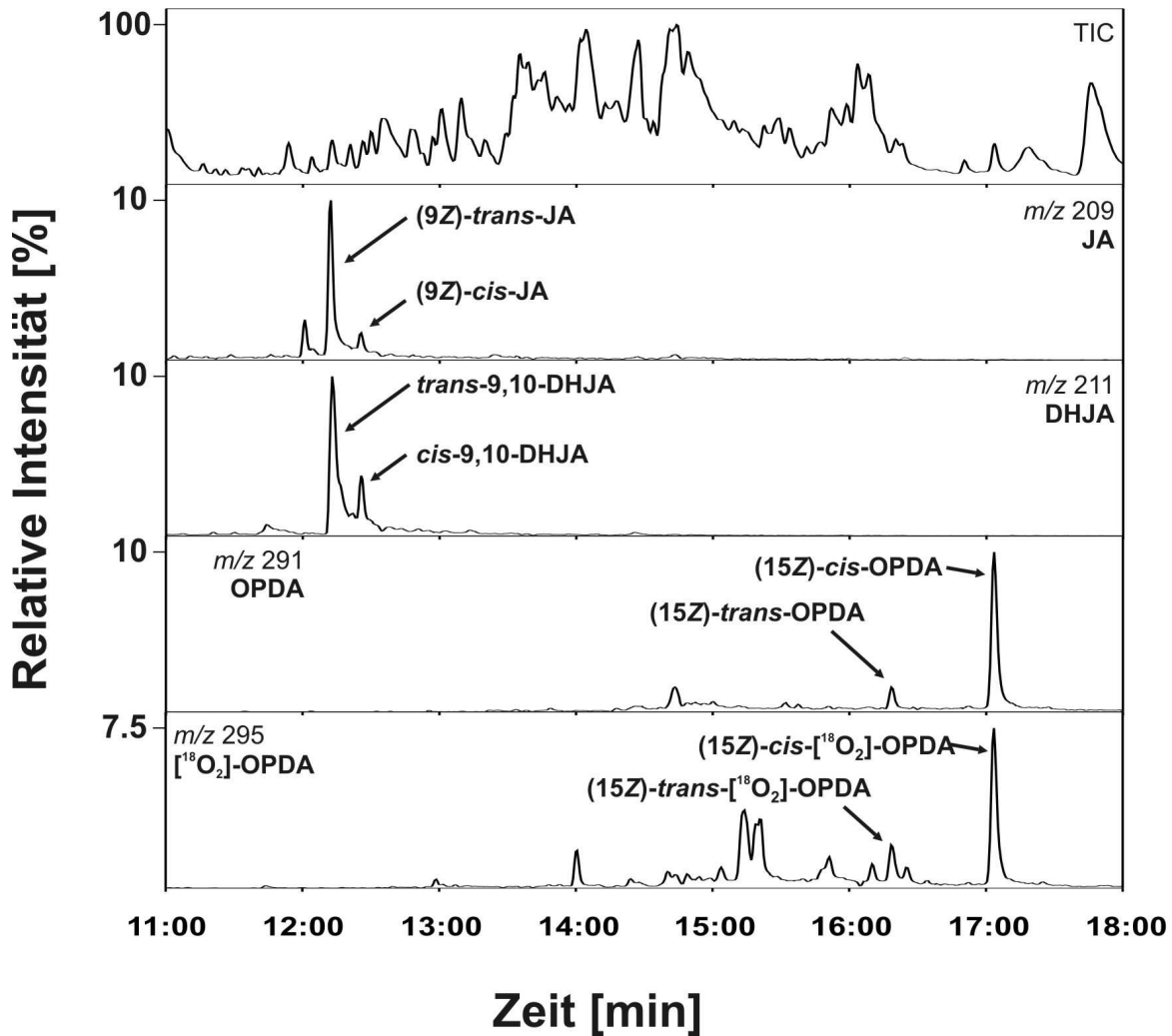


Abbildung IV.26: GC-MS-Chromatogramme (NICI) eines Pflanzenextraktes von *A. thaliana*.  $[M-PFB]^-$ -Ionen von endogener JA und OPDA sowie der Standards DHJA und  $[^{18}O_2]$ -OPDA, Totalionenstrom (TIC).

Bei der GC-MS-Analytik musste beachtet werden, dass neben den, über den endogenen Biosyntheseweg ausschließlich gebildeten, beiden *cis*-Isomeren der 9(*S*),13(*S*)-12-Oxo-Phytodiensäure (Laudert *et al.*, 1997) sowie der 3(*R*),7(*S*)-Jasmonsäure (Mueller und Brodschelm, 1994), in den Proben auch *trans*-Isomere nachgewiesen werden konnten. Das thermodynamische Gleichgewicht der JA-Epimere liegt dabei bei etwa 9:1 *trans/cis* (Quinkert *et al.*, 1982), ein Verhältnis das auch in nicht elicitierten Pflanzenzellen gefunden wurde und vermutlich ein Resultat einer Isomerisierung *in vitro* und *in vivo* darstellt (Mueller und

Brodtschelm, 1994). Eine partielle Isomerisierung der Jasmonate während der Probenaufarbeitung und im GC-Injektor hat ebenfalls die Entstehung von *trans*-Isomeren zur Folge. Wegen der beobachteten Isomerisierung der Jasmonate während der Aufarbeitung wurden für die Berechnung der JA-Konzentrationen jeweils die beiden Peak-Flächen der JA-Peaks (*trans/cis*) mit der Peak-Fläche des (*trans*)-Peak des internen Standard Dihydro-JA verglichen. Zur Bestimmung der OPDA-Gehalte wurden jeweils die Peak-Flächen der (*cis*)-Peaks von OPDA und von [<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]-OPDA miteinander verglichen.

Die experimentell ermittelten Konzentrationsanstiege für JA und OPDA sind, jeweils für die kompatible und die inkompatible Interaktion zusammen, in den beiden Abbildungen IV.27 und IV.28 dargestellt. In den Pflanzen, die mit dem virulenten *Pst*-Stamm infiltriert wurden, konnte ein erster Anstieg der OPDA-Konzentration von 3,5 µg/g TG auf 27,3 µg/g TG nach 36 h festgestellt werden. Ein weiterer Anstieg auf 39 µg/g TG konnte nach 60 h nachgewiesen werden. Für JA konnte ein monophasischer Anstieg von etwa 0,8 µg/g TG auf 4,9 µg/g TG nach 24 h gemessen werden. Vergleicht man die JA- und OPDA-Kinetiken der kompatiblen Interaktion miteinander, so fällt neben den allgemein höheren OPDA-Spiegeln auf, dass das Maximum des ersten OPDA-Anstieges nach 36 h später auftrat als das des JA-Anstieges nach 24 h. Zudem kam es im Fall von OPDA zu einem zweiten Maximum nach 60 h, wobei für JA ein monophasischer Anstieg nachgewiesen werden konnte. Im Falle der mit *Pst avrRPM1* infiltrierten Pflanzen konnte für JA nach 5 h ein erster Anstieg von 0,8 µg/g TG auf 12,6 µg/g TG sowie ein schwächerer zweiter Anstieg von 3,9 µg/g TG nach 10 h auf 5,3 µg/g TG nach 24 h ermittelt werden. Für OPDA konnte ein biphasischer Kurvenverlauf festgestellt werden, wobei die Maxima nach 5 h (18,2 µg/g TG) sowie nach 24 h (23,6 µg/g TG) auftraten. Die JA-Akkumulation zeigte in der inkompatiblen Interaktion einen biphasischen Charakter, wobei beide Maxima zeitlich gesehen parallel zu denen von OPDA lagen und folglich ein synchroner Verlauf der Kinetiken nachgewiesen werden konnte.

Bei Vergleich der Kinetiken nach inkompatibler und kompatibler Interaktion konnten Unterschiede im zeitlichen Verlauf der JA- und der OPDA-Akkumulation festgestellt werden. Bei der inkompatiblen Interaktion wurde ein früher und schneller Konzentrationsanstieg von JA mit einem Maximum nach 5 h gezeigt, dem ein zweiter Maximalwert nach 24 h folgte. Ein vom zeitlichen Verlauf her vergleichbarer Anstieg konnte auch für die Konzentration von OPDA nachgewiesen werden. Sowohl die JA- als auch die OPDA-Konzentrationen folgten somit einem biphasischen Kurvenverlauf. Im Falle der kompatiblen Interaktion kam es zu verzögerten Konzentrationsanstiegen im Vergleich zur inkompatiblen Interaktion. So lag das Maximum des ersten OPDA-Anstieges deutlich später bei 36 h, gefolgt von einem zweiten Maximum nach 48 h. JA zeigte im Gegensatz zur inkompatiblen Interaktion eine monophasische Kinetik mit einer maximalen Konzentration nach 24 h. Die Konzentrations-

anstiege von OPDA und JA wurden in beiden Interaktionen zeitlich gesehen früher nachgewiesen als diejenigen der sowohl enzymatisch als auch nicht-enzymatisch gebildeten OH-FS und der PPF<sub>1</sub>.

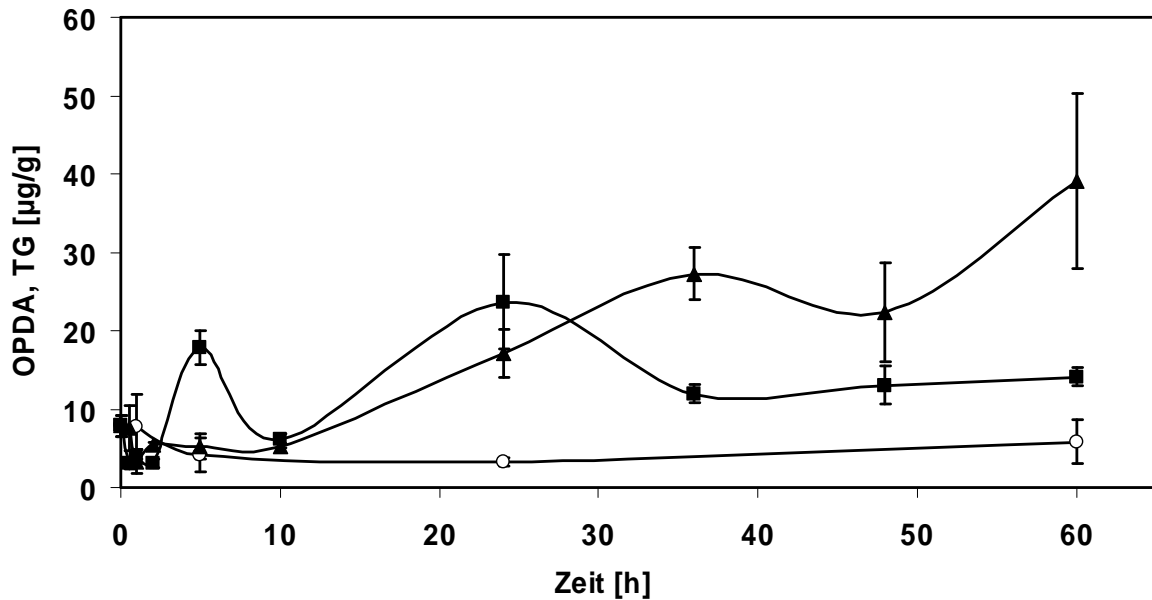


Abbildung IV.27: Akkumulation von OPDA in *A. thaliana* in der kompatiblen und der inkompatiblen Interaktion; *Pst* DC3000 (▲), *Pst* avrRPM1 (■), Kontrolle infiltriert mit 10 mM  $\text{MgCl}_2$ -Lösung (○).

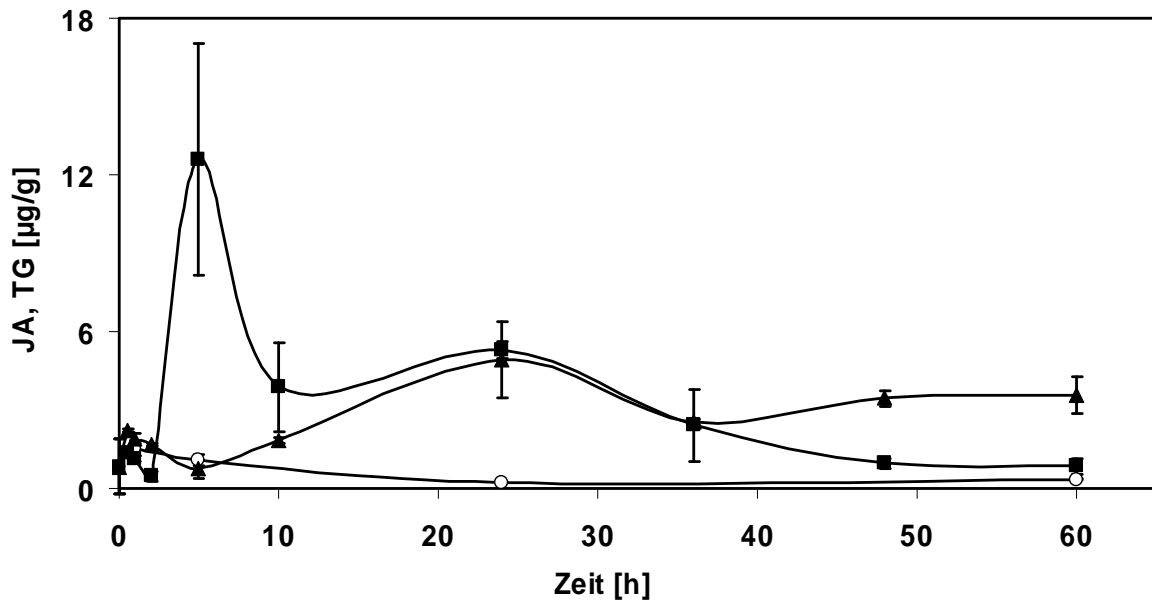


Abbildung IV.28: Akkumulation von JA in *A. thaliana* in der kompatiblen und der inkompatiblen Interaktion; *Pst* DC3000 (▲), *Pst* avrRPM1 (■), Kontrolle infiltriert mit 10 mM  $\text{MgCl}_2$ -Lösung (○).

#### 4.7 Entstehung von Salicylsäure in der kompatiblen und der inkompatiblen Interaktion

Neben der Korrelation von enzymatisch und nicht-enzymatisch gebildeten OH-FS und PPF<sub>1</sub> mit Jasmonaten während der kompatiblen und der inkompatiblen Interaktion waren die für beide Interaktionen bereits beschriebenen Anstiege der SA-Konzentrationen von Interesse. Für die Untersuchung der SA-Gehalte wurde das unter IV.4.1 - IV.4.7 verwendete Pflanzenmaterial eingesetzt und die Kinetiken der SA-Konzentration für *A. thaliana* nach Infektion mit *Pst* DC3000 und mit *Pst avrRPM1* ermittelt. Hierzu wurde die VPE-Methode (siehe III.4.2), beschrieben von Schmelz *et al.* (2004), verwendet. Mit dieser Methode konnten die SA-Konzentration in Blättern von *A. thaliana* schneller bestimmt werden als bei einer alternativen Extraktion mit Lösungsmittel, verbunden mit den anschließenden zeitaufwändigen Reinigungsschritten mittels Festphasenextraktion. Zur Analyse von SA wurden 100 mg Blattmaterial mit 100 ng [D<sub>4</sub>]-SA als internem Standard versetzt und in der Kugelmühle extrahiert. Die extrahierten Verbindungen wurden in die Methylester überführt und bei der anschließenden VPE quantitativ auf eine Super Q 80/100-SPE-Säule überführt. Die an das Super Q-Material gebundenen SA-Methylester wurden anschließend eluiert und das Lösungsmittel entfernt. Danach wurden die Proben in 5 µl Hexan gelöst und 2 µl davon mittels GC-MS analysiert. Die Detektion der Methylester erfolgte im positiven CI-Modus. Dabei wurden die [M+H]<sup>+</sup>-Ionen des SA-Methylester bei *m/z* 153 sowie des [D<sub>4</sub>]-SA-Methylester bei *m/z* 157 nachgewiesen (siehe Abbildung IV.29).

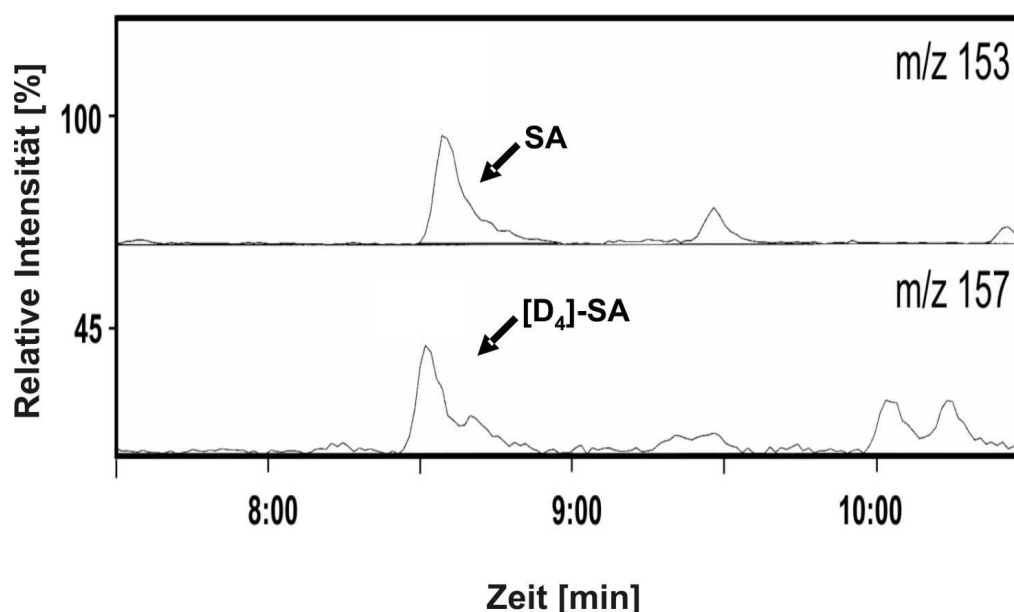


Abbildung IV.29: GC-MS-Chromatogramme (CI) von SA und [D<sub>4</sub>]-SA. Es werden die [M+H]<sup>+</sup>-Ionen des SA-Methylester (*m/z* 153) und der [D<sub>4</sub>]-SA-Methylester (*m/z* 157) detektiert.



In der Abbildung IV.30 sind die zeitlichen Verläufe der Konzentrationszunahmen an SA während der kompatiblen und der inkompatiblen Interaktion abgebildet. In der kompatiblen Interaktion konnte ein monophasischer Anstieg der SA-Konzentration nachgewiesen werden, von einem Basal-Gehalt von 31,8  $\mu\text{g/g}$  TG auf 72,0  $\mu\text{g/g}$  TG im Konzentrationsmaximum nach 24 h. In der inkompatiblen Interaktion kam es dagegen zu einem biphasischen Anstieg der SA-Konzentration, mit Maxima nach 10 h (65,2  $\mu\text{g/g}$  TG) sowie nach 48 h (50,4  $\mu\text{g/g}$  TG).

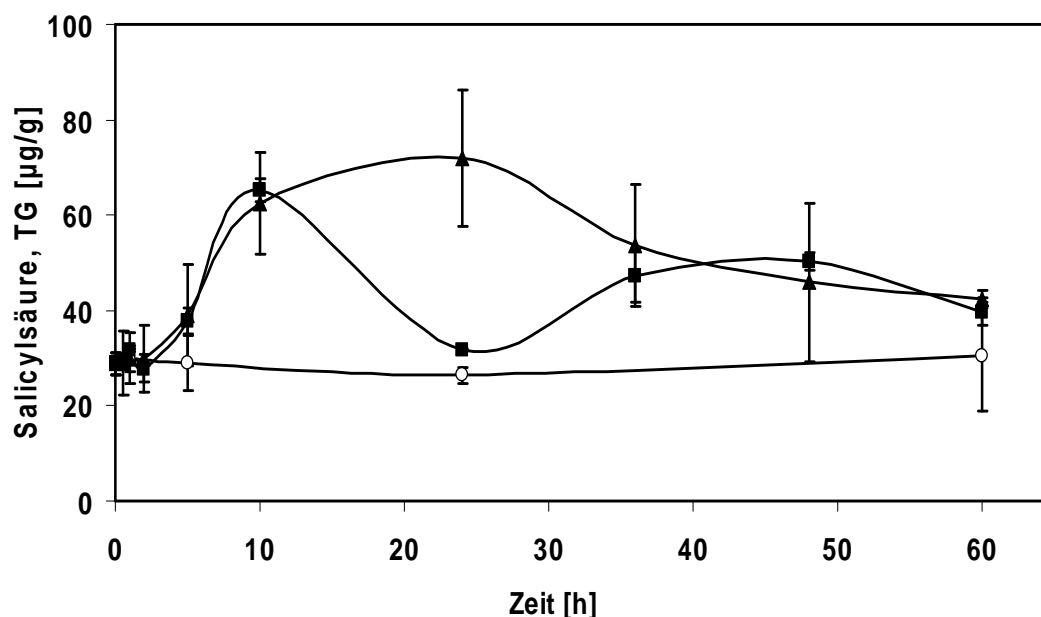


Abbildung IV.30: Akkumulation von SA in *A. thaliana* in der kompatiblen und der inkompatiblen Interaktion, *Pst* DC3000 (▲), *Pst* avrRPM1 (■), Kontrolle infiltriert mit 10 mM  $\text{MgCl}_2$ -Lösung (○). Die Aufarbeitung erfolgte nach der VPE-Methode.

Die frühe Akkumulation von SA, beginnend nach 5 - 10 h, in der kompatiblen Interaktion steht im Widerspruch zu anderen Untersuchungen, bei denen allerdings geringere Bakterienkonzentrationen für die Infiltration der Pflanzen verwendet wurden. Beispielsweise konnten Spoel *et al.* (2003) SA-Anstiege erst nach 48 h detektieren, wobei hier *Pst* DC3000 in einer Konzentration von  $2,5 \times 10^7$  Kolonie-bildende Einheiten/ml infiltriert wurden. In einer Studie von Schmelz *et al.* (2004), die ebenfalls mit *A. thaliana* nach Infiltration von virulenten *Pst* DC3000 ( $10^8$  Kolonie-bildende Einheiten/ml) durchgeführt wurde, konnte dagegen ein monophasischer Anstieg der SA-Akkumulation mit einem Maximum nach 48 h (800 ng/g FG) nachgewiesen werden, wobei nach 24 h bereits 700 ng/g FG erreicht waren. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelte maximale Konzentration war, mit 6,8  $\mu\text{g/g}$  FG, um das 8,5-fache höher im Vergleich zu dem maximalen Wert, von 800 ng/g FG, in der Arbeit von Schmelz *et al.*. Dagegen konnten Spoel *et al.* nach 24 h SA-Konzentrationen von 2,2  $\mu\text{g/g}$  FG und nach 48 h von 5,3  $\mu\text{g/g}$  FG in *A. thaliana* nachweisen. Die hier ermittelten basalen SA-Gehalte der Kontrollpflanzen waren, nach Infiltration von  $\text{MgCl}_2$ -Lösung, mit 25  $\mu\text{g/g}$  TG

(2 µg/g FG) höher im Vergleich zu basalen SA-Konzentrationen in *A. thaliana* ermittelt von Block *et al.* (2005) mit 0,08 µg/g FG oder von de Vos *et al.* (2005) mit 0,2 µg/g FG.

## 5. Entstehung von Hydroxy-Fettsäuren in der inkompatiblen Interaktion in Dunkelheit

In einer weiteren Studie sollte an dem bisher verwendeten Wirts-Pathogen-Interaktions-System *A. thaliana* und *Pst* die Abhängigkeit der Bildung von OH-FS von der bei der Anzucht verwendeten Lichtstärke untersucht werden. Der durch Photo-oxidative Peroxidierung gebildete Anteil an OH-FS ist bisher unklar. Anhand der Position der Hydroxy-Gruppe innerhalb der OH-FS kann sowohl eine Aussage über die jeweils zugrunde liegende ungesättigte Fettsäure als auch über ihren Bildungsmechanismus getroffen werden. Von besonderem Interesse ist hierbei 15-OH-FS, da diese OH-FS ausschließlich mittels  $^1\text{O}_2$  aus  $\alpha$ -Linolensäure gebildet werden kann und somit ein Marker für Photo-oxidativen Stress darstellt.  $^1\text{O}_2$  entsteht im Falle hoher Lichtintensitäten bei gleichzeitig geringem  $\text{CO}_2$ -Angebot in photosynthetisch aktiven, oberirdischen Pflanzenorganen (Montillet *et al.*, 2004; siehe auch Abbildung I.13). Im Folgenden sollte beantwortet werden, in wieweit die während der Pflanzenanzucht vorherrschende Lichtstärke ( $100 \mu\text{Es}^{-1}\text{m}^{-2}$ ) einen Einfluss auf die Bildung von OH-FS und insbesondere des charakteristischen Oxidationsproduktes 15-OH-FS besitzt. In der unter IV.4 beschriebenen Untersuchung wurde, nach Infiltration von *A. thaliana* mit avirulenten *Pst avrRPM1*, ein frühes erstes Konzentrationsmaximum der OH-FS nach 5 bzw. 10 h erreicht. Das Experiment wurde in Dunkelheit wiederholt, wobei ein Zeitraum von 24 h untersucht wurde, um eine Abhängigkeit der frühen Synthese von OH-FS von der Lichtstärke zu ermitteln. Die Inokulation der Bakteriensuspension wurde bei Grünlicht durchgeführt, nachdem die Pflanzen 9 h in Dunkelheit angezogen worden waren. Auch die Ernte und Homogenisierung des Pflanzenmaterials fand unter Grünlicht statt, um einer Artefakt-Bildung vorzubeugen. Als Kontrolle wurden parallel unter identischen Bedingungen angezogene Pflanzen in normalem Tag-Nacht-Rhythmus belassen und ebenfalls mit *Pst avrRPM1* infiziert. Die Kontrollpflanzen wurden zeitgleich mit den in Dunkelheit gehaltenen Pflanzen infiltriert, wobei die Infiltration mit dem Einschalten der Lichtperiode (bei den Kontrollpflanzen) begonnen wurde. Zusätzlich wurden Pflanzen mit 10 mM  $\text{MgCl}_2$ -Lösung infiltriert und sowohl bei Dunkelheit als auch bei Beleuchtung angezogen. Die Konzentrationen der frei vorliegenden und der Membran-veresterten 9-, 10-, 12-, 13-, 15- und 16-OH-FS-Regioisomere wurden über 24 h ermittelt, wobei die Pflanzen nach 0, 5, 10 und 24 h abgeerntet wurden. Die verwendete Einwaage an Blattmaterial, die Extraktions- und Reinigungsmethoden sowie die Derivatisierung und Analytik mittels GC-MS wurde in gleicher Weise durchgeführt wie unter IV.4 beschrieben.

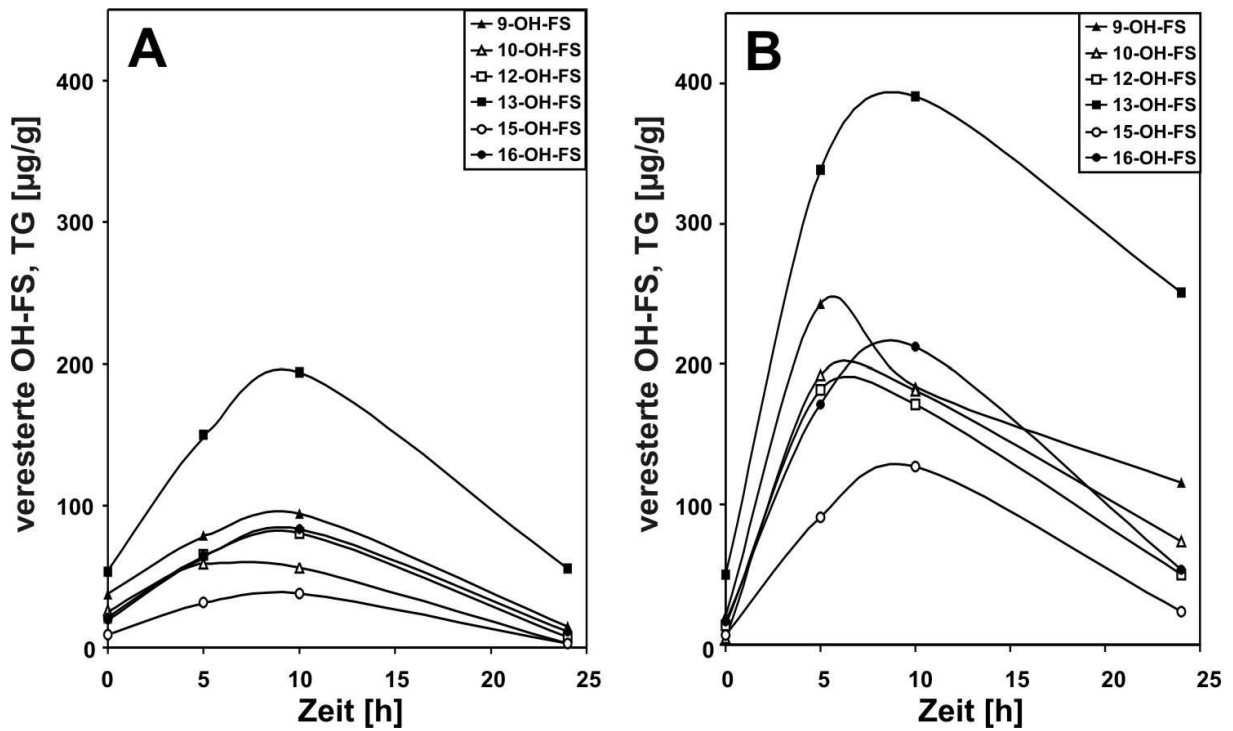


Abbildung IV.31: Akkumulation von veresterten OH-FS in *A. thaliana* in der inkompatiblen Interaktion, (A) in Dunkelheit, (B) bei Licht ( $100 \mu\text{Es}^{-1}\text{m}^2$ ).

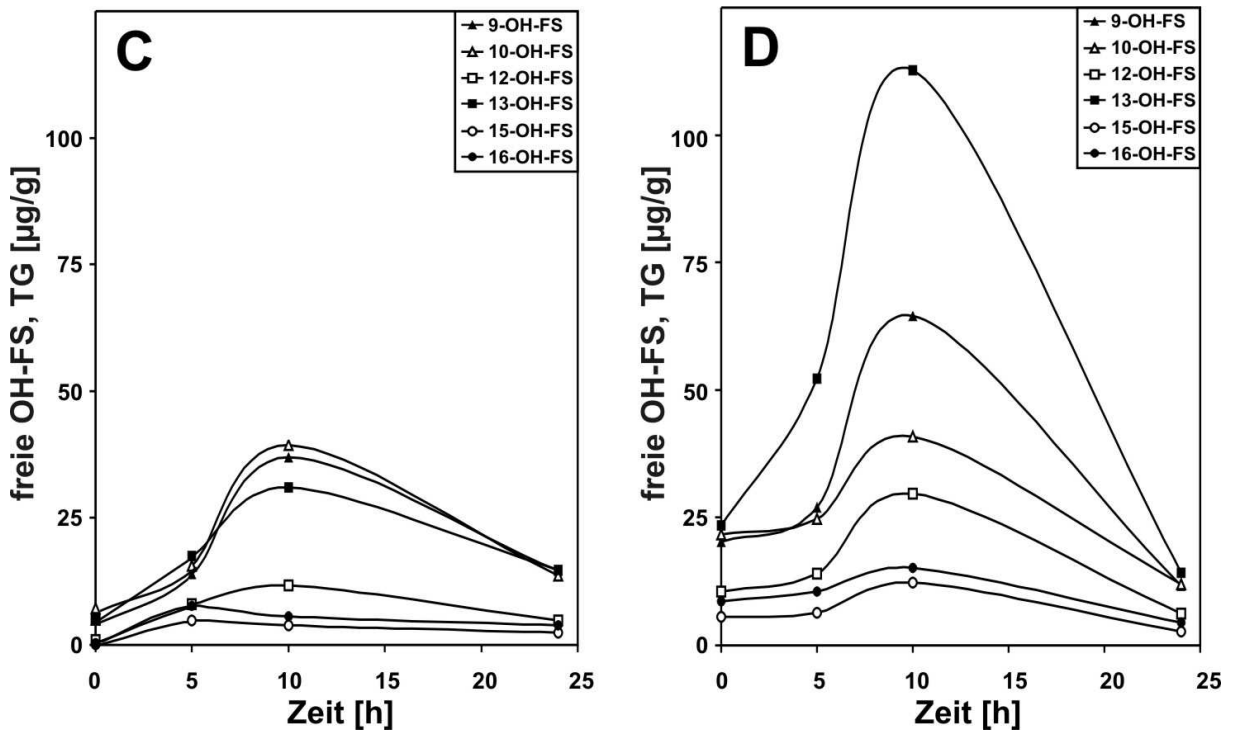


Abbildung IV.32: Akkumulation von freien OH-FS in *A. thaliana* in der inkompatiblen Interaktion, (C) in Dunkelheit, (D) bei Licht ( $100 \mu\text{Es}^{-1}\text{m}^2$ ).

Mit  $MgCl_2$ -Lösung behandelte Kontrollpflanzen zeigten sowohl bei Licht als auch in Dunkelheit während der 24 h dauernden Untersuchung keine Anstiege der OH-FS-Konzentrationen (Daten nicht abgebildet). In der Abbildung IV.31 sind die Konzentrationsanstiege der veresterten OH-FS und in der Abbildung IV.32 der freien OH-FS-Isomere, nach Infiltration von *Pst avrRPM1* in *A. thaliana*, aufgetragen. Die berechneten Standardabweichungen wurden zur besseren Übersichtlichkeit in den Grafiken nicht abgebildet und sind im Anhang (vgl. VIII) aufgelistet. Bei Pflanzen, die im Dunkeln gehalten wurden, konnten im Vergleich zu den bei Licht angezogenen Kontrollpflanzen etwa 3-fach niedrigere basale Konzentrationen an veresterten OH-FS festgestellt werden. Die Konzentrationen der basal frei vorliegenden OH-FS waren, unabhängig von der Lichtstärke, in einer ähnlichen Größenordnung. Nach Infiltration von *Pst* konnten sowohl bei veresterten als auch bei freien OH-FS in Dunkelheit um das 2- bis 3,5-fach geringere Anstiege nachgewiesen werden im Vergleich zu Pflanzen, die bei Licht angezogen wurden.

In der Abbildung IV.33 wurden für jedes Regioisomer die Konzentrationsanstiege an freien und veresterten OH-FS als Quotient des OH-FS-Gehaltes im Konzentrationsmaximum nach 10 h und dem basalen Gehalt der einzelnen OH-FS dargestellt. Die basalen Konzentrationen an OH-FS wurden zum einen aus den beleuchteten Pflanzen (6 h nach dem Einschalten des Lichts) und zum anderen aus 15 h in Dunkelheit angezogenen *A. thaliana* bestimmt.

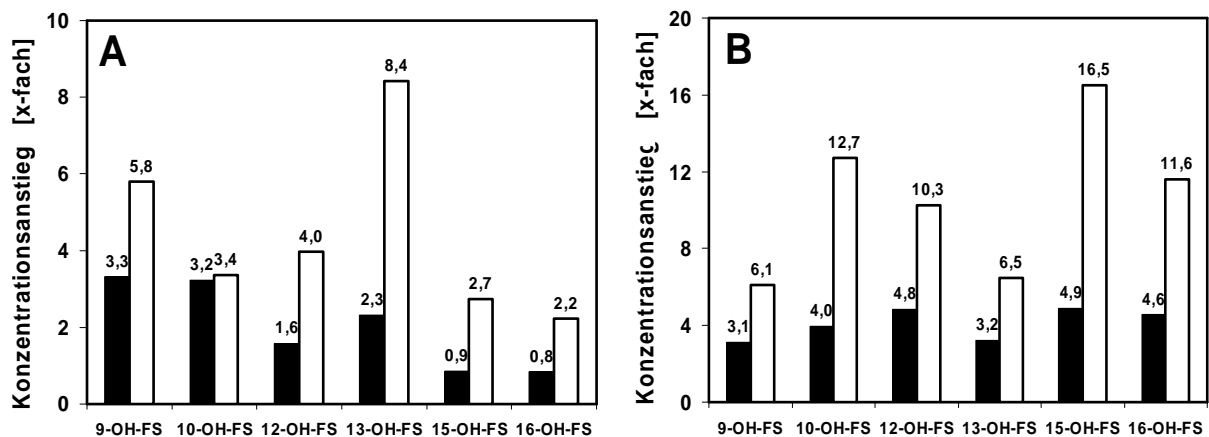


Abbildung IV.33: Konzentrationsanstiege der OH-FS in *A. thaliana* in der inkompatiblen Interaktion. Es wurde für jedes Regioisomer ein Quotient berechnet, aus der OH-FS-Konzentration im Konzentrationsmaximum nach 10 h und der OH-FS-Konzentration der Kontrollpflanzen (siehe oben). (A) freie OH-FS, (B) veresterte OH-FS, Dunkelheit (schwarze Balken), Licht ( $100 \mu Es^{-1} m^{-2}$ , weiße Balken).

Wie der Abbildung IV.33 (A) zu entnehmen ist, wurde eine bevorzugte Bildung von freien 13-OH-FS in den Pflanzen ermittelt, die mit Licht angezogen wurden (8,4-fach), im Vergleich zu den in der Dunkelheit angezogenen (2,3-fach). Bei Licht wurde zudem eine verstärkte Synthese von veresterten 10-, 15- und 16-OH-FS im Vergleich zu Dunkel-Bedingungen nachgewiesen (siehe Abbildung IV.33, B). 10-OH-FS können aus Öl-, Linol- und  $\alpha$ -Linolensäure sowohl über  $^1\text{O}_2$  als auch über einen radikalischen Mechanismus gebildet werden, 16-OH-FS können ebenso über beide Mechanismen, aber ausschließlich aus  $\alpha$ -Linolensäure entstehen. Das 15-Regioisomer, als über eine Photo-oxidative Peroxidation aus  $\alpha$ -Linolensäure gebildete Markersubstanz, wurde besonders stark bei Licht gebildet. In den Membranen konnte auch im Dunkeln ein 4,9-facher Anstieg der 15-OH-FS nachgewiesen werden, was der Ausgangshypothese ihrer ausschließlich Licht-abhängigen Synthese widersprach. Die Entstehung von 15-OH-FS in Dunkelheit stellt einen Hinweis auf eine bisher unbekannte Licht-unabhängige Bildung von  $^1\text{O}_2$  dar.

## 6. Entstehung von Hydroxy-Fettsäuren in Blättern und Wurzeln von *A. thaliana*

Wie bereits beschrieben, werden die unterschiedlichen OH-FS-Regioisomere auf einem oder mehreren Wegen gebildet. In unterschiedlichen Pflanzenorganen, wie den Blättern und den Wurzeln, sollte sich eine unterschiedliche Zusammensetzung an OH-FS nachweisen lassen, da offensichtlich -wie unter IV.5 beschrieben- sowohl die enzymatische als auch die nicht-enzymatische Lipidperoxidation im Licht in stärkerem Ausmaß stattfindet im Vergleich zu Dunkelheit. Im Folgenden sollte eine vergleichende Untersuchung der OH-FS-Konzentrationen bzw. der OH-FS-Muster in Blättern und Wurzeln durchgeführt werden. Im Experiment wurden die Wurzeln von 7 Wochen alten, unbehandelten Pflanzen unter fließendem Wasser von Erde gereinigt und sowohl die Wurzeln als auch die oberirdischen Pflanzenteile getrennt voneinander in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Pflanzen waren im Tag-Nacht-Rhythmus (siehe II.4) angezogen worden und wurden vor der Ernte für 6 h dem Licht ausgesetzt ( $100 \mu\text{Es}^{-1}\text{m}^{-2}$ ). Wurzeln und Blätter wurden auf ihre Konzentrationen an freien und veresterten OH-FS hin untersucht. Bei der Probenvorbereitung und ihrer Derivatisierung sowie der GC-MS-Analytik wurde wie unter IV.4 vorgegangen. Die ermittelten Konzentrationen der in Blättern und Wurzeln frei vorliegenden OH-FS sowie die Konzentrationen an veresterten OH-FS sind in der Tabelle IV.2 dargestellt.

	freie OH-FS in Wurzeln [ $\mu\text{g/g}$ ]	veresterte OH-FS in Wurzeln [ $\mu\text{g/g}$ ]	freie OH-FS in Blättern [ $\mu\text{g/g}$ ]	veresterte OH-FS in Blättern [ $\mu\text{g/g}$ ]
<b>8-OH-FS</b>	0,68 $\pm$ 0,09	1,88 $\pm$ 0,51	0,99 $\pm$ 0,22	7,32 $\pm$ 0,3
<b>9-OH-FS</b>	2,89 $\pm$ 0,48	10,22 $\pm$ 0,59	33,17 $\pm$ 2,09	133,68 $\pm$ 19,96
<b>10-OH-FS</b>	0,92 $\pm$ 0,09	4,10 $\pm$ 0,83	24,34 $\pm$ 1,26	111,09 $\pm$ 14,38
<b>11-OH-FS</b>	0,56 $\pm$ 0,08	1,34 $\pm$ 0,35	0,37 $\pm$ 0,06	2,64 $\pm$ 0,03
<b>12-OH-FS</b>	0,93 $\pm$ 0,11	3,98 $\pm$ 1,12	11,06 $\pm$ 0,92	122,34 $\pm$ 28,71
<b>13-OH-FS</b>	1,84 $\pm$ 0,35	12,82 $\pm$ 2,37	48,71 $\pm$ 3,42	227,27 $\pm$ 50,25
<b>15-OH-FS</b>	0,50 $\pm$ 0,10	0,57 $\pm$ 0,20	7,15 $\pm$ 0,48	63,53 $\pm$ 17,35
<b>16-OH-FS</b>	0,21 $\pm$ 0,03	3,52 $\pm$ 0,67	7,62 $\pm$ 0,88	104,64 $\pm$ 30,83

Tabelle IV.2: Konzentrationen freier und veresteter OH-FS in Wurzeln und Blättern von *A. thaliana* berechnet auf das Trockengewicht.

Die höchsten Konzentrationen an OH-FS wurden in Blättern und in Wurzeln für die sowohl enzymatisch als auch nicht-enzymatisch gebildete 9- und 13-OH-FS ermittelt. Hierbei kamen 9-OH-FS in den Blättern in 11- bis 13-mal (freie und veresterte 9-OH-FS) höheren Konzentrationen vor als in den Wurzeln und 13-OH-FS in 26- bis 18-fach (freie und gesamte 13-OH-FS) höheren Konzentrationen. Um die bevorzugte Bildung eines OH-FS-Regioisomers in Wurzeln oder Blättern zu beurteilen, wurde das Verhältnis der Konzentrationen an gesamten OH-FS in Blättern mit den Gehalten in den Wurzeln gebildet und in der Abbildung IV.34 dargestellt.

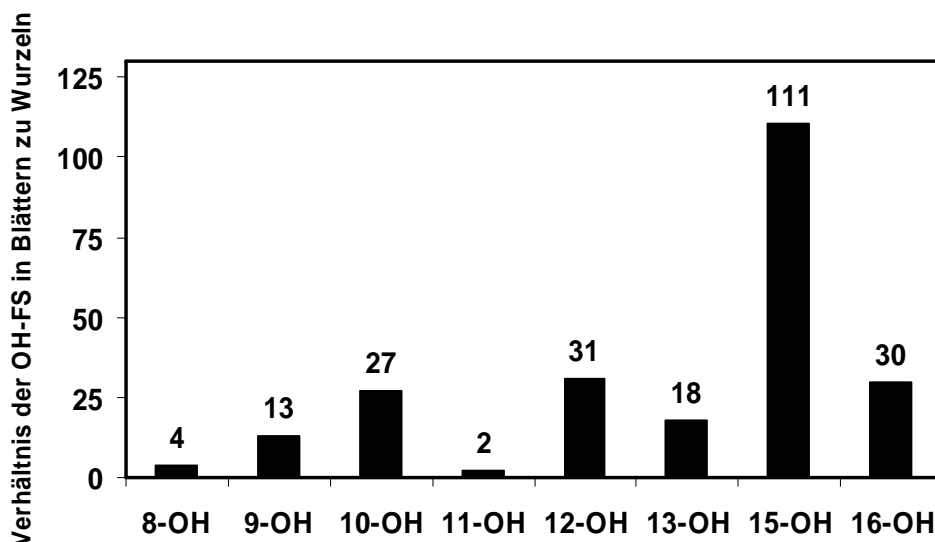


Abbildung IV.34: Verhältnisse der veresterten OH-FS in Blättern zu Wurzeln von *A. thaliana*. Es wurde für jedes Regioisomer der Quotient berechnet, aus der OH-FS-Konzentration in Blättern dividiert durch die OH-FS Konzentration in den Wurzeln.

Die in der Abbildung IV.34 dargestellten Verhältnisse der gesamten OH-FS in Blättern und Wurzeln von *A. thaliana* machten deutlich, dass alle Regioisomere bevorzugt in den Blättern akkumulieren (2- bis 111-fach). Die Konzentration des ausschließlich Photo-oxidativ gebildeten 15-Regioisomers ist in oberirdischen Pflanzenorganen in 111-mal höheren Konzentrationen nachweisbar, im Vergleich zu dem Gehalt in Wurzeln. Die zumindest anteilig über Photo-Oxidation gebildeten 10-, 12- und 16-Regioisomere wurden mit 27- bis 30-fach höheren Konzentrationen in den Blättern nachgewiesen. Die enzymatisch gebildete 13-OH-FS sowie enzymatisch und nicht-enzymatisch gebildete 9-OH-FS kommen mit vergleichsweise geringem Überschuss (13- bis 18-fach) in den Blättern vor.

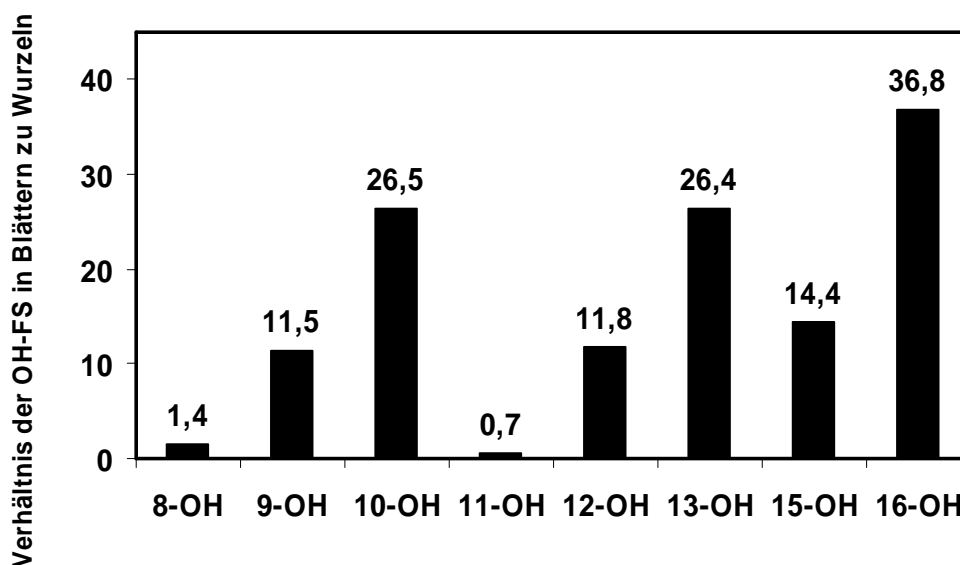


Abbildung IV.35: Verhältnis der freien OH-FS in Blättern zu Wurzeln von *A. thaliana*.

Mit Blick auf die Verhältnisse der freien OH-FS konnte ebenfalls festgestellt werden, dass die meisten OH-FS in höheren Konzentrationen in Blättern im Vergleich zu Wurzeln vorkommen, wobei 8- und 11-OH-FS (Verhältnis Blätter zu Wurzeln: 1,4 und 0,7) in beiden Pflanzenorganen in ähnlichen Konzentrationen vorkamen. Da die 8- und 11- Regioisomere ausschließlich durch freie Radikale gebildet werden und von der Lichtintensität unabhängig entstehen, war eine ähnliche Verteilung von 8- und 11-OH-FS in Blättern und Wurzeln zu erwarten. Die 10-, 13- und 16-Regioisomere waren dagegen 26- bis 37-mal mehr in Blättern im Vergleich zu Wurzeln nachweisbar. Für die frei vorliegenden 9-, 12- und 15-OH-FS konnte keine stark bevorzugte Bildung in einem Pflanzenorgan nachgewiesen werden (Verhältnis Blätter zu Wurzeln: 11,5 – 14,4). Die höheren Konzentrationen an freien 13-OH-FS in den Blättern deuten auf eine stärkere Aktivität der 13-LOX in den Blättern hin.

Die Ergebnisse belegen die verstärkte Bildung von veresterten 15-OH-FS in den Blättern im Vergleich zu Wurzeln. Dies deutet darauf hin, dass die Photo-oxidative Bildung ein Hauptweg der 15-OH-FS-Synthese ist. 15-OH-FS kommt allerdings auch im Wurzelgewebe vor, was einen Hinweis auf eine Licht-unabhängige Bildung von  $^1\text{O}_2$  bzw. 15-OH-FS darstellt. Möglicherweise findet auch ein Transport von 15-OH-FS von den Blättern in die Wurzeln statt.

### **7. Entstehung von Hydroxy-Fettsäuren und PPF<sub>1</sub> in *atrbohF*-, *atrbohD*-, *NahG*- und *Isd1*-Mutanten in der inkompatiblen Interaktion**

Ausgehend von der Bestimmung der basal und nach Infiltration von *Pst avrRPM1* vorkommenden Konzentrationen an OH-FS und PPF<sub>1</sub> (s. o.), sollten Mutanten von *A. thaliana*, wie unter IV.4 beschrieben, untersucht werden, um die Auswirkung ihrer genetischen Defekte auf die Bildung von Oxylipinen analysieren zu können. *NahG*-Pflanzen sind aufgrund einer von ihnen exprimierten bakteriellen Salicylat-Hydroxylase nicht in der Lage, SA zu akkumulieren. Es wird postuliert, dass SA über die Hemmung der Ascorbatperoxidase sowie einer Katalase, also antioxidativ wirkenden Enzymen, an der Verstärkung von oxidativem Stress beteiligt ist (siehe I.4; Mateo *et al.*, 2004). Weiterhin wurden *Isd1*-Mutanten untersucht. Diese zeigen Läsionen, die sich auf den Blattoberflächen bei Bedingungen ausbreiten, die eine Photorespiration fördern, wie Beleuchtung mit Starklicht bei gleichzeitigem CO<sub>2</sub>-Mangel. Ähnliche Symptome wurden nach der Behandlung mit *Pst* beobachtet (Dietrich *et al.*, 1994). Der genetische Defekt in *Isd1*-Pflanzen führt zu einer verminderten Aktivität der peroxisomalen Katalasen und damit zu oxidativem Stress. Es sollte untersucht werden, ob in *Isd1* eine verstärkt ablaufende Bildung von Oxylipinen nachweisbar ist. Weiterhin wurden *atrbohF* und *atrbohD*-Pflanzen eingesetzt. Die Rboh-Protein-Familie zeigt mehrere unterschiedliche Eigenschaften. Bisher bekannt ist eine Verminderung der in *A. thaliana* gebildeten ROS nach Infektion mit *Pst avrRPM1* (Torres *et al.*, 2002). *atrbohD* weist einen Defekt im NADPH-Oxidase-Komplex auf, der für die apoplastische ROS-Produktion nach Pathogenbefall verantwortlich ist. In den untersuchten *atrbohF*-Pflanzen findet die Reduzierung der ROS-Entstehung allerdings in einem schwächeren Ausmaß statt als in *atrbohD*-Pflanzen. Die Ausbildung der HR ist in *atrbohF* im Vergleich zu Pflanzen des Wildtyps *Col-0* reduziert, allerdings weniger stark verglichen mit *atrbohD*-Pflanzen (Torres *et al.*, 2005). Von Interesse bei der folgenden Untersuchung waren die Auswirkungen eines Defektes in der NADPH-Oxidase-Aktivität in *atrboh*-Pflanzen und der geringeren Bildung von  $^1\text{O}_2$  und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die Bildung von Oxylipinen während der inkompatiblen Interaktion. Es wurden OH-FS und PPF<sub>1</sub> als Markersubstanzen einer enzymatischen sowie nicht-enzymatischen Oxylipin-Synthese bestimmt.



Bei der Bestimmung von OH-FS und PPF<sub>1</sub> in Pflanzen des Wildtyps *Col-0* wurden, nach Inokulation von *Pst avrRPM1* (siehe IV.4), jeweils nach 10 und 48 h maximale Werte erreicht. Bei der Untersuchung der Mutanten von *A. thaliana* wurden deshalb die Gehalte von OH-FS und PPF<sub>1</sub> nach 0, 10 und 48 h ermittelt. Neben *NahG*-, *atrbohF*- und *atrbohD*-Mutanten und deren Wildtyp-Pflanzen *Col-0*, wurden *Isd1*-Pflanzen und deren Wildtyp-Pflanzen *Wassilevskaja* (*WS*) mit *Pst avrRPM1* ( $10^8$  Kolonie-bildende Einheiten/ml) infiltriert. Die Kontrollen wurden in gleicher Weise mit 10 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung behandelt. Die Analytik der OH-FS sowie PPF<sub>1</sub> wurde in analoger Weise durchgeführt wie unter IV.4 beschrieben.

### 7.1 Entstehung von Hydroxy-Fettsäuren und PPF<sub>1</sub> in *NahG*

*NahG*-Pflanzen entwickelten nach der Infiltration von *Pst avrRPM1* ausgeprägtere Läsionen im Vergleich zu den Wildtyp-Pflanzen. Es wurden die in Tabelle IV.3 dargestellten Konzentrationen der gesamten OH-FS-Isomere und der gesamten PPF<sub>1</sub> bestimmt.

	Zeit [h]	<i>Col-0</i>		<i>NahG</i>		<i>ws</i>		<i>Isd1</i>	
		Kontrolle [µg/g]	<i>Pst</i> [µg/g]	Kontrolle [µg/g]	<i>Pst</i> [µg/g]	Kontrolle [µg/g]	<i>Pst</i> [µg/g]	Kontrolle [µg/g]	<i>Pst</i> [µg/g]
8-OH-FS	0	0,82		0,64		0,45		0,35	
	10	-	2,43	-	2,62	-	4,39	-	4,09
	48	1,07	3,16	0,93	3,24	0,98	4,03	1,14	2,52
9-OH-FS	0	22,58		13,01		12,13		10,39	
	10	-	65,11	-	52,25	-	111,13	-	91,49
	48	28,79	67,82	20,78	66,05	26,58	94,23	34,93	49,72
10-OH-FS	0	9,55		4,31		5,16		4,15	
	10	-	22,22	-	14,93	-	27,63	-	26,10
	48	12,62	25,61	7,62	25,19	8,61	32,56	13,26	16,46
11-OH-FS	0	0,58		0,28		0,16		0,27	
	10	-	1,46	-	1,62	-	2,21	-	1,29
	48	0,69	1,60	0,29	2,21	0,36	2,86	0,67	1,68
12-OH-FS	0	11,47		5,28		6,31		5,13	
	10	-	24,96	-	18,32	-	40,15	-	32,89
	48	12,93	26,59	10,59	19,55	12,28	33,15	16,74	19,24
13-OH-FS	0	65,44		108,51		57,42		35,00	
	10	-	168,28	-	263,13	-	261,86	-	210,35
	48	167,52	224,61	116,43	462,61	50,81	147,81	69,53	151,30
15-OH-FS	0	3,45		1,18		2,40		1,89	
	10	-	8,67	-	4,96	-	10,45	-	8,61
	48	4,51	7,14	3,05	4,35	3,40	9,09	5,33	4,36
16-OH-FS	0	11,11		5,91		6,90		5,76	
	10	-	25,27	-	21,82	-	35,30	-	28,90
	48	11,91	19,58	11,16	16,89	12,94	33,45	15,74	18,78
PPF <sub>1</sub>	0	1,75		1,84		1,56		1,71	
	10	2,41	8,49	3,74	11,96	1,72	10,36	2,48	6,64
	48	2,41	7,79	3,83	11,82	4,31	11,06	3,04	7,73

Tabelle IV.3: Konzentrationen an gesamten OH-FS und gesamten PPF<sub>1</sub> bezogen auf das Trockengewicht in Wildtyp-Pflanzen von *A. thaliana*, *Col-0* und *WS*, sowie in *NahG*- und *Isd1*-Mutanten, 0, 10 und 48 h nach Infiltration von *Pst avrRPM1* ( $10^8$  Kolonie-bildende Einheiten/ml).

Die Infiltration von  $MgCl_2$ -Lösung führte sowohl in *Col-0* als auch in *NahG* zu keiner Erhöhung der Konzentrationen an  $PPF_1$  und OH-FS, mit Ausnahme der von 13-OH-FS in *NahG*. Diese resultiert vermutlich aus einer Aktivierung der 13-LOX durch den Verwundungsreiz beim Infiltrieren. Bei *Pst*-behandelten *Col-0*-Pflanzen konnte nach 10 h ein 1,8- bis 3,0-facher und nach 48 h ein 1,8- bis 3,8-facher Anstieg der OH-FS-Konzentrationen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen nachgewiesen werden. In *NahG*-Pflanzen stiegen die OH-FS-Konzentrationen sowohl nach 10 h als auch nach 48 h in der gleichen Größenordnung wie bei *Col-0* um das 2,4- bis 5,7-fache an. Die Konzentrationsanstiege der  $PPF_1$  waren nach 10 und 48 h in *Col-0* und *NahG*-Pflanzen ebenfalls vergleichbar hoch. In *Col-0* stieg die  $PPF_1$ -Konzentration nach Infiltration um das 5-fache des Ausgangswertes an, im Falle der *NahG*-Pflanzen war ein 6,5-facher Anstieg im Vergleich zum basalen Gehalt nachzuweisen.

Zur besseren Übersicht sind die Konzentrationsanstiege der OH-FS-Regioisomere und  $PPF_1$  exemplarisch 10 h nach der Infiltration in der Abbildung IV.36 dargestellt. Die Anstiege wurden durch Division der Konzentrationen an OH-FS und  $PPF_1$  mit den jeweiligen basalen Gehalten der unbehandelten Kontrollpflanzen berechnet.

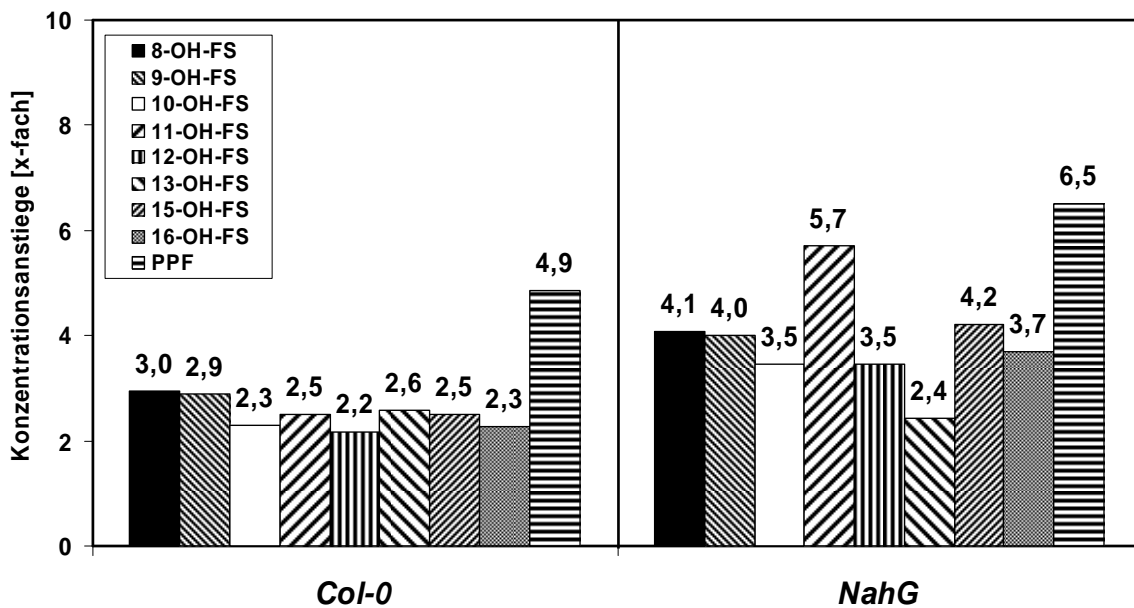


Abbildung IV.36: Konzentrationsanstiege von gesamten OH-FS und  $PPF_1$  in Pflanzen des Wildtyps *Col-0* und *NahG* 10 h nach Infiltration von *Pst avrRPM1*. Es wurde jeweils der Quotient aus der OH-FS- bzw.  $PPF_1$ -Konzentration nach 10 h mit der Konzentration von unbehandelten Kontrollpflanzen berechnet.

Die hier ermittelten Ergebnisse einer Einfachbestimmung deuten auf keine auffallenden Unterschiede zwischen *Col-0* und *NahG* hin. Nach Infektion mit avirulenten *Pst* sind die Konzentrationsanstiege von OH-FS und PPF<sub>1</sub> in *NahG*-Mutanten tendenziell etwas stärker im Vergleich zu den Anstiegen in *Col-0*.

## 7.2 Entstehung von Hydroxy-Fettsäuren und PPF<sub>1</sub> in *Isd1*

Die *Isd1*-Pflanzen entwickelten nach der Infektion durch *Pst avrRPM1* etwa gleich starke Läsionen wie die Pflanzen des Wildtyps *WS*. Einen Überblick über die ermittelten Konzentrationen an OH-FS und PPF<sub>1</sub> gibt die Tabelle IV.3. Die Infiltration mit MgCl<sub>2</sub>-Lösung bewirkte keinen Anstieg der Gehalte an OH-FS und PPF<sub>1</sub> in *Col-0* und *Isd1*. Die Konzentrationen, basal sowie 10 und 48 h nach *Pst*-Behandlung, waren in einer ähnlichen Größenordnung in *Col-0* und *Isd1*. In der Abbildung IV.37 sind exemplarisch die Anstiege der OH-FS sowie PPF<sub>1</sub>-Konzentrationen nach 10 h *Pst*-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Kontrollpflanzen dargestellt.

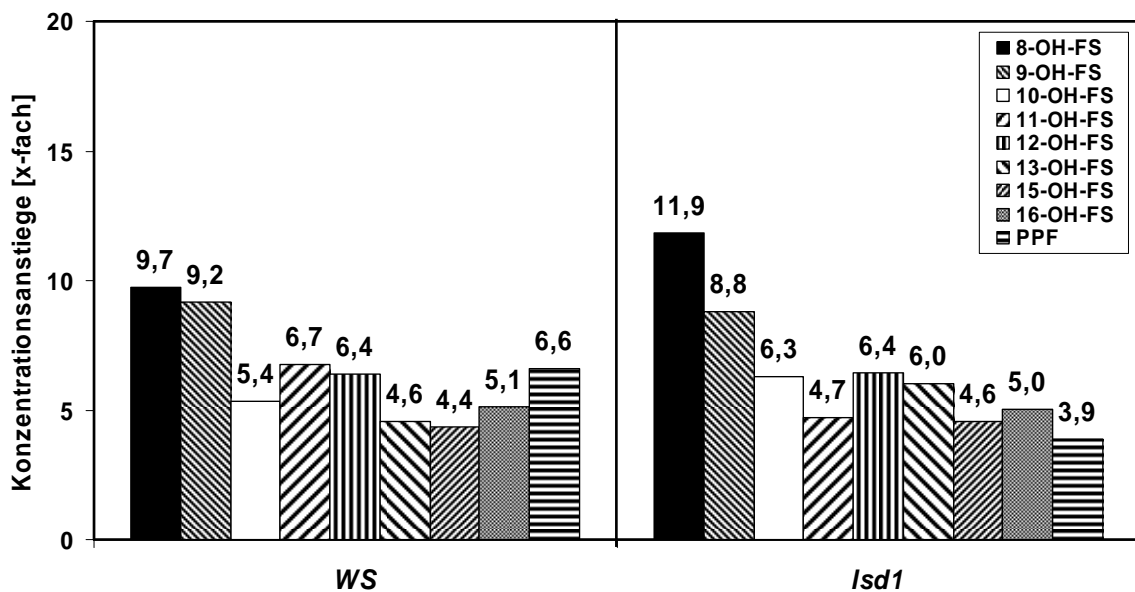


Abbildung IV.37: Konzentrationsanstiege von gesamten OH-FS und PPF<sub>1</sub> in Pflanzen des Wildtyps *WS* und *Isd1* 10 h nach Infiltration von *Pst avrRPM1*. Es wurde jeweils der Quotient aus der OH-FS- bzw. PPF<sub>1</sub>-Konzentration nach 10 h mit der Konzentration in unbehandelten Kontrollpflanzen berechnet.

Aufgrund der ähnlichen Konzentrationsanstiege in *Col-0* und *Isd1* lässt sich zusammenfassen, dass der genetische Defekt in *Isd1* nach einer Infektion mit avirulenten *Pst* unter den gewählten Versuchsbedingungen zu keiner verstärkten Bildung von OH-FS im Vergleich zum Wildtyp führt. In *Isd1* wurde allerdings eine etwas geringere Akkumulation von PPF<sub>1</sub> im Vergleich zu *WS*-Pflanzen nachgewiesen.

### 7.3 Entstehung von Hydroxy-Fettsäuren und PPF<sub>1</sub> in *atrbohF*- und *atrbohD*

Da die unter IV.7.1 und IV.7.2 ermittelten Anstiege an gesamten OH-FS relativ gering waren, wurde bei der darauf folgenden Bestimmung von OH-FS in *atrbohF*- und *atrbohD*-Pflanzen sowie in Pflanzen des Wildtyps *Col-0* eine Bestimmung der freien OH-FS durchgeführt. Freie OH-FS zeigten in bisherigen analogen Experimenten stärkere Konzentrationsanstiege in *Pst*-behandelten *A. thaliana* im Vergleich zu den Anstiegen der gesamten OH-FS. Die Gehalte an OH-FS und PPF<sub>1</sub> im zweiten Maximum (48 h) der unter IV.4 ermittelten Kinetik waren zudem höher als 10 h nach der *Pst*-Infiltration. Deshalb wurden die freien OH-FS und die gesamten PPF<sub>1</sub>, abweichend von den Konzentrationsbestimmungen an *NahG*- und *Isd1*-Pflanzen, 48 h nach der Infiltration bestimmt. Es wurden unbehandelte Kontrollpflanzen, mit 10 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung sowie mit *Pst* behandelte Pflanzen nach 48 h abgeerntet und untersucht. Die Analytik der OH-FS sowie PPF<sub>1</sub> wurde wie unter IV.4 durchgeführt. Die ermittelten Konzentrationen an OH-FS und PPF<sub>1</sub> sind in der Tabelle IV.4 aufgeführt.

<b>Col-0</b>	<b>Kontrolle [µg/g]</b>	<b>MgCl<sub>2</sub> 48 h [µg/g]</b>	<b>Pst 48 h [µg/g]</b>
8-OH-FS	1,36	2,64	7,01
9-OH-FS	19,05	28,26	31,54
10-OH-FS	11,98	19,34	26,97
11-OH-FS	0,59	0,31	0,91
12-OH-FS	11,24	15,83	22,72
13-OH-FS	22,44	34,66	44,02
15-OH-FS	5,16	10,09	16,12
16-OH-FS	8,27	15,14	25,21
PPF <sub>1</sub>	3,20	3,40	4,98
<b><i>atrbohF</i></b>			
8-OH-FS	10,52	7,52	3,81
9-OH-FS	50,66	61,19	32,42
10-OH-FS	49,33	32,96	23,45
11-OH-FS	1,69	0,31	0,89
12-OH-FS	34,07	31,25	17,08
13-OH-FS	66,42	89,90	40,64
15-OH-FS	26,19	20,16	10,70
16-OH-FS	35,47	31,26	15,96
PPF <sub>1</sub>	2,58	3,40	3,88
<b><i>atrbohD</i></b>			
8-OH-FS	13,38	5,03	2,44
9-OH-FS	60,65	43,73	24,83
10-OH-FS	58,88	28,69	16,73
11-OH-FS	1,34	0,63	0,49
12-OH-FS	33,73	25,43	11,68
13-OH-FS	74,38	74,64	40,92
15-OH-FS	37,67	16,80	7,24
16-OH-FS	45,85	13,64	10,95
PPF <sub>1</sub>	3,24	3,48	4,29

Tabelle IV.4: Konzentrationen an freien OH-FS und gesamten PPF<sub>1</sub> bezogen auf das Trockengewicht in Pflanzen des Wildtyps *Col-0* sowie in *atrbohF*- und *atrbohD*-Mutanten. Es wurden unbehandelten Kontrollen sowie Pflanzen 48 h nach Infiltration von einer 10 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung bzw. einer *Pst* *avrRPM1*-Suspension ( $10^8$  Kolonie-bildende Einheiten/ml) untersucht.

Abweichend zu den mit *Isd1* und *NahG* durchgeführten Untersuchungen wurden die Experimente an *atrbohD* und *atrbohF* unter Verwendung einer weiteren Charge von *A. thaliana Col-0* als Kontrollpflanzen durchgeführt. Hieraus ergaben sich die Unterschiede zu anderen, im Rahmen dieser Arbeit ermittelten, basalen Gehalten an OH-FS oder PPF<sub>1</sub>. Mit Blick auf die basalen Konzentrationen an freien OH-FS in den unbehandelten Kontrollpflanzen konnten in beiden *atrboh*-Mutanten 3- bis 8-fach höhere Spiegel nachgewiesen werden als in Wildtyp-Pflanzen. Dem entgegen waren die PPF<sub>1</sub>-Konzentrationen in beiden Mutanten, mit 2,58 µg/g TG in *atrbohF* und mit 3,24 µg/g TG in *atrbohD*, in einer ähnlichen Größenordnung wie bei Pflanzen des Wildtyps *Col-0*, mit 3,20 µg/g TG. Im Vergleich zu Pflanzen des Wildtyps konnten sowohl für *atrbohF* als auch *atrbohD* sinkende OH-FS-Konzentrationen, 48 h nach Inokulation der Bakterien, nachgewiesen werden. Die Konzentrationsanstiege der PPF<sub>1</sub> verhielten sich bei *Col-0* und bei den beiden *atrboh*-Mutanten nahezu identisch. In *Col-0* wurde ein 1,8-facher Konzentrationsanstieg gezeigt, in *atrbohF* ein 1,7-facher und in *atrbohD* ein 1,4-facher Anstieg. Die ermittelten Konzentrationsanstiege der OH-FS in den mit MgCl<sub>2</sub>-Lösung infiltrierten Kontrollen waren im Vergleich zu den mit *Pst* behandelten Pflanzen hoch. Zudem waren die Konzentrationsanstiege der OH-FS und PPF<sub>1</sub> schwächer als in früheren analogen Untersuchungen an *Col-0* (6,5-fach, siehe IV.4). Eine abschließende Beurteilung der vorliegenden Ergebnisse ist erst nach einer Absicherung durch weitere Experimente möglich.

## V. Diskussion

### 1. Oxylipin-Akkumulation in *A. thaliana* in der kompatiblen und in der inkompatiblen Interaktion mit *P. syringae*

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Oxylipin-Spiegel während der Pathogen-Interaktion von *A. thaliana* mit *Pst*, bei der zum einen der virulente *Pst*-Stamm DC3000 und zum anderen der avirulente Stamm *avrRPM1* eingesetzt wurde. Während der Infektion mit Pathogenen kommt es in der Regel zur Ausbildung von Nekrosen des Blattgewebes und zu einer Akkumulation von Oxylipinen. Während des oxidativen „burst“ werden ROS gebildet, die in der Lage sind, ungesättigte Fettsäuren auf nicht-enzymatischem Wege zu Hydroperoxy-Fettsäuren zu peroxidieren, aus diesen Lipid-Hydroperoxiden entstehen eine Anzahl von nicht-enzymatisch gebildeten Oxylipinen. Zu den Oxylipinen, die nicht-enzymatisch aus Öl-, Linol- und  $\alpha$ -Linolensäure gebildet werden können, zählen die OH-FS sowie, ausgehend von  $\alpha$ -Linolensäure, die Phytoprostane. Auch auf enzymatischem Wege können Oxylipine entstehen, wie z.B. 9- und 13-OH-FS, JA und deren Vorstufe OPDA. Die gleichzeitige Quantifizierung von OH-FS und PPF<sub>1</sub>, in Kombination mit der Bestimmung von Jasmonaten und SA, sollte dabei ein spezifisches Oxylipin-Profil während der Pflanze-Pathogen-Interaktion ergeben. Die von de Vos *et al.* (2005) beschriebene „Signal Signature“, bezogen auf JA, Ethylen und SA, bzw. das von Montillet *et al.* (2004) beschriebene „Oxylipin Profile“, bezogen auf OH-FS, wurden in dieser Arbeit kombiniert angewendet, wobei sämtliche Analyten aus dem gleichen Pflanzenmaterial bestimmt wurden. So konnte eine vergleichende Untersuchung der enzymatisch und nicht-enzymatisch gebildeten Oxylipine innerhalb einer Interaktion erfolgen, wobei eine unterschiedliche Kinetik der Oxylipin-Akkumulation erwartet wurde, da Oxylipine, wie bereits erwähnt, über unterschiedliche Bildungswege entstehen. Darüber hinaus konnte die Akkumulation von Oxylipinen bei der kompatiblen mit ihrer Entstehung bei der inkompatiblen Interaktion verglichen werden.

Ein von Overmyer *et al.* (2003) postuliertes Modell (vgl. Abbildung V.1) zeigt einige verstärkende Effekte bzw. antagonistische Wirkungen von enzymatisch gebildeten Phytohormonen, wie JA, Ethylen und SA, auf die Entstehung von ROS sowie die Abhängigkeit des Zelltods von der ROS- und SA-Entstehung.

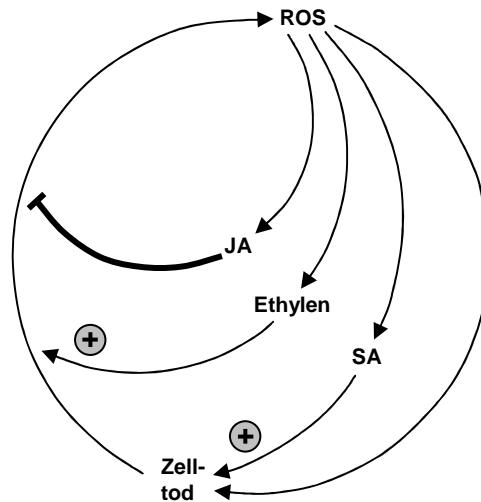


Abbildung V.1: Hormonelle Regulation des Zelltod-Zyklus (postuliert): Eine verstärkte Akkumulation von ROS in Synergie mit SA induziert den Zelltod. Ethylen wird für eine verstärkte ROS-Produktion benötigt, was einen „positive feedback“-Zyklus bewirken kann, der den fortschreitenden Zelltod antreibt. Die Akkumulation von JA resultiert aus der Aktivierung der JA-Biosynthese durch ROS. JA kann die negative Regulation des obigen oxidativen Zelltod-Zyklus bewirken, indem sie dem positiven Effekt von Ethylen auf die ROS-Entstehung entgegenwirkt (Overmyer et al., 2003).

In Pflanzen-Pathogen-Interaktionen wurde eine Akkumulation von JA, Ethylen und SA sowohl in der kompatiblen als auch in der inkompatiblen Interaktion nachgewiesen (s. u.). Zudem konnte unter anderem von Vöisey und Slusarenko (1989) gezeigt werden, dass eine Infektion von *Phaseolus vulgaris* mit avirulenten Pathovaren von *P. syringae* pv. *phaseolicola* eine frühere und stärkere Expression von Abwehrgenen induziert als eine Infektion mit virulenten Pathovaren des gleichen Pathogens. Dies ist ein Beispiel dafür, dass molekulare Signalmechanismen in beiden Interaktionen verwendet werden können, allerdings Unterschiede zwischen kompatibler und inkompatibler Interaktion bezogen auf die Stärke und den zeitlichen Verlauf der Genexpression existieren. Die Verteidigungsantwort von *A. thaliana* nach Infektion durch *Pst* ist in der kompatiblen und der inkompatiblen Interaktionen mit einer massiven Änderung der Gen-Expression verbunden. In einem Array mit etwa 8000 Genen (AtGenome1 Array, Affymetrix, Santa Clara, CA), was einem Drittel der gesamten Anzahl Protein-codierender Gene in *A. thaliana* entspricht, wurde die „Gen-für-Gen“-Resistenzantwort gegen *Pst* untersucht (Tao et al., 2003). Die Untersuchung der Expressionsprofile erfolgte jeweils nach 0, 3, 6 und 9 h. Hierbei wurde eine Veränderung der Expression von 2000 Genen bereits 3 - 6 h nach Infiltration des avirulenten Pathogens (*Pst* avrRpt2 und avrB;  $2 \times 10^7$  Kolonie-bildende Einheiten/ml) nachgewiesen. Es wurde festgestellt, dass 6 - 9 h nach der Infiltration die Mehrzahl der Veränderungen in den Expressions-Profilen in der Interaktion mit virulenten und avirulenten *Pst* qualitativ ähnlich waren. Der virulente *Pst*-Stamm DC3000 ( $2 \times 10^7$  Kolonie-bildende Einheiten/ml), der keine

HR und keinen Zelltod auszulösen vermag, zeigte bezogen auf die Gen-Expression vergleichbare Änderungen wie die avirulenten *Pst*-Stämme *avrRpt2* und *avrB*, allerdings schwächer ausgeprägt und etwa 3 h später. Obwohl unterschiedliche Gen-Expressionsprofile in der kompatiblen im Vergleich zu der inkompatiblen Interaktion nachgewiesen wurden (Tao *et al.*, 2003) und in der Literatur auch Unterschiede beschrieben werden, die den zeitlichen Verlauf der enzymatisch gebildeten Oxylipine und SA in beiden Interaktionen betreffen (s. u.), ist bisher unklar, zu welchen Zeitpunkten während der Pathogenese in *A. thaliana* eine Akkumulation von nicht-enzymatisch gebildeten Oxylipinen erfolgt. Im Anschluss an eine Bestimmung der Jasmonate und SA wurden bei der Anfertigung dieser Arbeit OH-FS und PPF<sub>1</sub> als Marker für nicht-enzymatisch gebildete Oxylipine analysiert. Hierbei konnten in der Literatur beschriebene Unterschiede bei der Bildung von Jasmonaten und SA bei der kompatiblen im Vergleich zur inkompatiblen Interaktion von mir bestätigt werden. In der inkompatiblen Interaktion zeigten sowohl die JA- als auch die OPDA-Konzentrationen einen biphasischen Kurvenverlauf mit Maxima nach 5 und 24 h. Eine ähnliche Kinetik der JA-Bildung wurde auch in der Arbeit von de Vos *et al.* (2005) nachgewiesen, in der *A. thaliana* mit *Pst avrRpt2* ( $10^7$  Kolonie-bildende Einheiten/ml) infiziert wurde. Vermutlich aufgrund der geringeren *Pst*-Konzentration wurden die Maxima von de Vos *et al.* erst nach 12 und 48 h detektiert. Im Falle der kompatiblen Interaktion wurden in der vorliegenden Arbeit Konzentrationsanstiege von OPDA und JA ermittelt, die nach 24 - 36 h einen maximalen Wert erreichten und demnach später, als in der inkompatiblen Interaktion nachgewiesen wurden. Monophasische Konzentrationsanstiege, allerdings mit Maxima erst nach 72 h, wurden sowohl für OPDA als auch für JA in einem Experiment von Schmelz *et al.* (2004) ermittelt, bei dem *A. thaliana* mit virulenten *Pst* DC3000 ( $10^8$  Kolonie-bildende Einheiten/ml) infiziert wurde. Die OPDA- und JA-Anstiege der kompatiblen Interaktion können u.a. mit Ergebnissen einer Studie von Block *et al.* (2005) verglichen werden, in der eine Infektion von *A. thaliana* mit dem virulenten *Pst*-Stamm DC3000 ( $10^7$  Kolonie-bildende Einheiten/ml) durchgeführt wurde. Von Block *et al.* wurde eine biphasisch ansteigende OPDA-Kinetik ermittelt. Das erste Maximum konnte mit 480 ng/g FG bereits nach 24 h nachgewiesen werden und wurde damit früher als in der vorliegenden Arbeit (36 h) detektiert. Anschließend kam es zu einem zweiten Anstieg, beginnend 48 h nach der *Pst*-Behandlung, auf 500 ng/g FG nach 100 h. Eine zweite Zunahme der OPDA-Konzentration nach 48 h in der kompatiblen Interaktion konnte von mir bestätigt werden. Unbehandelten Kontrollpflanzen besaßen in dieser Arbeit basale Gehalte von über 600 ng OPDA/g FG, wohingegen die von Block *et al.* (2005) etwa 100 ng OPDA/g FG aufwiesen. Die unterschiedlichen basalen OPDA-Gehalte könnten durch Altersunterschiede der verwendeten Pflanzenchargen begründet sein (keine Angabe in der Veröffentlichung). Im Falle von JA wurde von Block *et al.* ein geringer erster Anstieg auf 200 ng/g FG nach 5 h sowie ein weiterer auf etwa 300 ng



nach 72 h ermittelt. Die Konzentrationsmaxima von OPDA und JA waren in der vorliegenden Arbeit durchweg höher als die von Block *et al.* ermittelten Konzentrationen. Für OPDA wurden um das 6-fache höhere Gehalte und im Falle von JA etwa um das Doppelte höhere Konzentrationen ermittelt im Vergleich zur Arbeit von Block *et al.* (2005). Die beschriebenen Differenzen zu Studien anderer Autoren können auf die Verwendung von *Pst*-Suspensionen mit unterschiedlichen Konzentrationen zurückgeführt werden und deuten auf unterschiedliche Bedingungen bei der Pflanzenanzucht hin. Diese Beispiele zeigen, dass die Kinetiken eines Signalstoffes in Abhängigkeit von den Versuchsbedingungen etwas verschieden sein können. Sollen verschiedene Signalstoff-Kinetiken miteinander verglichen werden, ist es günstig, alle Parameter an einem Pflanzenmaterial zu bestimmen.

Die unterschiedlichen Kinetiken beider Interaktionstypen kann man in der Weise interpretieren, dass *A. thaliana* im Falle der inkompatiblen Interaktion mit *Pst avrRPM1* die Infektion anhand der RPM1- und RPS2-Proteine erkennt. Diese Proteine vermitteln eine Phosphorylierung von RIN4, nach Erkennung der bakteriellen Virulenzfaktoren AvrRpm1 und AvrB (siehe I.2). Infolge dieser Erkennung kommt es rasch zur Ausbildung einer HR, was anhand von Nekrosen auf den infiltrierten Blättern auch visuell erkennbar war. Infolge der Aktivierung des 13-LOX-Weges während der HR kommt es unter anderem zur Biosynthese von OPDA sowie JA, was bei den durchgeführten Untersuchungen mit den jeweiligen Konzentrationsmaxima nach 5 h zu beobachten war. Weiterhin werden, infolge der Gewebenekrosen und der damit verbundenen Degenerierung von Membranen, in zunehmendem Maße Substrate für die 13-LOX bereitgestellt. Es tritt somit eine lokale Verstärkung der initialen Reaktion auf, was man als Ursache des zweiten OPDA bzw. JA-Anstieges nach 24 h interpretieren kann. Bei der kompatiblen Interaktion erkennen die Pflanzen aufgrund des fehlenden bakteriellen AvrRpm1-Proteins die Infektion zunächst nicht und initiieren somit keine HR. Die mit der Ausbildung der HR verbundene frühe Akkumulation von OPDA und JA bleibt aus. Dennoch kam es zu einem späteren Zeitpunkt, nach 24 - 36 h, zu Anstiegen der OPDA- und JA-Gehalte. Diese Entstehung von Jasmonaten in der kompatiblen Interaktion ist vermutlich eine Folge der Pathogenvermehrung, die bei der Infiltration einer mit  $10^8$  Kolonie-bildenden Einheiten/ml bereits hohen Bakterienkonzentration auch hier die Aktivierung pflanzlicher Verteidigungsmechanismen auslöst. Möglicherweise findet in *A. thaliana* auch eine bisher nicht beschriebene verspätete Erkennung von *Pst* DC3000 statt, die dann eine im Vergleich zur inkompatiblen Interaktion ebenfalls verspätete Akkumulation von JA- und OPDA auslösen könnte.

Beim Vergleich der SA-Konzentrationen bei beiden Interaktionen wurde bei der kompatiblen Interaktion, beginnend nach 5 h, ein monophasischer Anstieg mit einem Maximum nach 24 h

nachgewiesen, während nach Infiltration mit dem avirulenten *Pst*-Stamm eine biphasische SA-Kinetik, mit Maxima nach 10 und 48 h, ermittelt wurde. Die Ergebnisse waren insofern ungewöhnlich, als dass eine HR (Quirino und Bent, 2003) und die daran anschließende SA-abhängige SAR (Delaney *et al.*, 1994) nur im Falle einer inkompatiblen Interaktion auftreten sollten. In der kompatiblen Interaktion hingegen wird die Akkumulation von SA normalerweise erst zu einem späteren Zeitpunkt initiiert. So wurde z.B. in einer Arbeit von Spoel *et al.* (2003) nach Infiltration von *Pst* DC3000 ( $2,5 \times 10^7$  Kolonie-bildende Einheiten/ml) ein monophasischer Anstieg der SA-Gehalte bis zu einem Maximum nach 48 h ermittelt. Eine mögliche Begründung für den von mir nachgewiesenen früheren Konzentrationsanstieg könnte die mit  $10^8$  Kolonie-bildenden Einheiten/ml vergleichsweise hohe Konzentration der zur Infiltration verwendeten Bakteriensuspension darstellen. Die Konzentration der Lösung war möglicherweise so hoch, dass die Pflanzen keine wirksame Abwehr mehr initiieren konnten. Ein früher Anstieg der SA-Konzentration nach der Infiltration mit avirulenten *Pst* (*avrRpt2*,  $10^7$  Kolonie-bildende Einheiten/ml) ist in der Literatur beschrieben. Dieser begann nach 3 - 12 h und erreichte nach 24 h ein Maximum (de Vos, *et al.*, 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte ein ähnlicher Verlauf der SA-Akkumulation nachgewiesen werden. Nach Infiltration von *Pst avrRPM1* ( $10^8$  Kolonie-bildende Einheiten/ml) wurde ein Konzentrationsmaximum mit einem 2,2-fachen Anstieg der SA-Konzentration innerhalb von 10 h nachgewiesen.

Ausgehend von der Bestimmung der Jasmonate und SA, wurden im Folgenden die Konzentrationen von OH-FS und PPF<sub>1</sub> in beiden Interaktionen untersucht. Somit konnte die Akkumulation enzymatisch gebildeter Phytohormone mit den Kinetiken nicht-enzymatisch gebildeter Oxylipine verglichen werden. Darüber hinaus wurden innerhalb einer Pflanze-Pathogen-Interaktion zeitliche Unterschiede bei der Zunahme einzelner OH-FS-Isomere erwartet, da diese über drei verschiedene Bildungswege entstehen können: Neben der enzymatischen Biosynthese von 9- und 13-OH-FS aus Linol- und  $\alpha$ -Linolensäure durch LOX, können OH-FS nicht-enzymatisch durch Photo-Oxidation (9-,10-,12-,13-,15- und 16 OH-FS) oder über eine durch freie Radikale katalysierte Peroxidation (9-,10-,12-,13- und 16 OH-FS) von Öl- Linol- und  $\alpha$ -Linolensäure gebildet werden. PPF<sub>1</sub> entstehen aus  $\alpha$ -Linolensäure ebenfalls über einen Radikal-katalysierten Mechanismus. Bisher ist unklar, in welchem Ausmaß die verschiedenen Synthesewege in *A. thaliana* zur Bildung von OH-FS beitragen, während diese zum einem mit einem virulenten *Pst*-Stamm und zum anderen mit einem avirulenten *Pst*-Stamm infiziert werden. In den von mir durchgeführten Untersuchungen der kompatiblen Interaktion wurde eine zeitgleiche Akkumulation von freien und veresterten 9-,12-,13- und 16-OH-FS und PPF<sub>1</sub> mit Konzentrationsmaxima nach 48 - 60 h nachgewiesen. Eine Untersuchung der 10- und 15-OH-FS wurde für die kompatible Interaktion nicht

durchgeführt. In der inkompatiblen Interaktionen wurde ebenfalls ein zeitgleicher Konzentrationsanstieg der freien und veresterten 9-,10-,12-,13-,15- und 16 OH-FS und der veresterten PPF<sub>1</sub> mit einem ersten Maximum nach 5 - 10 h sowie einem zweiten Maximum nach 48 - 60 h nachgewiesen. Die zeitlich parallel erfolgende Akkumulation der OH-FS-Isomere deutet darauf hin, dass sowohl in der kompatiblen als auch in der inkompatiblen Interaktion eine enzymatische Bildung von 9- und 13-OH-FS simultan zu einer Photooxidativen und zu einer Radikal-katalysierten OH-FS-Synthese stattfindet. Da bei diesem Experiment für sämtliche Untersuchungen unter gleichen Bedingungen angezogene Pflanzen sowie unter gleichen Bedingungen angezogene *Pst* verwendet wurden, war ein direkter Vergleich der Oxylipin-Konzentrationen in der kompatiblen und der inkompatiblen Interaktion möglich. Erstmals konnte über einen Zeitraum von 60 h gezeigt werden, dass in der inkompatiblen Interaktion eine OH-FS- und PPF<sub>1</sub>-Entstehung zeitgleich mit der Akkumulation der Jasmonate, OPDA und JA, erfolgte. Die beschriebene frühe Synthese von nicht-enzymatisch gebildeten Oxylipinen findet in der kompatiblen Interaktion nicht statt. Hier geht die Akkumulation von OH-FS und PPF<sub>1</sub> nach 48 - 60 h konform mit der Jasmonat-Synthese (24 - 36 h), die in der kompatiblen Interaktion ebenfalls später als in der inkompatiblen Interaktion nachgewiesen wurde.

Weiterhin konnte in beiden Interaktionen zu späten Messzeitpunkten (24 bis 60 h nach Infiltration) eine Bildung von freien 9-OH-FS nachgewiesen werden, die sogar die Konzentrationen an großteils enzymatisch gebildeten freien 13-OH-FS übertraf. Andere nicht-enzymatisch gebildeten OH-FS-Isomere, wie 12- und 16-OH-FS, zeigten während beiden Pathogen-Interaktionen keinen gleichermaßen hohen Konzentrationsanstieg wie 9-OH-FS. Da *in vivo* eine relativ konstante Verteilung nicht-enzymatisch gebildeter OH-FS-Regioisomere (siehe Tabelle V.1) vorherrscht (Montillet *et al.*, 2004), deutet die über diese Verhältnis hinausgehende Akkumulation von 9-OH-FS auf eine enzymatisch durch 9-LOX katalysierte Entstehung hin. Eine Existenz von 9-LOX ist in *A. thaliana* bisher nicht abschließend geklärt. Im Genom von *A. thaliana* befinden sich sechs LOX-Isoformen, von denen vier (LOX2, 3, 4 und 6) als 13-LOX identifiziert wurden (Stenzel *et al.*, 2003). Einen Hinweis auf die Existenz einer 9-LOX in *A. thaliana* gibt die Arbeit von Mita *et al.* (2001), in der eine 71 %-ige Übereinstimmung des für 9-LOX codierenden Gens aus Samen von *Prunus dulcis* mit dem LOX1-Gen aus *A. thaliana* nachgewiesen wurde. Darüber hinaus wurde eine verstärkte Entstehung von 9-OH-FS bereits von Montillet *et al.* (2004) nach Behandlung von *A. thaliana* mit Cadmium nachgewiesen, wobei 9-OH-FS durch eine putative 9-LOX-Aktivität gebildet werden soll. Die Autoren beschreiben diese 9-LOX als sehr viel weniger enantioselektiv arbeitend als 13-LOX.

Pflanzenspezies (Anzahl der Experimente)	Isomerenverteilung [%]			
	13-HOTE	12-HOTE	16-HOTE	9-HOTE
<i>A. thaliana</i> (n = 8)	32,2 ± 3,7	19,2 ± 2,2	22,8 ± 2,8	25,8 ± 4,8
<i>S. nigrum</i> (n = 5)	23,0 ± 4,8	18,8 ± 0,9	30,3 ± 1,6	27,9 ± 2,8
<i>N. tabacum</i> (n = 9)	21,4 ± 0,9	20,1 ± 1,8	30,8 ± 1,0	27,7 ± 2,6

Tabelle V.1: Isomerenverteilung nach ROS-vermittelter Peroxidation von  $\alpha$ -Linolensäure in Blättern verschiedener Pflanzenspezies (Montillet et al., 2004).

Einen Überblick über die Aktivierung und Biosynthese von LOX während der kompatiblen bzw. der inkompatiblen Interaktion gibt eine Arbeit von Koch *et al.* (1992) in der Pflanzen von *L. esculentum* mit virulenten *Pst* zum einen und avirulenten *P. syringae pv. syringae* ( $10^8$  Kolonie-bildenden Einheiten/ml) infiltriert wurden. Bei der inkompatiblen Interaktion wurde ein Anstieg der LOX-mRNA nach 3 h festgestellt, wobei die LOX-Aktivität nach 6 - 12 h anstieg und nach 24 - 48 h ein Maximum erreichte. Die Untersuchung der kompatiblen Interaktion ergab dagegen eine spätere Induktion der Entstehung von LOX-mRNA und einen schwachen Anstieg der LOX-Aktivität nach 24 h, dann allerdings einen stetigen Anstieg bis zu einem Maximum nach 72 h. Die während der kompatiblen Interaktion im Maximum erreichte LOX-Aktivität war mit 8 nkat/mg Protein vergleichbar hoch wie die LOX-Aktivität während der HR in der inkompatiblen Interaktion. Die verstärkte 9-OH-FS-Synthese, die bei der Anfertigung dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte, deutet auf eine 9-LOX hin, die sowohl während der HR in der inkompatiblen Interaktion (10 - 24 h) als auch in der kompatiblen Interaktion (36 - 60 h) aktiviert oder *de novo* synthetisiert wurde.

In beiden Interaktionen konnten zeitlich verzögert auftretende Konzentrationsmaxima der freien im Vergleich zu den veresterten, nicht-enzymatisch gebildeten OH-FS sowie der PPF<sub>1</sub> nachgewiesen werden. Dies bestätigt die Hypothese, dass nicht-enzymatisch gebildete Oxylipine in Membranen entstehen und anschließend aus ihnen freigesetzt werden (Farmer und Ryan, 1992). Dabei sind möglicherweise Lipasen beteiligt, die im tierischen System bereits beschrieben wurden (Balboa *et al.*, 1996; Dennis, 1997). In Pflanzen wurde die Beteiligung von drei Phospholipasen (A, C und D) an der Verteidigungsantwort indirekt nachgewiesen. Die Aktivierung von Phospholipase A<sub>2</sub> wurde in Gegenwart von Auxin (Paul *et al.*, 1998), nach Verwundung (Narvaez-Vasquez *et al.*, 1999) und Elicitor-Behandlung gezeigt (Roy *et al.*, 1995). Bisher wurden allerdings keine an einem physiologischen Prozess beteiligte Phospholipase A<sub>2</sub> aus Pflanzen isoliert und charakterisiert. Möglicherweise werden Oxylipine in *A. thaliana* auch durch Lipasen, die der Phospholipase D-Familie angehören, aus den Membranen hydrolysiert. Die Expression von Phospholipase D wird z.B. bei

Verwundung induziert (Wang *et al.*, 1999). Einen weiteren Hinweis auf die Aktivität von Lipasen gaben die ähnlich hohen Konzentrationen in den Maxima der freien OH-FS sowie der freien PPF<sub>1</sub> in jeweils beiden Interaktionen, wobei sich die maximalen Konzentrationen der veresterten OH-FS und PPF<sub>1</sub> in beiden Interaktionen jeweils um das 2- bis 3-fache unterschieden. Demnach werden, unabhängig von den in den Membranen gebildeten Oxylin-Konzentrationen, ähnliche Mengen an Oxylinen frei gesetzt und somit eine bestimmte Konzentration von frei vorliegenden Oxylinen nicht überschritten. An der Steuerung dieser Maximalkonzentration an frei vorliegenden Oxylinen könnten Lipasen beteiligt sein.

Es ist bekannt, dass Hydroperoxy-Fettsäuren als Vorstufen einer Vielzahl von Oxylinen mit Signalfunktion fungieren (Howe und Schillmiller, 2002) und die korrespondierenden OH-FS vermutlich Endprodukte der enzymatischen sowie der nicht-enzymatischen Lipidperoxidation darstellen. Im Hinblick auf die Biosynthese von Camalexin deckte sich diese Aussage mit einer Untersuchung der Arbeitsgruppe (nicht veröffentlicht), wobei nach Infiltration von 50 µM 9- bzw. 16-OH-FS in *A. thaliana* keine Induktion der Camalexin-Biosynthese gezeigt werden konnte. Die frühe Entstehung von OH-FS und PPF<sub>1</sub> während der inkompatiblen Interaktion zeitgleich mit der Bildung von Jasmonaten legte allerdings den Schluss nahe, dass diese Oxyline eine bisher nicht bekannte biologische Funktion, z.B. als pflanzliche Signalstoffe, besitzen. Demnach war die Untersuchung der biologischen Aktivität von PPF<sub>1</sub> ursprünglich ein zentrales Thema dieser Arbeit. Eine biologische Aktivität sollte zuerst mittels Microarray-Analytik an Zellkulturen von *A. thaliana* abgeklärt werden und anschließend anhand einer möglichen Schutzfunktion von PPF<sub>1</sub> auf Pflanzen während der Pathogen-Interaktion bestätigt werden. In einem Array, der nahezu das gesamte Genom von *A. thaliana* umfasste (Farmer, E. und Berger, S.; persönliche Mitteilung), wurde allerdings keine Regulation der Genexpressions festgestellt. Demzufolge wurde von einer weiteren Untersuchung der biologischen Aktivität von PPF<sub>1</sub> abgesehen. Als stabile Endprodukte der Lipidperoxidation stellen PPF<sub>1</sub> allerdings zuverlässige Marker einer ROS-Entstehung während des oxidativen „burst“ dar. Da PPA<sub>1</sub>, PPB<sub>1</sub>, PPD<sub>1</sub>, PPE<sub>1</sub>, PPF<sub>1</sub> und Deoxy-PPJ<sub>1</sub> aus einer gemeinsamen Vorstufe, G<sub>1</sub>-Phytostane, entstehen können (siehe I.8), ist davon auszugehen, dass während der nicht-enzymatischen Lipidperoxidation sämtliche PP-Isomere gleichzeitig, aber in unterschiedlichen Konzentrationen gebildet werden. PPF<sub>1</sub> waren in den bisher durchgeführten Studien nicht biologisch aktiv, können aber als repräsentativer Marker für die Bildung anderer PP bestimmt werden, die eine biologische Aktivität besitzen. So werden die verschiedenen Klassen von PP als Mediatoren von oxidativem Stress diskutiert. In Zellkulturen von *E. californica* konnte nach Behandlung mit 50 µM PPB<sub>1</sub> eine verstärkte Synthese verschiedener Phytoalexine, wie Benzophenanthridinalkaloiden oder Cumarinen

nachgewiesen werden (Loeffler *et al.*, 2005). Weiterhin wurde die Induktion einer Reihe von Genen nach Behandlung von *A. thaliana*-Zellkulturen mit PPB<sub>1</sub> beobachtet. Hierzu gehören diverse Glutathion-S-Transferasen, Glycosyltransferasen und putative „ATP-binding cassette“-Transporter, was auf eine massive Detoxifizierungs- und Verteidigungsreaktion, ausgelöst durch PPB<sub>1</sub>, hindeutet (Loeffler *et al.*, 2005). Die aus den Microarray-Analysen von PPB<sub>1</sub> gewonnenen Daten lassen darauf schließen, dass Elektrophile, wie die Zyklopentenon-Phytoprostane, eine sich überlagernde biologische Aktivität mit JA besitzen (Mueller, 2004). Deoxy-PPJ<sub>1</sub> besitzt beispielsweise eine Strukturformel, die sich nur durch eine zusätzliche Doppelbindung von der Struktur von OPDA unterscheidet (Krischke, *et al.*, 2003). Bei einer Untersuchung von *A. thaliana*-Zellkulturen nach einer Behandlung mit PPA<sub>1</sub> bzw. OPDA wurde nachgewiesen, dass 39 % der Gene, die durch PPA<sub>1</sub> induziert werden, auch durch OPDA induziert werden (ATH1 Array, Affymetrix, Santa Clara, CA). In einem analog durchgeführten Experiment mit E<sub>1</sub>-Phytoprostanen wurde ein ähnliches, allerdings schwächer ausgeprägtes Expressionsprofil wie nach Induktion durch PPA<sub>1</sub> ermittelt. Hierbei ist die  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Carbonyl-Gruppe der PPA<sub>1</sub> bzw. OPDA ausschlaggebend, die mittels Michael-Addition auch kovalent an Thiol- und Amino-Gruppen von Peptiden binden kann. Die Induktion von Glutathion-S-Transferasen wurde auch durch Behandlung von 9-Keto-Octadecadiensäure (9-KODE) beobachtet, die nach Infektion mit *Pst* verstärkt akkumuliert wird (Vollenweider *et al.*, 2000). E<sub>1</sub>- und F<sub>1</sub>-Phytoprostane haben gemeinsam, dass sie keine  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Carbonyl-Funktion besitzen, was die Begründung für eine bisher nicht nachgewiesene bzw. eine im Vergleich zu PPA<sub>1</sub> schwächere biologischen Aktivität darstellen könnte.

## **2. Entstehung von Hydroxy-Fettsäuren in der inkompatiblen Interaktion in Dunkelheit**

Die Lichtintensität, der eine Pflanze ausgesetzt ist, hat große Bedeutung für die Ausbildung pflanzlicher Abwehrreaktionen. So waren die SA-induzierte Expression von PR1 sowie die Pathogen-induzierte Ausbildung der HR nach Infektion von *A. thaliana* mit avirulenten *P. syringae* pv. *malicola* bei Dunkelheit reduziert gegenüber Lichtbedingungen (Genoud *et al.*, 2002). Weitere Verteidigungsreaktionen, wie die Induktion der Expression der Phenylalanin-Ammonium-Lyase und die Akkumulation von SA sowie die Ausbildung einer SAR, sind abhängig von der Lichtintensität. Dagegen findet eine verstärkte Akkumulation von JA und eine Bildung des Phytoalexins Camalexin in *A. thaliana* nach Infiltration von *Pst avrRPM1* (5 x 10<sup>6</sup> Kolonie-bildenden Einheiten/ml) bei Dunkelheit statt (Zeier *et al.*, 2004). Im Anschluss an die Studie der Oxylipin-Bildung während der Pathogen-Interaktion wurde somit untersucht, inwieweit eine veränderte Akkumulation von Oxylipinen stattfindet, wenn die Versuchspflanzen unter Bedingungen angezogen werden, die eine Entstehung von ROS

beeinflussen können. Hierzu zählt die Lichtintensität während der Pflanzenanzucht, die wiederum ausschlaggebend für die Bildung von  $^1\text{O}_2$  als Nebenprodukt der Photosynthese ist. Die Photo-respirative Bildung von  $\text{O}_2^{\cdot -}$  (Asada, 1999) sowie die Bildung von  $^1\text{O}_2$  können bei Starklicht durch eine Verringerung der  $\text{CO}_2$ -Konzentration noch verstärkt werden (Montillet *et al.*, 2004). Von Montillet *et al.* (2004) wurde 12-HOTE, als Marker für eine ROS-vermittelte Peroxidation in *A. thaliana* unter Starklicht-Bedingungen (14 h,  $1.400 \mu\text{E s}^{-1}\text{m}^{-2}$ ) und  $\text{CO}_2$ -Mangel (30 ppm  $\text{CO}_2$ ) verwendet. Neben der Akkumulation von 12(*R/S*)-HOTE wurde eine verstärkte Bildung racemischer 9(*R/S*)-, 13(*R/S*)- und 16(*R/S*)-HOTE nachgewiesen. Diese OH-FS-Isomere können jeweils Photo-oxidativ durch  $^1\text{O}_2$  oder mittels einer durch freie Radikale katalysierten Lipidperoxidation gebildet werden.

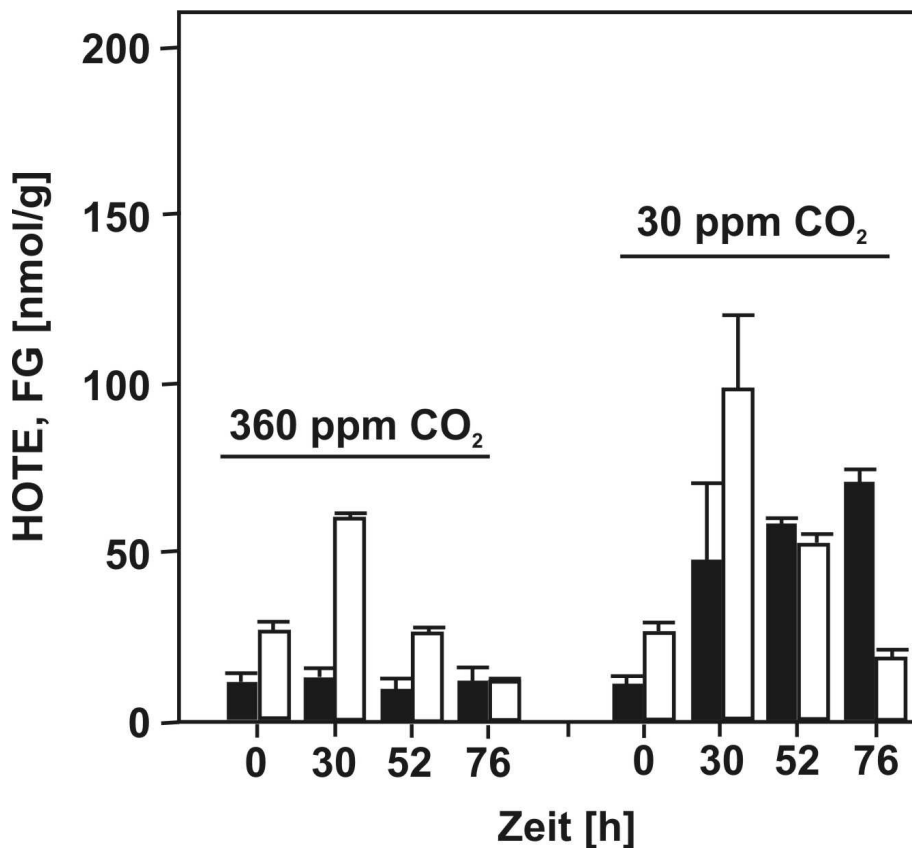


Abbildung V.2: Abbildung verändert nach Montillet *et al.* (2004): Konzentrationen von 13-HOTE, gebildet durch 13-LOX (weiße Balken) sowie von nicht-enzymatisch entstandener HOTE (schwarze Balken) als Summe der Konzentrationen von 9-, 12-, 13- und 16-HOTE in *A. thaliana*. Es wurden die HOTE-Konzentrationen während einer 76 h andauernden Beleuchtung mit Starklicht ( $1.400 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ ) untersucht, bei hohem  $\text{CO}_2$ -Angebot (360 ppm, links) und geringem  $\text{CO}_2$ -Angebot (30 ppm, rechts).

In der Abbildung V.2 sind die von Montillet *et al.* (2004) ermittelten HOTE-Konzentrationen in *A. thaliana* bei Starklicht sowie niedriger und hoher CO<sub>2</sub>-Konzentration dargestellt. Es sind die Gehalte an enzymatisch gebildeter 13(S)-HOTE und die Konzentrationen nicht-enzymatisch entstandener HOTE abgebildet, wobei die nicht-enzymatisch entstandenen HOTE als Summe der Konzentrationen von 9(R/S)-, 12(R/S)-, 13(R/S)- und 16(R/S)-HOTE berechnet wurden. Montillet *et al.* konnten eine transiente Aktivierung der 13-LOX bei Beleuchtung der Versuchspflanzen mit Starklicht sowohl bei hohem als auch bei geringem CO<sub>2</sub>-Angebot nachweisen. Dagegen stieg die Konzentration an nicht-enzymatisch gebildeten HOTE nur bei geringer CO<sub>2</sub>-Zufuhr kontinuierlich an. Um eine Photo-oxidative Peroxidation von ungesättigten Fettsäuren in *A. thaliana* zu erreichen, mussten Starklicht und CO<sub>2</sub>-Mangel in Kombination einwirken. Die folgenden Ergebnisse der vorliegenden Arbeit entstanden zeitgleich mit der Studie von Montillet *et al.* und hatten ebenfalls zum Ziel, einen Einfluss der Lichtintensität auf die Entstehung nicht-enzymatisch gebildeter OH-FS zu ermitteln. In einem zur Studie von Montillet unterschiedlichen Experiment wurden OH-FS als Folgeprodukte primärer ROS in der inkompatiblen Interaktion analysiert, wobei die Pflanzenanzucht einerseits bei Dunkelheit und andererseits bei Licht (100 µE s<sup>-1</sup>m<sup>-2</sup>) erfolgte. Hierzu wurde *A. thaliana* mit *Pst avrRPM1* (10<sup>8</sup> Kolonie-bildenden Einheiten/ml) infiltriert. Es wurden 9-,10-,12-,15- und 16-OH-FS als Marker für eine nicht-enzymatische Bildung von Hydroxy-Fettsäuren bestimmt. Um eine Licht-abhängige, nicht-enzymatische Entstehung von OH-FS über <sup>1</sup>O<sub>2</sub> von einer Bildung über freie Radikale abgrenzen zu können, wurde 15-HOTE als Marker bestimmt. Für 15-OH-FS ist kein enzymatischer Bildungsweg oder ein Radikal-katalysierter Mechanismus bekannt, sondern eine Entstehung ausschließlich durch <sup>1</sup>O<sub>2</sub> beschrieben (Frankel, 1998). Eine Photo-oxidative Lipidperoxidation findet per Definition bei Dunkelheit nicht statt, wonach keine Entstehung von 15-OH-FS in den Versuchspflanzen erwartet wurde, die in Dunkelheit angezogen wurden. Im Experiment wurde bei Dunkelheit eine verringerte Bildung aller OH-FS-Isomere (9-,10-,12-,13-,15- und 16-OH-FS) im Vergleich zu Lichtbedingungen nachgewiesen, wobei die OH-FS-Konzentrationen im Maximum, 10 h nach der Infiltration, untersucht wurden. Dies deutet entweder auf eine schwächere OH-FS-Synthese durch Photo-Oxidation bzw. durch Katalyse freier Radikale hin oder zeigt eine in Dunkelheit verstärkt ablaufende Metabolisierung von OH-FS. Der Einfluss der Lichtstärke bei der Lipidperoxidation könnte, neben ihrer Bedeutung bei der Entstehung von <sup>1</sup>O<sub>2</sub> und O<sub>2</sub><sup>\*</sup>, dadurch zu erklären sein, dass die Entstehung von OH-Radikalen aus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> über die Fenton-Reaktion und somit die Bildung von Lipid-Hydroperoxiden eine fortlaufende Reduktion von Fe<sup>3+</sup>- zu Fe<sup>2+</sup>-Ionen benötigt (Halliwell und Gutteridge, 2000). Diese Reduktion erfolgt durch gleichzeitige Oxidation von Ascorbinsäure zu Monodehydroascorbat. Durch eine Licht-abhängige Bereitstellung von NADPH als Redox-Verbindung wird Ascorbinsäure durch Reduktion von Monodehydroascorbat regeneriert.



Die etwa 3-fach stärkere Bildung des Markers 15-OH-FS in Pflanzen die bei Licht angezogen wurden, im Vergleich zu den bei Dunkelheit kultivierten Versuchspflanzen, deutet auf eine Lichtabhängigkeit des über  $^1\text{O}_2$  ablaufenden Synthesewegs in *A. thaliana* hin. Ein zukünftiges Experiment unter Verwendung von Starklicht bei gleichzeitigem  $\text{CO}_2$ -Mangel wäre an dieser Stelle interessant, um durch die Verstärkung der Photo-Inhibition eine Bildung von 15-OH-FS nachweisen zu können. Weiterhin wäre eine Untersuchung von 15-OH-FS in *N. tabacum* denkbar. Montillet *et al.* (2005) konnten in *N. tabacum* nach Infiltration von *P. syringae* pv. *syringae* ( $10^7$  Kolonie-bildenden Einheiten/ml), vergleichbare Nekrosen sowie eine Dehydratisierung sowohl bei Licht ( $350 \mu\text{E s}^{-1}\text{m}^{-2}$ ), als auch bei in Dunkelheit angezogenen Pflanzen nachweisen. Die Ausbildung von Chlorosen auf der Blattoberfläche wurde dagegen nur bei Lichtbedingungen ermittelt. Da demnach die Symptombildung von der Lichtintensität abhing, untersuchten die Autoren anschließend die Lichtabhängigkeit der HOTE-Bildung nach Infiltration von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in *N. tabacum*. Dabei konnte eine 10-fach stärkere Bildung von 9-,10-,12- und 13-HOTE in Pflanzen ermittelt werden, die bei Licht angezogenen wurden im Vergleich zu in Dunkelheit gehaltenen Pflanzen. Die (R,S)-HOTE-Enantiomere wurden, mit Ausnahme der 13-HOTE, zu nahezu gleichen Anteilen gebildet, was auf ihre nicht-enzymatische Bildung durch ROS hindeutet. An dieser Stelle wäre eine weitere Differenzierung der nicht-enzymatischen Bildungswege interessant. Anhand von 15-HOTE als Marker könnte die Differenzierung in eine Photo-oxidative Entstehung und eine Radikal-katalysierte Bildung erfolgen. Die Hypothese, dass 15-OH-FS ohne Licht nicht gebildet wird, konnte in dieser Arbeit allerdings nicht bestätigt werden. Ein 5-facher Anstieg der veresterten 15-OH-FS auch bei Dunkelheit könnte auf einen bisher unbekanntem Licht-unabhängigen Syntheseweg von  $^1\text{O}_2$  hindeuten.

### 3. Vergleich der Hydroxy-Fettsäure-Muster in Wurzeln und Blättern von *A. thaliana*

Zum Zeitpunkt der Durchführung des im Folgenden beschriebenen Versuchs wurde davon ausgegangen, dass die Photo-oxidative Entstehung von OH-FS nur in oberirdischen, dem Licht ausgesetzten Pflanzenorganen möglich ist. Demnach sollten sich theoretisch unterschiedliche OH-FS-Muster in verschiedenen pflanzlichen Organen nachweisen lassen. In der vergleichenden Analyse der OH-FS-Konzentrationen in Blättern und Wurzeln von *A. thaliana* konnten die Regioisomere, welche entweder ausschließlich oder auch Photo-oxidativ über  $^1\text{O}_2$  gebildet werden (9-,10-,12-,13-,15- und 16-OH-FS), in den Blättern in 2- bis 111-fach höheren Konzentrationen nachgewiesen werden als in den Wurzeln. Eine stärkere Licht-unabhängige OH-FS-Synthese in den Blättern folgt allerdings auch aus einem hohen Anteil mehrfach ungesättigter Fettsäuren in den Membranen der Chloroplasten, die nur in den oberirdischen Pflanzenorganen vorkommen. Veresterte 15-OH-FS werden in Blättern 111-fach mehr gebildet als in Wurzeln. Dem gegenüber wurden 9-,10-,12-,13-, und 16-OH-

FS nur in 2- bis 30-fach höheren Konzentrationen in den Blättern nachgewiesen. Die sehr viel geringere Entstehung der sowohl Photo-oxidativ als auch Radikal-katalysiert gebildeten OH-FS im Vergleich zu 15-OH-FS deutet auf die Abhängigkeit der 15-OH-FS-Entstehung von der Lichtstärke hin. Andererseits wurden 15-OH-FS im Wurzelgewebe mit einer Konzentration von 1,07 µg/g TG bestimmt. Die Anwesenheit von 15-OH-FS im Wurzelgewebe widerspricht obiger Hypothese, dass 15-OH-FS ausschließlich Licht-abhängig über  $^1\text{O}_2$  entstehen können. Der Nachweis von 15-OH-FS in Wurzelgewebe von *A. thaliana* spricht für einen bisher unbekanntem Licht-unabhängigen Bildungsweg durch  $^1\text{O}_2$  oder einen Transport von 15-OH-FS von einem oberirdischen, Photo-synthetisch aktiven Pflanzenorgan in das Wurzelgewebe.

#### **4. Entstehung von Hydroxy-Fettsäuren und F<sub>1</sub>-Phytosteranen in Mutanten von *A. thaliana* während der inkompatiblen Interaktion mit *P. syringae***

Die OH-FS- und PPF<sub>1</sub>-Bildung während der inkompatiblen Interaktion wurde bei Mutanten von *A. thaliana* und den Pflanzen des jeweiligen Wildtyps untersucht. Anhand von *NahG* sollte eine möglicherweise veränderte ROS-Bildung in Pflanzen mit einem endogen niedrigen SA-Spiegel untersucht werden. Bisher ist bekannt, dass der SA-Biosynthese eine verstärkte Akkumulation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vorausgeht (Martinez *et al.*, 2000; Mittler *et al.*, 2004), wobei H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> SA-induzierend wirkt (Neuenschwander *et al.*, 1995). SA wird mit der Regulation der HR, durch die Aktivierung von ROS, in Verbindung gebracht. Dies geschieht, indem SA über eine postulierte Hemmung der Ascorbatperoxidase sowie einer Katalase die Verstärkung von oxidativem Stress bewirkt. Für die Wirkung von SA bei der Zelltodregulation wird ein „feed-back“-Modell vorgeschlagen, bei dem SA zusammen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Abhängigkeit von ihren lokalen Konzentrationen entweder den Zelltod aktivieren oder antioxidative Zellschutzprogramme auslösen (Alvarez, 2000). Meine Untersuchung der OH-FS- sowie PPF<sub>1</sub>-Gehalte in *NahG* sollte zeigen, ob der genetische Defekt in *NahG* die Bildung veränderter Oxylipin-Konzentrationen im Vergleich zu Pflanzen des Wildtyps bewirkt. Nach der Hypothese wurde erwartet, dass ohne eine Akkumulation von SA auch eine geringe ROS-Bildung erfolgt und dass in *NahG* ein Konzentrationsanstieg nicht-enzymatisch gebildeter Oxylipine ausbleibt oder nur schwach im Vergleich zu *Col-0* ist. Die Versuchspflanzen wurden mit *Pst* avrRPM1 (10<sup>8</sup> Kolonie-bildenden Einheiten/ml) infiziert, um die inkompatible Interaktion zu untersuchen. Dabei konnte keine signifikant veränderte Entstehung von OH-FS und PPF<sub>1</sub> in *NahG*- im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen nachgewiesen werden. Unter den gewählten Versuchsbedingungen konnte die Hypothese nicht bestätigt werden, dass niedrige endogener SA-Spiegel in *NahG* eine geringere nicht-enzymatische Lipidperoxidation durch ROS bzw. geringere Oxylipin-Gehalte im Vergleich zu *Col-0* bewirken.

Im Folgenden wurden die OH-FS- und PPF<sub>1</sub>-Konzentrationen exemplarisch bei *lsd1*- und *atrboh*-Mutanten von *A. thaliana* untersucht. Diese besitzen eine verstärkte (*lsd1*) bzw. verringerte (*atrboh*) ROS-Bildung im Vergleich zu Pflanzen des jeweiligen Wildtyps, was theoretisch eine jeweils veränderte Oxylin-Entstehung zur Folge hat. Nach einer Hypothese von Torres *et al.* (2005) wirkt das AtrbohD- bzw. AtrbohF-Protein einer HR in *lsd1*-Pflanzen entgegen und begrenzt die ROS-Bildung auf den Infektionsherd. Mittels der Atrboh-Proteine kann in *lsd1*-Pflanzen ein ungewollter Zelltod, ausgelöst durch ROS wie O<sub>2</sub><sup>•-</sup>- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, unterdrückt werden. Der Phänotyp der *lsd1*-Pflanze von *A. thaliana* ist charakterisiert durch den hypersensitiven Zelltod, der nicht auf den Infektionsherd beschränkt bleibt, sondern als „run-away cell death“ (RCD) oder „spreading cell death“ beschrieben wird. Hierbei erfolgt eine Ausbreitung der Chlorosen und Nekrosen, von der Infektionsstelle ausgehend, über das gesamte Blatt (Jabs *et al.*, 1996). Der RCD kann in *lsd1* durch die Infiltration von *Pst avrRPM1* ausgelöst werden (Rusterucci *et al.*, 2001). O<sub>2</sub><sup>•-</sup> wurde dabei als sowohl notwendig als auch ausreichend für die Ausbildung von Läsionen in *lsd1* beschrieben. Die verstärkte O<sub>2</sub><sup>•-</sup>-Bildung wird als Ursache für den RCD in *lsd1*-Pflanzen nach Pathogen-Infektion diskutiert (Dietrich *et al.*, 1997). Bei dem LSD1-Protein handelt es sich um ein Zinkfingerprotein, das als negativer Regulator des Zelltods charakterisiert wurde und die O<sub>2</sub><sup>•-</sup>- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung durch eine postulierte Superoxid-Dismutase-Isoform kontrolliert (Dietrich *et al.*, 1997). Bei der hier durchgeführten Untersuchung von *lsd1* wurde während der inkompatiblen Interaktion (*Pst avrRPM1*; 10<sup>8</sup> Kolonie-bildenden Einheiten/ml) eine verstärkte Akkumulation von Folgeprodukten primär entstandener ROS, wie OH-FS und PPF<sub>1</sub>, im Vergleich zu Pflanzen des Wildtyps *WS* erwartet. Da ausgeprägtere Läsionen im Vergleich zum Wildtyp bei den untersuchten *lsd1*-Pflanzen ausblieben, verhielten sich diese offensichtlich nicht wie in der Literatur beschrieben. In einer Studie von Rusterucci *et al.* (2001) waren an *lsd1*-Pflanzen sechs Tage nach der Infiltration von *Pst avrRPM1* (10<sup>5</sup> Kolonie-bildenden Einheiten/ml), starke Nekrosen und Chlorosen ersichtlich, wohingegen die Wildtyp-Pflanzen keine derartigen Symptome zeigten. Weiterhin wurden in der vorliegenden Arbeit in *lsd1* keine stärkeren Anstiege der OH-FS-Konzentrationen im Vergleich zu Pflanzen des Wildtyps nachgewiesen. Der Anstieg der PPF<sub>1</sub>-Akkumulation blieb in den *lsd1*-Pflanzen hinter dem Konzentrationsanstieg in *WS* zurück. Die ermittelten Ergebnisse deuten darauf hin, dass der genetische Defekt in *lsd1*, zumindest unter den gewählten Versuchsbedingungen, nicht zu einer verstärkten enzymatischen sowie nicht-enzymatischen Lipidperoxidation während der inkompatiblen Interaktion führt.

*atrboh*-Pflanzen bilden während der inkompatiblen Interaktion mit *Pst avrRPM1* (10<sup>6</sup> Kolonie-bildende Einheiten/ml) schwächere Symptome einer HR aus, als Pflanzen des Wildtyps *Col-0* (Torres *et al.*, 2002). Bei der Untersuchung der OH-FS und PPF<sub>1</sub>-Konzentrationen in

*atrbohD*- und *atrbohF*-Mutanten während der inkompatiblen Interaktion sollten theoretisch geringere Gehalte im Vergleich zu Pflanzen des Wildtyps *Col-0* nachweisbar sein, da in *atrboh* die ROS-Bildung im Vergleich zu Pflanzen des Wildtyps verringert ist (Torres und Dangl, 2002). *atrboh*-Mutanten besitzen einen Defekt im NADPH-Oxidase-Komplex, aus dem eine verringerte Fähigkeit zur  $O_2^{\bullet-}$ -Bildung und damit auch zur Bildung von weiteren ROS wie  $H_2O_2$  sowie  $\cdot OH$  resultiert (siehe I.3). Im durchgeführten Experiment wurde, 48 h nach Infektion der Pflanzen mit *Pst avrRPM1*, eine schwächere Entstehung aller untersuchten OH-FS (8-,9-,10-,11-, 12-, 13-, 15- und 16-OH-FS) in *atrboh* im Vergleich zu *Col-0* ermittelt. Die geringere Akkumulation aller OH-FS, unabhängig vom ihrem Bildungsweg, deutet auf eine geringere enzymatische Biosynthese und auch auf eine geringere OH-FS-Entstehung über nicht-enzymatische Bildungswege in *atrboh* hin. Die Konzentrationsanstiege von  $PPF_1$  während der Pathogenese waren in den Mutanten und im Wildtyp nahezu gleich hoch. Da 12- und 13-HPOTE sowohl die Vorstufen von 12- und 13-OH-FS sowie von  $PPF_1$  darstellen, wurde dieses Ergebnis nicht erwartet, zumal bei zuvor durchgeführten Experimenten an *Col-0* nach *Pst*-Behandlung parallel verlaufende Konzentrationsanstiege von OH-FS und  $PPF_1$  (siehe IV.4) nachgewiesen wurden. Möglicherweise hat der Defekt in *atrboh* auch einen Einfluss auf die Hydroperoxid-Reduktase und damit auf die Entstehung von OH-FS aus Hydroperoxy-Fettsäuren. Neben der geringeren Entstehung von 12- und 13-OH-FS könnte so die Bildung höher oxidierten Substanzen aus 12- und 13-HPOTE, wie z.B. von Phytoprostanen, erklärt werden. In beiden *atrboh*-Mutanten, *atrbohD* sowie *atrbohF*, wurden zudem um das 3- bis 8-fach höhere basale OH-FS-Konzentrationen nachgewiesen als in *Col-0*. Die basalen OH-FS-Konzentrationen deuten darauf hin, dass der Defekt in gesunden, ungestressten *atrboh*-Pflanzen eine verstärkte Synthese aller OH-FS im Vergleich zu *Col-0*-Pflanzen zur Folge hat, unabhängig von deren Bildungsweg. Andererseits könnte in *atrboh* eine verringerte Metabolisierung oder Weiterreaktion von OH-FS im Vergleich zu Pflanzen des Wildtyps erfolgen. Für eine weniger ausgeprägte Weiterreaktion von OH-FS zu höher oxidierten Oxylipinen wie z.B.  $PPF_1$  würde sprechen, dass die  $PPF_1$ -Konzentrationen in *atrboh* und *Col-0* zu Versuchsbeginn in einer ähnlichen Größenordnung waren. Die Untersuchungen an *A. thaliana*-Mutanten wurden an jeweils einer Pflanzen-Charge durchgeführt, die jeweils zweifach aufgearbeitet wurde. Die ermittelten Ergebnisse sollten demzufolge noch durch eine Wiederholung der Experimente an einer zweiten Pflanzen-Charge bestätigt werden.

OH-FS und  $PPF_1$  stellen verlässliche Marker einer nicht-enzymatischen Lipidperoxidation dar. Die Bestimmung von regioisomeren OH-FS ermöglicht zudem die Differenzierung in einen enzymatischen, einen Photo-oxidativen und einen durch freie Radikale katalysierten Bildungsweg. Eine zukünftige Bestätigung obiger Ergebnisse durch weitere Versuche und

die Beurteilung anderer Mutanten von *A. thaliana* anhand der Bestimmung von OH-FS und PPF<sub>1</sub> könnte zum Verständnis beitragen, welche RO-Spezies während der Pathogen-Interaktion von Bedeutung sind. So wäre eine Aufklärung von Funktionen nicht-enzymatisch gebildeter Oxylipine im Rahmen der Verteidigungsantwort denkbar. Die Untersuchung von *dnd1* (engl.: defense with no HR cell death) wäre beispielsweise interessant, da *dnd1* nach der Infektion durch *Pst* avrRPM1 keine HR und keinen Pathogen-induzierten Zelltod zeigt, dagegen aber konstitutiv stark erhöhte SA-Konzentrationen sowie eine erhöhte Resistenz gegenüber einem breiten Spektrum von Pathogenen besitzt (Yu, *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 2000). Die Entkoppelung des Zelltods von der Abwehr in *dnd1* müsste dahingehend untersucht werden, ob bei verringertem Zelltod demzufolge auch geringere Spiegel an ROS nachweisbar wären.

## VI. Zusammenfassung

Phytoprostane (PP) und Hydroxy-Fettsäuren (OH-FS) werden *in vivo* und *in vitro* durch eine Radikal-katalysierte Peroxidation von  $\alpha$ -Linolensäure gebildet. OH-FS können darüber hinaus auch enzymatisch gebildet werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Entstehung dieser Oxylipine sowohl in der kompatiblen als auch in der inkompatiblen Interaktion von *A. thaliana* mit *P. syringae* nach Kälteeinwirkung, in Abhängigkeit von der Lichtstärke bei der Pflanzenanzucht sowie in Mutanten von *A. thaliana* untersucht.

Die folgenden Ergebnisse wurden ermittelt:

1. OH-FS wurden *in vitro* hergestellt, um als Standardsubstanzen zur gaschromatographischen Identifizierung von OH-FS in Pflanzenmaterial eingesetzt zu werden. Dabei wurden 9- und 13-HODE aus Linolsäure sowie 9- und 13-HOTE aus  $\alpha$ -Linolensäure mittels LOX gewonnen. Durch Autoxidation von Linol- und  $\alpha$ -Linolensäure wurden 9- und 13-HODE sowie 9-, 12-, 13- und 16-HOTE hergestellt. Als interner Standard für die Konzentrationsbestimmung von OH-FS in *A. thaliana* wurde 15(S)-HETE gewählt, da diese OH-FS endogen nicht in Pflanzen vorkommt. 15(S)-HETE wurde durch Umsetzung von Arachidonsäure mit LOX gewonnen. Eine Aufreinigung der OH-FS erfolgte mittels DC oder wahlweise mit RP-HPLC, die präparative Isolierung der Regioisomere wurde mit NP-HPLC durchgeführt.
2. Für die Untersuchung der Oxylipin-Gehalte in *A. thaliana* wurden der virulente *Pst*-Stamm DC3000 sowie der avirulente Stamm *avrRPM1* verwendet, um die kompatible Interaktion mit der inkompatiblen Interaktion vergleichen zu können. Die Konzentrationen der Oxylipine sowie SA wurden innerhalb einer Versuchsdauer von 60 h verfolgt. Dabei wurden PPF<sub>1</sub> sowie 12- und 16-OH-FS, als Vertreter der nicht-enzymatisch entstandenen Oxylipine, 9- und 13-OH-FS, sowohl als enzymatisch als auch nicht-enzymatisch entstandene Oxylipine, sowie JA und deren Vorstufe OPDA als enzymatisch gebildete Phytohormone untersucht. Es wurden monophasische Konzentrationsanstiege, bei allen untersuchten Substanzen, in der kompatiblen Interaktion ermittelt, wohingegen die Konzentrationsanstiege in der inkompatiblen Interaktion biphasisch waren. In beiden Interaktionen wurden nach 48 bis 60 h Konzentrationsmaxima der freien sowie der veresterten OH-FS und PPF<sub>1</sub> nachgewiesen, ein früher Konzentrationsanstieg nach 5 bis 10 h konnte ausschließlich in der inkompatiblen Interaktion ermittelt werden. Die gleichzeitige Akkumulation von 9-, 10-, 12-, 13-, 15- und 16-OH-FS und PPF<sub>1</sub> deutet auf eine parallel ablaufende Oxylipin-Synthese durch enzymatische, Photo-oxidative und über

freie Radikale vermittelte Prozesse hin. Die Akkumulation veresterter OH-FS und PPF<sub>1</sub> erfolgte in beiden Interaktionen 5 bis 12 h früher als die Konzentrationsanstiege der freien OH-FS und PPF<sub>1</sub>. Die Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass nicht-enzymatische Oxylipine in Membranen gebildet werden können und anschließend vermutlich durch eine Lipase frei gesetzt werden.

In der inkompatiblen Interaktion konnte ein erstes frühes Konzentrationsmaximum von JA und OPDA nach 5 h beobachtet werden, während späte Maxima in beiden Interaktionen nach 24 bis 36 h erfolgten. Somit akkumulierten die OH-FS und PPF<sub>1</sub> in der inkompatiblen Interaktion zeitgleich mit den Jasmonaten nach 5 h.

3. Bei einer Kälteexposition von *A. thaliana* bei 4°C über 2 h wurde jeweils ein 3,3-facher Konzentrationsanstieg der freien und der veresterten enzymatisch gebildeten 13-OH-FS nachgewiesen. Darüberhinaus wurde ein 4,6-facher Anstieg der enzymatisch entstandenen 9-OH-FS ermittelt. Die nicht-enzymatisch gebildeten 12- und 16-OH-FS zeigten dagegen keine signifikanten Konzentrationsanstiege über die basalen Konzentrationen hinaus. Die angewendeten Stressbedingungen bewirken demnach ausschließlich eine enzymatische Bildung von OH-FS in *A. thaliana*.
4. Zur Untersuchung der OH-FS-Synthese in der inkompatiblen Interaktion in Abhängigkeit von der bei der Pflanzenanzucht eingesetzten Lichtstärke wurden *A. thaliana* bei Licht und in Dunkelheit mit *Pst avrRPM1* infiziert. Nach 10 h wurde eine 1,1- bis 3,7-fach stärkere Bildung der freien sowie eine 2,0- bis 3,4-fach stärkere Akkumulation der veresterten 9-, 10-, 12-, 13-, 15- und 16-OH-FS bei den Pflanzen ermittelt, die bei Licht angezogen wurden. Die Lichtintensität, der Pflanzen während der Infektion mit *Pst* ausgesetzt sind, hat demnach große Bedeutung für die Entstehung enzymatisch und nicht-enzymatisch gebildeter OH-FS. Ein 4,9-facher Anstieg veresterter 15-OH-FS, ein Marker für eine photooxidative OH-FS-Entstehung, auch bei Dunkelheit widersprach der Hypothese, dass 15-OH-FS ohne Lichteinwirkung nicht gebildet werden können und deutet auf eine bisher unbekannte Licht-unabhängige Entstehung von <sup>1</sup>O<sub>2</sub> bzw. von 15-OH-FS hin.
5. Die Bestimmung von OH-FS in Blättern und Wurzeln von unbehandelten *A. thaliana*-Pflanzen ergab eine 13- bis 31-fach höhere Konzentration veresterter 9-, 10-, 12-, 13- und 16-OH-FS in den Blättern. Darüberhinaus wurde eine 111-fach höhere Konzentration von veresterten 15-OH-FS in Blättern im Vergleich zu Wurzeln nachgewiesen. 15-OH-FS wurden als selektiver Marker für eine Photo-oxidative OH-FS-Bildung durch <sup>1</sup>O<sub>2</sub> verwendet. Mit 0,57 µg/g TG kommt 15-OH-FS allerdings auch im Wurzelgewebe vor, was einen Hinweis darauf darstellt, dass neben einem Licht-abhängigen Hauptweg auch

ein Licht-unabhängiger Entstehungsmechanismus von 15-OH-FS bzw.  $^1\text{O}_2$  existiert. Alternativ wäre es denkbar, dass ein Transport von 15-OH-FS von den Blättern in die Wurzeln stattfindet.

6. Eine Untersuchung der Gehalte an OH-FS und  $\text{PPF}_1$  in *NahG*-, *lsd1*-, *atrbohD*- und *atrbohF*-Mutanten ergab 48 h nach Infiltration von *Pst avrRPM1* keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den Pflanzen des jeweiligen Wildtyps *Col-0* und *WS*. Unter den gewählten Versuchsbedingungen bewirken die genetischen Defekte der untersuchten Mutanten keine veränderte Akkumulation enzymatisch sowie nicht-enzymatisch gebildeter Oxylipine.



## VII. Summary

Phytosteranes (PP) are formed *in vivo* and *in vitro* by free radical-catalyzed peroxidation of  $\alpha$ -linolenic acid. In contrast, hydroxy-fatty acids (OH-FA) can be formed both, enzymatically and non-enzymatically. In the present thesis the synthesis of these oxylipins was investigated under different conditions; in compatible and incompatible interaction of *A. thaliana* with the pathogen *P. syringae*, as responses to changes of temperature and light and in incompatible interaction in *A. thaliana*-mutants.

The following results were obtained:

1. To obtain reference-substances for the identification of OH-FA in plant material by GC-MS, OH-FA were made *in vitro*. 9- and 13-hydroxy-octadecadienoic acids were formed from linoleic acid, 9- and 13-hydroxy-octadecatrienoic acids from  $\alpha$ -linolenic acid by LOX-catalyzed reaction. 9- and 13-hydroxy-octadecadienoic acids and 9-, 12-, 13- and 16-hydroxy-octadecatrienoic acids were prepared by autooxidation of linoleic and  $\alpha$ -linolenic acid respectively. Since endogenous 15(S)-hydroxy-eicosatetraenoic acid could not be found in plants, it was chosen as an internal standard for the determination of OH-FA concentrations in *A. thaliana* and was prepared enzymatically from arachidonic acid. From the crude extraction mixture OH-FA were purified either by thin layer chromatography or RP-HPLC. The subsequent isolation of regioisomers was realized by preparative SP-HPLC.
2. In order to compare the concentrations of oxylipins in *A. thaliana* during compatible and incompatible interaction, a virulent *Pst*-strain DC3000 and an avirulent strain *avrRPM1* were utilized. The concentrations of oxylipins and salicylic acid were investigated within 60 h after inoculation. F<sub>1</sub>-phytosteranes, 12- and 16-OH-FA were used as markers for non-enzymatically formed oxylipins. Concentrations of 9- and 13-OH-FA, either enzymatically or non-enzymatically formed, were measured as well as phytohormones, jasmonic acid and its precursor 12-oxo-phytodienoic acid. Within the compatible interaction an increase of the amount of all measured compounds was observed. In contrast, during incompatible interaction the increases of all measured substances was separated into two phases. In both interactions, free and esterified OH-FA- and PPF<sub>1</sub>-concentrations exhibited maxima after 48 to 60 h, an early increase after 5 to 10 h was exclusively found in the incompatible interaction. The concurrent accumulation of 9-, 10-, 12-, 13-, 15- und 16-OH-FA und PPF<sub>1</sub> indicates that enzymatically, Photo-oxidative, and free-radical catalyzed synthesis of oxylipins takes place simultaneously. In both

interactions the accumulation of esterified OH-FA and PPF<sub>1</sub> occurred 5 - 12 h earlier than the increase of the concentrations of free OH-FA and PPF<sub>1</sub>. These results confirm the hypothesis that oxylipins are formed non-enzymatically from lipids inside cell membranes and are subsequently released by lipases.

An early increase of JA- and OPDA-concentrations after 5 h was found in the incompatible interaction, while late maxima occurred in both interactions after 24 to 36 h. Therefore, OH-FA- and PPF<sub>1</sub>-accumulation took place at the same time as the increase of jasmonates after 5 h.

3. When *A. thaliana* plants were chilled for 2 h at 4°C an 3,3-fold increased formation of both, the enzymatically formed free and esterified 13-OH-FA was detected. The amount of enzymatically formed free 9-OH-FA increased 4,6-fold. In contrast, the amount of non-enzymatically formed 12- and 16-OH-FA did not increase significantly indicating that the applied mild stress conditions triggered exclusively enzymatical OH-FA-formation.
4. In order to get information about OH-FA-formation with regard to light intensity *A. thaliana* was infected by *Pst avrRPM1* and cultivated either in the dark or in the light. When plants were cultivated in the light after 10 h an 1,1- to 3,7- fold increased formation of free and an 2,0- to 3,4-fold increased accumulation of esterified 9-, 10-, 12-, 13-, 15- und 16-OH-FA could be detected. Therefore, the light intensity during an infection with *Pst avrRPM1* is an important factor for the formation of enzymatically as well as non-enzymatically formed OH-FA *in planta*. The 4,9-fold increase of esterified 15-OH-FA (a marker for photooxidative formation of OH-FA) in the dark contradicted the hypothesis that its formation is impossible without the impact of light. In contrast the accumulation of 15-OH-FA in the dark points to a light-independent <sup>1</sup>O<sub>2</sub>- and subsequent 15-OH-FA-formation by a so far unknown mechanism.
5. Determination of the concentrations of OH-FA in leaves and roots of untreated plants of *A. thaliana* showed 13- to 31-fold higher amounts of esterified 9-,10-, 12-, 13 und 16-OH-FA in the leaves. Moreover, the amounts of esterified 15-OH-FA exceeded in leaves by the factor 111 in comparison to roots. 15-OH-FA was used as a selective marker for Photooxidative formation of OH-FA by <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Though, 15-OH-FA occurred to an amount of 0,57 µg/g (dry weight) in roots as well. This indicates that, apart from an primarily used light depending mechanism, a second path for the formation of 15-OH-FA respectively <sup>1</sup>O<sub>2</sub> exists which does not depend on light strength. An alternative explanation could be the transport of 15-OH-FA from leaves to roots.

6. Compared to the wildtype plants no significant differences in the increase of OH-FA and PPF<sub>1</sub> could be detected in *NahG*-, *Isd1*-, *atrbohD* and *atrbohF*-mutants 48 h after infiltration of *Pst avrRPM1*. Under the utilized conditions the genetic defects of the analyzed mutants did not cause a modified accumulation of both, enzymatically and not enzymatically formed oxylipins.

## VIII. Anhang

Mittelwerte und Standardabweichungen zu IV.5. Berechnung auf das Trockengewicht [ $\mu\text{g/g}$ ]

Freie OH-FS (Dunkelheit)					Freie OH-FS (Licht)				
Zeit [h]	0	5	10	24	Zeit [h]	0	5	10	24
9-OH-FS	5,0±0,5	13,9±6,8	37,0±31,8	14,6±0,4	9-OH-FS	20,3±0,3	27,0±7,4	64,5±13,2	11,6±1,8
10-OH-FS	7,3±0,7	15,6±4,2	39,3±37	13,7±1,0	10-OH-FS	21,8±0,9	24,7±0,4	40,9±2,7	11,9±2,1
12-OH-FS	0,9±0,1	8,0±7,8	11,8±7,4	4,8±3,3	12-OH-FS	10,5±0,5	14,0±1,1	29,6±0,4	6,2±3,3
13-OH-FS	5,0±1,2	17,6±15,5	30,9±11	14,8±9,9	13-OH-FS	23,5±5,2	52,2±31,7	112,7±19,7	14,2±3,1
15-OH-FS	0,1±n.d.	4,8±5,2	3,9±0,5	2,4±2,6	15-OH-FS	5,6±0,1	6,4±1,0	12,3±1,0	2,7±2,1
16-OH-FS	0,2±n.d.	7,8±10,2	5,7±0,8	3,8±4,3	16-OH-FS	8,7±1,2	10,6±1,9	15,2±4,3	4,4±3,4
Veresterte OH-FS (Dunkelheit)					Veresterte OH-FS (Licht)				
Zeit [h]	0	5	10	24	Zeit [h]	0	5	10	24
9-OH-FS	37,7±14,1	79,0±24,9	94,7±34,3	14,8±12,9	9-OH-FS	20,9±8,9	242,6±7,4	183,9±33,7	115,4±27,6
10-OH-FS	23,0±2,3	59,4±29,2	56,5±46,4	3,0±7,9	10-OH-FS	4,7±8,0	191,9±0,8	181,4±73,7	73,5±3,1
12-OH-FS	20,4±6,3	65,7±26,4	80,8±35,5	7,4±5,0	12-OH-FS	13,7±3,5	182,1±1,3	171,8±76,8	50,0±7,0
13-OH-FS	53,5±2,1	150,6±15,6	194,1±51,5	55,9±10,2	13-OH-FS	50,1±6,4	338,3±31,7	390,5±26,2	251,0±70,9
15-OH-FS	9,2±1,8	31,6±18,2	37,9±19,7	2,8±4,0	15-OH-FS	6,6±2,7	90,7±1,0	127,2±63,3	23,9±7,4
16-OH-FS	20,3±8,1	64,9±43,2	83,5±38	11,4±6,6	16-OH-FS	16,5±1,6	171,2±2,0	212,3±104,6	53,7±24,7

**IX. Literaturverzeichnis**

- Agrios, G.N.** (1997). Plant pathol. Academic press, 4th edition.
- Alfano, J.R. und Collmer, A.** (1997). The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, avr proteins, and death. *J. Bacteriol.* 179, 5655-5662.
- Alfano, J.R. und Collmer, A.** (2004). Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42, 385-414.
- Alvarez, M.E.** (2000). Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Mol. Biol.* 44, 429-442.
- Alvarez, M.E., Pennell, R.I., Meijer, P.J., Ishikawa, A., Dixon, R.A. und Lamb, C.** (1998). Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* 92, 773-784.
- Anderson, J.P., Thatcher, L.F. und Singh, K.B.** (2005). Plant defence responses: conservation between models and crops. *Funct. Plant Biol.* 32, 21-34.
- Apel, K. und Hirt, H.** (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 373-399.
- Asada, K.** (1994). Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In: Foyer C.H., Mullineaux P.M. (Hrsg.) Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants. CRC Press Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, 77-104.
- Asada, K.** (1999). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 601-639.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.-L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F.M. und Sheen, J.** (2002). MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* 415, 977-983.
- Balboa, M.A., Balsinde, J., Winstead, M.V., Tischfield, J. und Dennis, E.** (1996). Novel group V phospholipase A<sub>2</sub> involved in arachidonic acid mobilization in murine P388D1 macrophages. *J. Biol. Chem.* 271, 32381-32384.
- Bent, A.F.** (1996). Plant disease resistance genes: funktion meets structure. *Plant Cell* 8, 1757-1771.
- Berger, S., Bell, E. und Mullet, J.E.** (1996). Two methyl jasmonate-insensitive mutants show altered expression of AtVsp in response to methyl jasmonate and wounding. *Plant Physiol.* 111, 525-531.
- Berger, S., Weichert, H., Porzel, A., Wasternack, C., Kuhn, H. und Feussner, I.** (2001). Enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation in leaf development. *Biochim. Biophys. Acta.* 1533, 266-276.
- Berry, H., Debat, H. und Garde, V.L.** (1998). Oxygen concentration determines regiospecificity in soybean lipoxygenase-1 reaction via a branched kinetic scheme. *J. Biol. Chem.* 273, 2769-2776.
- Blee, E.** (1998). Phytooxylipins and plant defense reactions. *Prog. Lipid Res.* 37, 33-72.
- Blee, E.** (2002). Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends Plant Sci.* 7, 315-322.
- Blight, E.G. und Dyer, W.J.** (1959). A rapid method of total lipid extraktion and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917.

- Block, A., Schmelz, E., Jones, J.B. und Klee, H.J.** (2005). Coronatine and salicylic acid: the battle between *Arabidopsis* and *Pseudomonas* for phytohormone control. *Mol. Plant Pathol.* 6, 79-83.
- Bonas, U. und van den Ackerveken, G.** (1999). Gene-for-gene interactions: bacterial avirulence proteins specify plant disease resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 94-98.
- Bowler, C., van Camp, W., van Montagu, M. und Inzé, D.** (1994). Superoxide dismutase in plants. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 13, 199-218.
- Bowling, S.A., Clarke, J.D., Liu, Y., Klessig, D.F. und Dong, X.** (1997). The *cpr5* mutant of *Arabidopsis* expresses both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance. *Plant Cell* 9, 1573-1584.
- Buchanan, B., Grisse, W. und Jones, R.** (2000). *Biochem. Mol. Biol. Plants*, 1102ff.
- Capelli, N., Diogon, T., Greppin, H. und Simon, P.** (1997). Isolation and characterization of a cDNA clone encoding an osmotin-like protein from *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 191, 51-56.
- Chang, C. und Shockey, J.A.** (1999). The ethylene-response pathway: signal perception to gene regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 352-358.
- Chen, Y.L., Huang, R., Xiao, Y.M., Lu, P., Chen, J. und Wang, X.C.** (2004). Extracellular calmodulin-induced stomatal closure is mediated by heterotrimeric G protein and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Plant Physiol.* 136, 4096-4103.
- Cohn, J., Sessa, G. und Martin, G.B.** (2001). Innate immunity in plants. *Curr. Opin. Immunol.* 13, 55-62.
- Creelman, R. und Mullet, J.** (1995). Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *PNAS* 92, 4114-4119.
- Cueto, M., Hernandez-Perera, O., Martin, R., Bentura, M.L., Rodrigo, J., Lamas, S. und Golvano, M.P.** (1996). Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*. *FEBS Lett.* 398, 159-164.
- Dangl, J.L. und Jones, J.D.** (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411, 826-833.
- Dangl, J.L., Dietrich, R.A. und Richberg, M.H.** (1996). Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* 8, 1793-1807.
- de Vos, M., van Oosten, V.R., van Poecke, R.M., van Pelt, J.A., Pozo, M.J., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Metraux, J.P., van Loon, L.C., Dicke, M. und Pieterse, C.M.** (2005). Signal signature and transcriptome changes of *Arabidopsis* during pathogen and insect attack. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18, 923-937.
- de Wit, P.J.G.M.** (1997). Pathogen avirulence and plant resistance: a key role for recognition. *Trends Plant Sci* 2, 452-458.
- Delaney, T.P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T. Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, E. und Ryals, J.** (1994). A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* 266, 1247-1250.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R.A. und Lamb, C.** (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394, 585-588.
- Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A. und Lamb, C.** (2001). Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 13454-13459.

- Delp, G. und Palva, E.T.** (1999). A novel flower-specific *Arabidopsis* gene related to both pathogen-induced and developmentally regulated plant beta-1,3-glucanase genes. *Plant Mol. Biol.* 39, 565-575.
- Dempsey, D.A. und Klessig, D.F.** (1994). Salicylic acid, active oxygen species and systemic acquired resistance in plants. *Trends Cell Biol.* 4, 334-338.
- Dennis, E.A.** (1997). The growing phospholipase A<sub>2</sub> superfamily of signal transduction enzymes. *Trends Biochem. Sci.* 22, 1-2.
- Dietrich, R.A., Richberg, M.H., Schmidt, R., Dean, C. und Dangl, J.L.** (1997). A novel zinc finger protein is encoded by the *Arabidopsis* *Isd1* gene and functions as a negative regulator of plant cell death. *Cell* 88, 685-694.
- Dietrich, R.A., Delaney, T.P., Uknes, S.J., Ward, E.R., Ryals, J.A. und Dangl, J.L.** (1994). *Arabidopsis* mutants simulating disease resistance response. *Cell* 77, 565-577.
- Dixon, R.A.** (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411, 843-847.
- Dong, X.** (1998). SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 316-323.
- Dudda, A., Spiteller, G. und Kobelt, F.** (1996). Lipid oxidation products in ischemic porcine heart tissue. *Chem. Phys. Lipids* 82, 39-51.
- Durner, J. und Klessig, D.F.** (1999). Nitric oxide as a signal in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 369-374.
- Edge, R., McGarvey, D.J. und Truscott, T.G.** (1997). The carotenoids as anti-oxidants-a review. *Biology* 41, 189-200.
- El Fangour, S., Guy, A., Despres, V., Vidal, J., Rossi, J. und Durand, T.** (2004). Total synthesis of the eight diastereomers of the syn-anti-syn phytoprostanes F<sub>1</sub> types I and II. *J. Org. Chem.* 69, 2498 -2503.
- Ellis, J. und Jones, D.** (1998). Structure and function of proteins controlling strainspecific pathogen resistance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 288-293.
- Ettre, L.S., Hinshaw, J.V. und Rohrschneider, L.** (1996). Grundbegriffe und Gleichungen der Gaschromatographie, 130-131.
- Farmer, E., Moloshok, T., Saxton, M. und Ryan, C.** (1991). Oligosaccharide signaling in plants. Specificity of oligouronide- enhanced plasma membrane protein phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 266, 3140-3145.
- Farmer, E.E. und Ryan, C.A.** (1992). Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* 4, 129-134.
- Felix, G., Duran, J.D., Volko, S. und Boller, T.** (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.* 18, 265-276.
- Feussner, I. und Wasternack, C.** (2002). The lipoxygenase pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 275-297.
- Feys, B.J. und Parker, J.E.** (2000). Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends Genet.* 16, 449-455.
- Fink, W., Liefland, M. und Engden, K.** (1990). Comparison of various stress responses in oat in compatible and nonhost resistant interactions with rust fungi. *Physiol. Mol. Plant.* 37, 309-321.
- Flor, H.H.** (1971). Current status of gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9, 275-296.

- Foyer, C. und Harbinson, J.** (1994). Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. In CH Foyer, PM Mullineaux, eds, Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants. CRC Press, London, UK, 1-42.
- Foyer, C.H., Parry, M. und Noctor, G.** (2003). Markers and signals associated with nitrogen assimilation in higher plants. *J. Exp. Bot.* 54, 585-593.
- Frankel, E.N.** (1998). Lipid Oxidation. The Oily Press LTD, Dundee, Scotland 10, 8-54.
- Frankel, E.N., Neff, W.E., Rohwedder, W.K., Khambay, B.P., Garwood, R.F. und Weedon, B.C.** (1977). Analysis of autoxidized fats by gas chromatography-mass spectrometry: II. Methyl linoleate. *Lipids* 12, 908-913.
- Gardner, H.W.** (1989). Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. *Free Radic. Biol. Med.* 7, 65-86.
- Geerts, A., Feltkamp, D. und Rosahl, S.** (1994). Expression of lipoxygenase in wounded tubers of *Solanum tuberosum* L. *Plant Physiol.* 105, 269-277.
- Genoud, T. und Metraux, J.-P.** (1999). Crosstalk in plant cell signaling: structure and function of the genetic network. *Trends Plant Sci.* 4, 503-507.
- Genoud, T., Buchala, A.J., Chua, N.-H. und Metraux, J.-P.** (2002). Phytochrome signalling modulates the SA-perceptive pathway in *Arabidopsis*. *Plant J.* 31, 87-95.
- Glazebrook, J.** (1999). Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 280-286.
- Göbel, C., Feussner, I. und Rosahl, S.** (2003). Lipid peroxidation during the hypersensitive response in potato in the absence of 9-lipoxygenases. *J. Biol. Chem.* 278, 52834-52840.
- Göbel, C., Feussner, I., Schmidt, A., Scheel, D., Sanchez-Serrano, J., Hamberg, M. und Rosahl, S.** (2001). Oxylipin profiling reveals the preferential stimulation of the 9-lipoxygenase pathway in elicitor-treated potato cells. *J. Biol. Chem.* 276, 6267-6273.
- Gomez-Gomez, L.** (2004). Plant perception systems for pathogen recognition and defence. *Mol. Immunol.* 41, 1055-1062.
- Graff, G., Anderson, L.A. und Jaques, L.W.** (1990). Preparation and purification of soybean lipoxygenase-derived unsaturated hydroperoxy and hydroxy fatty acids and determination of molar absorptivities of hydroxy fatty acids. *Anal. Biochem.* 188, 38-47.
- Grant, M. und Mansfield, J.** (1999). Early events in host-pathogen interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 312-319.
- Griffiths, G., Leverentz, M., Silkowski, H., Gill, N. und Sanchez-Serrano, J.J.** (2000). Lipid hydroperoxide levels in plant tissues. *J. Exp. Bot.* 51, 1363-1370.
- Groom, Q.J., Torres, M.A., Fordham-Skelton, A.P., Hammond-Kosack, K.E., Robinson, N.J. und Jones, J.D.** (1996). *rbohA*, a rice homologue of the mammalian gp91<sup>phox</sup> respiratory burst oxidase gene. *Plant J.* 10, 515-522.
- Gundlach, H., Muller, M., Kutchan, T. und Zenk, M.** (1992). Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *PNAS* 89, 2389-2393.
- Gutteridge, J.M. und Halliwell, B.** (1990). The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem. Sci.* 15, 129-135.
- Haber, F. und Willstätter, R.** (1931). Unpaarigkeit und Radikalketten im Reaktions-Mechanismus organischer und enzymatischer Vorgänge. *Chem. Ber.* 64, 2844-2856.
- Haber, F. und Weiss, J.** (1934). The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc. R. Soc. London, Ser. A.* 147, 332-351.



- Halliwell, B. und Gutteridge, J.M.C.** (1989). Iron toxicity and oxygen radicals. *Baillieres Clin. Haematol.* 2, 195-256.
- Halliwell, B. und Gutteridge, J.M.C.** (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic. Biol. Med.* 18, 125-126.
- Hamberg, M., Sanz, A., Rodriguez, M.J., Calvo, A.P. und Castresana, C.** (2003). Activation of the fatty acid  $\alpha$ -dioxygenase pathway during bacterial infection of tobacco leaves: formation of oxylipins protecting against cell death. *J. Biol. Chem.* 278, 51796-51805.
- Hammerschmidt, R.** (1999). Phytoalexins: what have we learned after 60 years? *Annu. Rev. Phytopathol.* 37, 285-306.
- Hammond-Kosack, K.E. und Jones, J.D.** (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8, 1773-1791.
- Heath, M.C.** (2000a). Hypersensitive response-related death. *Plant Mol. Biol.* 44, 321-334.
- Heath, M.C.** (2000b). Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 315-319.
- Heck, S., Grau, T., Buchala, A., Metraux, J.-P. und Nawrath, C.** (2003). Genetic evidence that expression of *NahG* modifies defence pathways independent of salicylic acid biosynthesis in the *Arabidopsis-Pseudomonas syringae* pv. *tomato* interaction. *Plant J.* 36, 342-352.
- Hirt, H.** (2000). Connecting oxidative stress, auxin, and cell cycle regulation through a plant mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 2405-2407.
- Howe, G.A. und Schillmiller, A.L.** (2002). Oxylipin metabolism in response to stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 230-236.
- Hu, X. und Reddy, A.S.** (1997). Cloning and expression of a PR5-like protein from *Arabidopsis*: inhibition of fungal growth by bacterially expressed protein. *Plant Mol. Biol.* 6, 949-959.
- Huang, X., Stettmaier, K., Michel, C., Hutzler, P., Mueller, M. und Durner, J.** (2004). Nitric oxide is induced by wounding and influences jasmonic acid signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 218, 938-946.
- Imbusch, R.** (2001). Phytoprostane  $F_1$  -eine neue Klasse Prostaglandin-ähnlicher Verbindungen in Pflanzen. Dissertation. Julius-Maximilians-Universität-Würzburg.
- Imbusch, R. und Mueller, M.J.** (2000a). Formation of isoprostane  $F_2$ -like compounds (phytoprostanes  $F_1$ ) from  $\alpha$ -linolenic acid in plants. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 720-726.
- Imbusch, R. und Mueller, M.J.** (2000b). Analysis of oxidative stress and wound-inducible dinor isoprostanes  $F_1$  (phytoprostanes  $F_1$ ) in plants. *Plant Physiol.* 124, 1293-1304.
- Jabs, T., Dietrich, R.A. und Dangl, J.L.** (1996). Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science* 273, 1853-1856.
- Jabs, T., Tschope, M., Colling, C., Hahlbrock, K. und Scheel, D.** (1997). Elicitor-stimulated ion fluxes and  $O_2^-$  from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *PNAS* 94, 4800-4805.
- Jakab, G., Manrique, A., Zimmerli, L., Metraux, J.P. und Mauch-Mani, B.** (2003). Molecular characterization of a novel lipase-like pathogen-inducible gene family of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 132, 2230-2239.

- Jia, Y., McAdams, S.A., Bryan, G.T., Hershey, H.P. und Valent, B.** (2000). Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J.* 19, 4004-4014.
- Jones, J.D.G.** (2001). Putting knowledge of plant disease resistance genes to work. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 281-287.
- Joo, J.H., Wang, S., Chen, J.G., Jones, A.M. und Fedoroff, N.V.** (2005). Different signaling and cell death roles of heterotrimeric G protein ( $\alpha$ ) and ( $\beta$ ) subunits in the *Arabidopsis* oxidative stress response to ozone. *Plant Cell* 17, 957-970.
- Kaim, W. und Rall, J.** (1996). Kupfer - ein "modernes" Bioelement". *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 35, 43-60.
- Kauss, H.** (1985). Callose biosynthesis as a  $\text{Ca}^{2+}$ -regulated process and possible relations to the induction of other metabolic changes. *J. Cell Sci. Suppl.* 2, 89-103.
- Kawasaki, T., Henmi, K., Ono, E., Hatakeyama, S., Iwano, M., Satoh, H. und Shimamoto, K.** (1999). The small GTP-binding protein rac is a regulator of cell death in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 10922-10926.
- Keller, B.** (1993). Structural cell wall proteins. *Plant Physiol.* 101, 1127-1130.
- Keller, T., Damude, H.G., Werner, D., Doerner, P., Dixon, R.A. und Lamb, C.** (1998). A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91<sup>phox</sup> subunit gene encodes a plasma membrane protein with  $\text{Ca}^{2+}$ -binding motifs. *Plant Cell* 10, 255-266.
- Kjemtrup, S., Nimchuk, Z. und Dangl, J.L.** (2000). Effector proteins of phytopathogenic bacteria: bifunctional signals in virulence and host recognition. *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 73-78.
- Klessig, D.F., Durner, J., Noad, R., Navarre, D.A., Wendehenne, D., Kumar, D., Zhou, J.M., Shah, J., Zhang, S., Kachroo, P., Trifa, Y., Pontier, D., Lam, E. und Silva, H.** (2000). Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 8849-8855.
- Kliebenstein, D.J., Monde, R.A. und Last, R.L.** (1998). Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant Physiol.* 118, 637-650.
- Knoester, M., Pieterse, C.M., Bol, J.F. und van Loon, L.C.** (1999). Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by rhizobacteria requires ethylene-dependent signaling at the site of application. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12, 720-727.
- Koch, E., Meier, B.M., Eiben, H.G. und Slusarenko, A.** (1992). A lipoxygenase from leaves of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is induced in response to plant pathogenic pseudomonads. *Plant Physiol.* 99, 571-576.
- Kombrink, E. und Somssich, I.E.** (1995). Pathogenesis-related proteins and plant defense. In *Plant Relationships* 6, (Carroll, G. and Tudzynski, P., eds). Berlin: Springer-Verlag, 107-128.
- Krischke, M., Loeffler, C. und Mueller, M.J.** (2003). Biosynthesis of 14,15-dehydro-12-oxo-phytodienoic acid and related cyclopentenones via the phytoprostane D<sub>1</sub> pathway. *Phytochemistry* 62, 351-358.
- Kwak, J.M., Mori, I.C., Pei, Z.M., Leonhardt, N., Torres, M.A., Dangl, J.L., Bloom, R.E., Bodde, S., Jones, J.D. und Schroeder, J.I.** (2003). NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 22, 2623-2633.
- Lam, E., Kato, N. und Lawton, M.** (2001). Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 411, 848-853.

- Lamb, C. und Dixon, R.A.** (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 251-275.
- Langebartels, C., Ernst, D., Kangasjarvi, J. und Sandermann, H., Jr.** (2000). Ozone effects on plant defense. *Meth. Enzymol.* 319, 520-535.
- Laudert, D., Hennig, P., Stelmach, B.A., Muller, A., Andert, L. und Weiler, E.W.** (1997). Analysis of 12-oxo-phytodienoic acid enantiomers in biological samples by capillary gas chromatography-mass spectrometry using cyclodextrin stationary phases. *Anal. Biochem.* 246, 211-217.
- Lawton, K., Weymann, K., Friedrich, L., Vernooij, B., Uknes, S. und Ryals, J.** (1995). Systemic acquired resistance in *Arabidopsis* requires salicylic acid but not ethylene. *Mol. Plant Microbe Interact.* 8, 863-870.
- Lebel, E. und Heifetz, P.** (1998). Functional analysis of regulatory sequences controlling PR-1 gene expression in *Arabidopsis*. *Plant J.* 16, 223-233.
- Lee, H., Leon, J. und Raskin, I.** (1995). Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. *PNAS* 92, 4076-4079.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R. und Lamb, C.** (1994). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79, 583-593.
- Lewit-Bentley, A. und Rety, S.** (2000). EF-hand calcium-binding proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 637-643.
- Ligterink, W., Kroj, T., Nieden, U.z., Hirt, H. und Scheel, D.** (1997). Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. *Science* 276, 2054-2057.
- Loeffler, C., Berger, S., Guy, A., Durand, T., Bringmann, G., Dreyer, M., von Rad, U., Durner, J. und Mueller, M.J.** (2005). B<sub>1</sub>-phytoprostanes trigger plant defense and detoxification responses. *Plant Physiol.* 137, 328-340.
- Logemann, E., Parniske, M. und Hahlbrock, K.** (1995). Modes of expression and common structural features of the complete phenylalanine ammonia-lyase gene family in parsley. *PNAS* 92, 5905-5909.
- Lüttge, U., Kluge, M. und Bauer, G.** (1999). *Botanik*, 441-443.
- Marrs, K.A.** (1996). The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 127-158.
- Martin, G.B.** (1999). Functional analysis of plant disease resistance genes and their downstream effectors. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 273-279.
- Martin, G.B., Bogdanove, A.J. und Sessa, G.** (2003). Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54, 23-61.
- Martinez, C., Baccou, J.-C., Bresson, E., Baissac, Y., Daniel, J.-F., Jalloul, A., Montillet, J.-L., Geiger, J.-P., Assigbetse, K. und Nicole, M.** (2000). Salicylic acid mediated by the oxidative burst is a key molecule in local and systemic responses of cotton challenged by an avirulent race of *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum*. *Plant Physiol.* 122, 757-766.
- Mateo, A., Muhlenbock, P., Rusterucci, C., Chang, C.C.-C., Miszalski, Z., Karpinska, B., Parker, J.E., Mullineaux, P.M. und Karpinski, S.** (2004). *Lesion simulating disease 1* is required for acclimation to conditions that promote excess excitation energy. *Plant Physiol.* 136, 2818-2830.
- Mauch, F., Mauch-Mani, B., Gaille, C., Kull, B., Haas, D. und Reimmann, C.** (2001). Manipulation of salicylate content in *Arabidopsis thaliana* by the expression of an engineered bacterial salicylate synthase. *Plant J.* 25, 67-77.

- McConn, M., Creelman, R.A., Bell, E., Mullet, J.E. und Browse, J.** (1997). Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. PNAS 94, 5473-5477.
- McDowell, J.M. und Dangl, J.L.** (2000). Signal transduction in the plant immune response. Trends Biochem. Sci. 25, 79-82.
- Mehdy, M.C.** (1994). Active oxygen species in plant defense against pathogens. Plant Physiol. 105, 467-472.
- Mehdy, M.C. und Brodl, M.R.** (1998). The role of stress in regulating mRNA stability. In: Bayley-Serres J., Gallie D. R. (Hrsg.) A look beyond transcription - Mechanisms determining mRNA stability and translation in plants. ASPP Rockville, 54-63.
- Mehler, A.H.** (1951). Studies on reactions of illuminated chloroplasts. II. Stimulation and inhibition of the reaction with molecular oxygen. Arch. Biochem. Biophys. 34, 339-351.
- Metraux, J.-P.** (2001). Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. Eur. J. Plant Pathol. 107, 13-18.
- Mita, G., Gallo, A., Greco, V., Zasiura, C., Casey, R., Zacheo, G. und Santino, A.** (2001). Molecular cloning and biochemical characterization of a lipoxygenase in almond (*Prunus dulcis*) seed. Eur. J. Biochem. 268, 1500-1507.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. und Van Breusegem, F.** (2004). Reactive oxygen gene network of plants. Trends Plant Sci. 9, 490-498.
- Montillet, J.L., Cacas, J.L., Garnier, L., Montane, M.H., Douki, T., Bessoule, J.J., Polkowska-Kowalczyk, L., Maciejewska, U., Agnel, J.P., Vial, A. und Triantaphylides, C.** (2004). The upstream oxylipin profile of *Arabidopsis thaliana*: a tool to scan for oxidative stresses. Plant J. 40, 439-451.
- Montillet, J.-L., Chamnongpol, S., Rusterucci, C., Dat, J., van de Cotte, B., Agnel, J.-P., Battesti, C., Inze, D., Van Breusegem, F. und Triantaphylides, C.** (2005). Fatty acid hydroperoxides and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. Plant Physiol. 138, 1516-1526.
- Mueller, M.J.** (1998). Radically novel prostaglandins in animals and plants: the isoprostanes. Chem. Biol. 5, 323-333.
- Mueller, M.J.** (2004). Archetype signals in plants: the phytoprostanes. Curr. Opin. Plant Biol. 7, 441-448.
- Mueller, M.J. und Brodschelm, W.** (1994). Quantification of jasmonic acid by capillary gas chromatography-negative chemical ionization-mass spectrometry. Anal. Biochem. 218, 425-435.
- Mueller, M.J., Mene-Saffrane, L., Grun, C., Karg, K. und Farmer, E.E.** (2006). Oxylipin analysis methods. Plant J. 45, 472-489.
- Mur, L.A.J., Kenton, P., Atzorn, R., Miersch, O. und Wasternack, C.** (2006). The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. Plant Physiol. 140, 249-262.
- Mysore, K.S. und Ryu, C.-M.** (2004). Nonhost resistance: how much do we know? Trends Plant Sci. 9, 97-104.
- Nandi, A., Kachroo, P., Fukushige, H., Hildebrand, D.F., Klessig, D.F. und Shah, J.** (2003). Ethylene and jasmonic acid signaling affect the NPR1-independent expression of defense genes without impacting resistance to *Pseudomonas syringae* and *Peronospora parasitica* in the *Arabidopsis ssi1* mutant. Mol. Plant Microbe Interact. 16, 588-599.

- Narvaez-Vasquez, J., Florin-Christensen, J. und Ryan, C.A.** (1999). Positional specificity of a phospholipase A activity induced by wounding, systemin, and oligosaccharide elicitors in tomato leaves. *Plant Cell* 11, 2249-2260.
- Nawrath, C. und Metraux, J.P.** (1999). Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *Plant Cell* 11, 1393-1404.
- Neuenschwander, U., Vernooij, B., Friedrich, L., Uknes, S., Kessmann, H. und Ryals, J.** (1995). Is hydrogen peroxide a second messenger of salicylic acid in systemic acquired resistance? *Plant J.* 8, 227-233.
- Noctor, G. und Foyer, C.H.** (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 249-279.
- Norman-Setterblad, C., Vidal, S. und Palva, E.T.** (2000). Interacting signal pathways control defense gene expression in *Arabidopsis* in response to cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13, 430-438.
- Nürnberg, T. und Scheel, D.** (2001). Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Sci.* 6, 372-379.
- Nürnberg, T., Nennstiel, D., Jabs, T., Sacks, W.R., Hahlbrock, K. und Scheel, D.** (1994). High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell* 78, 449-460.
- op den Camp, R.G.L., Przybyla, D., Ochsenbein, C., Laloi, C., Kim, C., Danon, A., Wagner, D., Hideg, E., Gobel, C., Feussner, I., Nater, M. und Apel, K.** (2003). Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15, 2320-2332.
- Osborn, A.E.** (1996). Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* 8, 1821-1831.
- Otte, O. und Barz, W.** (2000). Characterization and oxidative in vitro cross-linking of an extensin-like protein and a proline-rich protein purified from chickpea cell walls. *Phytochemistry* 53, 1-5.
- Overmyer, K., Brosche, M. und Kangasjarvi, J.** (2003). Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends Plant Sci.* 8, 335-342.
- Palmer, H.J. und Paulson, K.E.** (1997). Reactive oxygen species and antioxidants in signal transduction and gene expression. *Nutr. Rev.* 55, 353-361.
- Parker, G.F., Williams, P.J., Butters, T.D. und Roberts, D.B.** (1991). Detection of the lipid-linked precursor oligosaccharide of N-linked protein glycosylation in *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett.* 23, 58-60.
- Paul, U.R., Holk, A. und Scherer, G.F.E.** (1998). Fatty acids and lysophospholipids as potential second messengers in auxin action. Rapid activation of phospholipase A<sub>2</sub> activity by auxin in suspension-cultured parsley and soybean cells. *Plant J.* 16, 601-611.
- Pedras, M.S.C., Okanga, F.I., Zaharia, I.L. und Khan, A.Q.** (2000). Phytoalexins from crucifers: synthesis, biosynthesis, and biotransformation. *Phytochemistry* 53, 161-176.
- Penninckx, I., Eggermont, K., Terras, F., Thomma, B., Samblanx, G., Buchala, A., Metraux, J.P., Manners, J.M. und Broekaert, W.F.** (1996). Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell* 8, 2309-2323.

- Penninckx, I.A.M.A., Thomma, B.P.H.J., Buchala, A., Metraux, J.-P. und Broekaert, W.F.** (1998). Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10, 2103-2114.
- Petnicki-Ocwieja, T., Schneider, D.J., Tam, V.C., Chancey, S.T., Shan, L., Jamir, Y., Schechter, L.M., Janes, M.D., Buell, C.R., Tang, X., Collmer, A. und Alfano, J.R.** (2002). Genomewide identification of proteins secreted by the Hrp type III protein secretion system of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *PNAS* 99, 7652-7657.
- Pfannschmidt, T.** (2003). Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes. *Trends Plant Sci.* 8, 33-41.
- Pieterse, C.M.J. und van Loon, L.C.** (1999). Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Sci.* 4, 52-58.
- Pieterse, C.M.J., van Wees, S.C.M., van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P.J. und van Loon, L.C.** (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10, 1571-1580.
- Polverari, A., Molesini, B., Pezzotti, M., Buonauro, R., Marte, M. und Delledonne, M.** (2003). Nitric oxide-mediated transcriptional changes in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16, 1094-1105.
- Preston, G.M.** (2000). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: the right pathogen, the right plant, at the right time. *Mol. Plant Pathol.* 1, 263-275.
- Quinkert, G., Adam, F. und Dürner, G.** (1982). Asymmetrische Synthese von Methyljasmonat. *Angew. Chemie* 94, 866-867.
- Quirino, B.F. und Bent, A.F.** (2003). Deciphering host and pathogen virulence: the *Arabidopsis/ Pseudomonas* interaction as a model. *Mol. Plant Pathol.* 4, 517-530.
- Rausher, M.D.** (2001). Co-evolution and plant resistance to natural enemies. *Nature* 411, 857-864.
- Reymond, P. und Farmer, E.E.** (1998). Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 404-411.
- Roberts, L.J. und Morrow, J.D.** (1999). Measurement of F<sub>2</sub>-isoprostanes as an index of oxidative stress *in vivo*. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 505-513.
- Romeis, T., Piedras, P. und Jones, J.D.G.** (2000). Resistance gene-dependent activation of a calcium-dependent protein kinase in the plant defense response. *Plant Cell* 12, 803-816.
- Rosahl, S.** (1996). Lipoxygenases in plants-their role in development and stress response. *Z. Naturforsch.* 51, 123-138.
- Roy, S., Pouenat, M.-L., Caumont, C., Cariven, C., Prevost, M.-C. und Esquerre-Tugaye, M.-T.** (1995). Phospholipase activity and phospholipid patterns in tobacco cells treated with fungal elicitor. *Plant Sci.* 107, 17-25.
- Royo, J., Vancanneyt, G., Perez, A.G., Sanz, C., Stormann, K., Rosahl, S. und Sanchez-Serrano, J.J.** (1996). Characterization of three potato lipoxygenases with distinct enzymatic activities and different organ-specific and wound-regulated expression patterns. *J. Biol. Chem.* 271, 21012-21019.
- Rusterucci, C., Aviv, D.H., Holt, B.F., III, Dangl, J.L. und Parker, J.E.** (2001). The disease resistance signaling components EDS1 and PAD4 are essential regulators of the cell death pathway controlled by LSD1 in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13, 2211-2224.
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.Y. und Hunt, M.D.** (1996). Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8, 1809-1819.

- Sagi, M. und Fluhr, R.** (2001). Superoxide production by plant homologues of the gp91<sup>phox</sup> NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol.* 126, 1281-1290.
- Salin, M.** (1987). Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. *Plant. Physiol.* 72, 681-689.
- Scheel, D.** (1998). Resistance response physiology and signal transduction. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 305-310.
- Schenk, P.M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J.P., Richmond, T., Somerville, S.C. und Manners, J.M.** (2000). Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *PNAS* 97, 11655-11660.
- Schlumbaum, A., Mauch, F., Vögeli, U. und Boller, T.** (1986). Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature* 324, 365-367.
- Schmelz, E.A., Engelberth, J., Tumlinson, J.H., Block, A. und Alborn, H.T.** (2004). The use of vapor phase extraction in metabolic profiling of phytohormones and other metabolites. *Plant J.* 39, 790-808.
- Schulze, B., Lauchli, R., Sonwa, M.M., Schmidt, A. und Boland, W.** (2006). Profiling of structurally labile oxylipins in plants by *in situ* derivatization with pentafluorobenzyl hydroxylamine. *Anal. Biochem.* 348, 269-283.
- Shah, J., Tsui, F. und Klessig, D.F.** (1997). Characterization of a salicylic acid-insensitive mutant (*sal1*) of *Arabidopsis thaliana*, identified in a selective screen utilizing the SA-inducible expression of the *tms2* gene. *Mol. Plant Microbe Interact.* 10, 69-78.
- Shah, J., Kachroo, P. und Klessig, D.F.** (1999). The *Arabidopsis ssi1* mutation restores pathogenesis-related gene expression in *npr1* plants and renders defensin gene expression salicylic acid dependent. *Plant Cell* 11, 191-206.
- Sharp, J., Albersheim, P., Ossowski, P., Pilotti, A., Garegg, P. und Lindberg, B.** (1984). Comparison of the structures and elicitor activities of a synthetic and a mycelial-wall-derived hexa(beta-D-glucopyranosyl)-D-glucitol. *J. Biol. Chem.* 259, 11341-11345.
- Shirasu, K., Nakajima, H., Rajasekhar, V.K., Dixon, R.A. und Lamb, C.** (1997). Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. *Plant Cell* 9, 261-270.
- Shulaev, V., Leon, J. und Raskin, I.** (1995). Is salicylic acid a translocated signal of systemic acquired resistance in tobacco? *Plant Cell* 7, 1691-1701.
- Siedow, J.N.** (1991). Plant lipoxygenase: Structure and function. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 145-188.
- Simon-Plas, F., Elmayan, T. und Blein, J.P.** (2002). The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *Plant J.* 31, 137-147.
- Smith-Becker, J., Marois, E., Huguet, E.J., Midland, S.L., Sims, J.J. und Keen, N.T.** (1998). Accumulation of salicylic acid and 4-hydroxybenzoic acid in phloem fluids of cucumber during systemic acquired resistance is preceded by a transient increase in phenylalanine ammonia-lyase activity in petioles and stems. *Plant Physiol.* 116, 231-238.
- Snedden, W.A. und Fromm, H.** (1998). Calmodulin, calmodulin-related proteins and plant responses to the environment. *Trends Plant Sci.* 3, 299-304.
- Somssich, I.E. und Hahlbrock, K.** (1998). Pathogen defence in plants - a paradigm of biological complexity. *Trends Plant Sci.* 3, 86-90.

- Spoel, S.H., Koornneef, A., Claessens, S.M.C., Korzelius, J.P., van Pelt, J.A., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Metraux, J.-P., Brown, R., Kazan, K., van Loon, L.C., Dong, X. und Pieterse, C.M.J.** (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* 15, 760-770.
- Staskawicz, B.J.** (2001). Genetics of plant-pathogen interactions specifying plant disease resistance. *Plant Physiol.* 125, 73-76.
- Staswick, P.E., Yuen, G.Y. und Lehman, C.C.** (1998). Jasmonate signaling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. *Plant J.* 15, 747-754.
- Stenzel, I., Hause, B., Miersch, O., Kurz, T., Maucher, H., Weichert, H., Ziegler J., Feussner, I. und Wasternack C.** (2003). Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 51, 895-911.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B. und Metraux, a.J.** (1997). Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35, 235-270.
- Stratmann, J.W. und Ryan, C.A.** (1997). Myelin basic protein kinase activity in tomato leaves is induced systemically by wounding and increases in response to systemin and oligosaccharide elicitors. *PNAS* 94, 11085-11089.
- Suzuki, H., Xia, Y., Cameron, R., Shadle, G., Blount, J., Lamb, C. und Dixon, R.A.** (2004). Signals for local and systemic responses of plants to pathogen attack. *J. Exp. Bot.* 55, 169-179.
- Tang, X., Frederick, R.D., Zhou, J., Halterman, D.A., Jia, Y. und Martin, G.B.** (1996). Initiation of plant disease resistance by physical interaction of *AvrPto* and *Pto* kinase. *Science* 274, 2060-2063.
- Tao, Y., Xie, Z., Chen, W., Glazebrook, J., Chang, H.S., Han, B., Zhu, T., Zou, G. und Katagiri, F.** (2003). Quantitative nature of *Arabidopsis* responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell* 15, 317-330.
- Tasseva, G., Davy de Virville, J., Cantrel, C., Moreau, F. und Zachowski, A.** (2004). Changes in the endoplasmic reticulum lipid properties in response to low temperature in *Brassica napus*. *Plant Physiol. Biochem.* 42, 811-822.
- Thatcher, J.S., Anderson, J.P. und Singh, K.B.** (2005). Plant defence responses: what have we learned from *Arabidopsis*? *Funct. Plant Biol.* 32, 1-19.
- Thoma, I., Krischke, M., Loeffler, C. und Mueller, M.J.** (2004). The isoprostanoid pathway in plants. *Chem. Phys. Lipids* 128, 135-148.
- Thomashow, M.F.** (1999). Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 571-599.
- Torres, M.A. und Dangl, J.L.** (2005). Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 397-403.
- Torres, M.A., Dangl, J.L. und Jones, J.D.** (2002). *Arabidopsis* gp91<sup>phox</sup> homologues *AtrbohD* and *AtrbohF* are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 517-522.
- Torres, M.A., Onouchi, H., Hamada, S., Machida, C., Hammond-Kosack, K.E. und Jones, J.D.** (1998). Six *Arabidopsis thaliana* homologues of the human respiratory burst oxidase (gp91<sup>phox</sup>). *Plant J.* 14, 365-370.
- Uknes, S.J., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dincher, S., Chandler, D., Slusarenko, A., Ward, E. und Ryals, J.** (1992). Acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 4, 645-656.



- van der Hoorn, R.A.I., de Wit, P.J.G.M. und Joosten, M.A.H.J.** (2002). Balancing selection favours guarding resistance proteins. *Trends Plant Sci.* 7, 67-71.
- van Loon, L.C.** (1997). Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *Eur. J. Plant Pathol.* 103, 753-765.
- van Loon, L.C. und van Strein, E.A.** (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Phys. Mol. Plant Pathol.* 55, 85-97.
- van Wees, S.C., Pieterse, C.M., Trijssenaar, A., van 't Westende, Y.A., Hartog, F. und van Loon, L.C.** (1997). Differential induction of systemic resistance in *Arabidopsis* by biocontrol bacteria. *Mol. Plant Microbe Interact.* 10, 716-724.
- van Wees, S.C.M., Luijendijk, M., Smoorenburg, I., van Loon, L.C. und Pieterse, C.M.J.** (1999). Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene *Atvsp* upon challenge. *Plant Mol. Biol.* 41, 537-549.
- van Wees, S.C.M., de Swart, E.A.M., van Pelt, J.A., van Loon, L.C. und Pieterse, C.M.J.** (2000). Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS* 97, 8711-8716.
- Vernooij, B., Friedrich, L., Morse, A., Reist, R., Kolditz-Jawhar, R., Ward, E., Uknes, S., Kessmann, H. und Ryals, J.** (1994). Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. *Plant Cell* 6, 959-965.
- Vigers, A.J., Roberts, W.K. und Selitrennikoff, C.P.** (1991). A new family of plant antifungal proteins. *Mol. Plant Microbe Interact.* 4, 315-323.
- Vijayan, P., Shockey, J., Levesque, C.A., Cook, R.J. und Browse, J.** (1998). A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *PNAS* 95, 7209-7214.
- Vöisey, C.R. und Slusarenko, A.** (1989). Chitinase mRNA and enzyme activity in *Phaseolus vulgaris* (L.) increase more rapidly in response to avirulent than to virulent cells of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 35, 403-412.
- Vollenweider, S., Weber, H., Stolz, S., Chetelat, A. und Farmer, E.E.** (2000). Fatty acid ketodienes and fatty acid ketotrienes: Michael addition acceptors that accumulate in wounded and diseased *Arabidopsis* leaves. *Plant J.* 24, 467-476.
- Vranova, E., Inze, D. und van Breusegem, F.** (2002). Signal transduction during oxidative stress. *J. Exp. Bot.* 53, 1227-1236.
- Wang, C., Zien, C.A., Afithile, M., Welti, R., Hildebrand, D.F. und Wang, X.** (2000). Involvement of phospholipase D in wound-induced accumulation of jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12, 2237-2246.
- Weber, H., Chetelat, A., Reymond, P. und Farmer, E.E.** (2004). Selective and powerful stress gene expression in *Arabidopsis* in response to malondialdehyde. *Plant J.* 37, 877-888.
- Weisshaar, B. und Jenkins, G.I.** (1998). Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 251-257.
- Wientjes, F.B. und Segal, A.W.** (1995). NADPH oxidase and the respiratory burst. *Cell Biol.* 6, 357-365.

- Wills, E.D.** (1965). Mechanisms of lipid peroxide formation in tissues. Role of metals and haematin proteins in the catalysis of the oxidation of unsaturated fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta* 98,238-251.
- Wojtaszek, P.** (1997). Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.* 15, 681-692.
- Wu, G., Shortt, B.J., Lawrence, E.B., Levine, E.B., Fitzsimmons, K.C. und Shah, D.M.** (1995). Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *Plant Cell* 7, 1357-1368.
- Xie, D.-X., Feys, B.F., James, S., Nieto-Rostro, M. und Turner, J.G.** (1998). *COI1*: An *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* 280, 1091-1094.
- Yang, K.-Y., Liu, Y. und Zhang, S.** (2001). Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *PNAS* 98, 741-746.
- Yoshioka, H., Sugie, K., Park, H.J., Maeda, H., Tsuda, N., Kawakita, K. und Doke, N.** (2001). Induction of plant gp91<sup>phox</sup> homolog by fungal cell wall, arachidonic acid, and salicylic acid in potato. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14, 725-736.
- Yoshioka, H., Numata, N., Nakajima, K., Katou, S., Kawakita, K., Rowland, O., Jones, J.D. und Doke, N.** (2003). *Nicotiana benthamiana* gp91<sup>phox</sup> homologs *NbrbohA* and *NbrbohB* participate in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. *Plant Cell* 15, 706-718.
- Yu, I., Parker, J. und Bent, A.** (1998). Gene-for-gene disease resistance without the hypersensitive response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 7819-7824.
- Yu, I., Fengler, K.A., Clough, S.J. und Bent, A.F.** (2000). Identification of *Arabidopsis* mutants exhibiting an altered hypersensitive response in gene-for-gene disease resistance. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13, 277-286.
- Zeier, J., Pink, B., Mueller, M.J. und Berger, S.** (2004). Light conditions influence specific defence responses in incompatible plant-pathogen interactions: uncoupling systemic resistance from salicylic acid and PR-1 accumulation. *Planta* 219, 673-683.

## Publikationsliste

**Mueller, M.J., Mene-Saffrane, L., Grun, C., Karg, K. und Farmer, E.E.** (2006). Oxylin analysis methods. *Plant J.* 45, 472-489.

**Mariken J.T.J. Arts, Christoph Grun, Hans-Peter Voss, Aalt Bast, Martin J. Mueller and Guido R.M.M. Haenen.** Oxidative degradation of lipids during mashing. (Manuskript liegt bei und wird bei *J. Agric. Food Chem.* eingereicht).

**Grun, C., Matthes, D., Berger, S. und Mueller, M.J.**

.....  
.....

## DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Martin J. Müller für die Überlassung des interessanten und vielseitigen Themas sowie für die Bereitstellung der hervorragenden Arbeitsbedingungen. Sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit und seine Begeisterung haben ebenso wie seine fachliche Unterstützung wesentlich zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen. In gleichem Maße bedanke ich mich für das entgegengebrachte Vertrauen, insbesondere bei der Überlassung der Betreuung einer Auszubildenden und eines Diplomanden.

Herrn Dr. M. Krischke danke ich für die erstklassige fachliche Betreuung sowohl bei der Planung und Ausführung der analytischen Fragestellungen als auch für die persönliche Unterstützung während der Endphase der vorliegenden Arbeit.

Ein herzlicher Dank gilt Herrn Dr. H. Warzecha, Frau Dr. S. Berger und Frau Dr. G. Gresser für die wertvollen Anregungen und die fruchtbaren Diskussionen.

Eine besondere Herausforderung für mich war die Betreuung der Diplomarbeit von Herrn D. Matthes, dem mein herzlichster Dank für die sehr gute Zusammenarbeit gilt. Ganz herzlich bedanke ich mich bei Frau V. Ilusev für das entgegengebrachte Vertrauen während ihrer Ausbildung, ihren unermüdlichen Fleiss und ihre Zuverlässigkeit.

Insbesondere bedanke ich mich bei allen weiteren Kolleginnen und Kollegen, die durch die hervorragende Zusammenarbeit im Labor und das sehr gute Arbeitsklima maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, bei Frau C. Sibilski, Herrn S. Müller, Frau K. Dückershoff, Frau I. Reinders, Frau B. Dierich und Frau B. Hilbert für die tatkräftige und kompetente Unterstützung bei zahlreichen Experimenten und der Pflege der nur durch sie überlebenden Zellkulturen.

Dem Sonderforschungsbereich 567 danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Mein herzlichster Dank gilt jedoch meiner Familie, vornehmlich Claudia, die mir durch ihr Verständnis und ihre stetige Unterstützung den privaten Rückhalt für die Anfertigung der vorliegenden Arbeit gab.

## LEBENS LAUF

### Persönliche Angaben:

Name: Christoph Grun  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Geburtsdatum: 11.11.1972  
Geburtsort: Wolfratshausen

### Schul Ausbildung:

1979 - 1983 Grunds chule Geretsried  
1983 - 1992 Gymnasium Geretsried  
1992 Allgemeine Hochschulreife

### Zivildienst:

1992 - 1993 Krankenpfl eger an der Fachklinik für Rehabilitation in Bad Heilbrunn

### Hochschulstudium:

10.1993 - 12.1997 Lebensmittelchemiestudium an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
31.10.1995 Vorprüfung zum staatlich geprüften Lebensmittelchemiker  
03.12.1997 Erste Staatsprüfung zum staatlich geprüften Lebensmittelchemiker  
02. - 08.1998 Praxissemester an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Arbeitskreis von Prof. Dr. Schreier

### Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Nordbayern:

02.1999 - 06.1999 Lebensmittelrechtliche Ausbildung am Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Nordbayern in Erlangen, Nürnberg und Würzburg  
21.10.1999 Zweite Staatsprüfung zum staatlich geprüften Lebensmittelchemiker

### Berufstätigkeit:

12.1999 - 12.2002 Chemisch-analytische Entwicklungsabteilung der Fa. Biocur/ Hexal in Holzkirchen

### Promotion:

01.2003 - 01.2006 Wissenschaftlicher Mitarbeiter Arbeitskreis von Prof. Dr. Martin J. Müller am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Anfertigung der vorliegenden Arbeit

## **EHRENWÖRTLICHE VERSICHERUNG**

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Ich habe bisher noch keinen akademischen Grad erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den