

**Bayerische Julius-Maximilians-Universität
Würzburg**

Fakultät für Biologie



**„Sphingolipide – Analytik, Biosynthese und Funktion in
der *Arabidopsis thaliana* Pathogenantwort“**

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

vorgelegt von

Markus Peer
geboren in Regensburg

Würzburg, 2010

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Dandekar

Gutachter: PD Dr. Frank Waller

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Müller

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:



Für meinen Vater

Zusammenfassung

Sphingolipide (SPL) sind wichtige und ubiquitär verbreitete Bestandteile von Biomembranen. Sie sind neben ihrer strukturellen Bedeutung auch an vielfältigen Signalprozessen beteiligt. In tierischen Zellen konnte gezeigt werden, dass die Sphingolipid-Homöostase proliferative und apoptotische Prozesse reguliert. Auch in Pflanzen führen Störungen der Sphingolipidgehalte, etwa durch Toxine und Mutationen, unter anderem zu Zelltodprozessen, wie es in tierischen Modellsystemen bereits gezeigt werden konnte.

Aufgrund der enormen Vielfalt, der komplexen Struktur und diverser physiko-chemischer Eigenschaften der Sphingolipide gestaltet sich die qualitative und quantitative Untersuchung der Sphingolipide allerdings schwierig. Erst moderne massenspektrometrische und chromatographische Verfahren ermöglichen eine analytische Erfassung.

In dieser Arbeit konnten, basierend auf publizierten Methoden, analytische Verfahren entwickelt werden, mit deren Hilfe sich die Gehalte spezifischer Sphingolipide in *A. thaliana* quantitativ nachweisen lassen. Unter Einsatz eines „targeted metabolite profiling“-Ansatzes wurde die Rolle spezifischer Sphingolipide in der Pflanzen-Pathogen Interaktion charakterisiert. Infiltration von avirulenten *P. syringae* pv. *tomato* (*Pst*) in Blätter von *A. thaliana* führte zu schnell und transient erhöhten Gehalten der freien Sphingobase Phytosphingosin (t18:0). Im Gegensatz zu avirulenten *Pst* kam es nach Infiltration von virulenten *Pst* zu einer schnellen Rückkehr auf Basalniveau und nicht zu einer hypersensitiven Antwort (HR), was auf eine positiv regulatorische Rolle von t18:0 in Abwehrreaktionen von Pflanzen hinwies, z.B. bei der HR. Damit konnte in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Spiegel freier Sphingobasen der Pflanze, insbesondere von t18:0, in Antwort auf bakterielle Pathogene reguliert werden. Diese spezifische Regulation korreliert, in Abhängigkeit von der Pathogeninfektion, mit dem Verlauf der HR. Im Unterschied zu avirulenten Stämmen sind virulente *Pst* in der Lage, Abwehrreaktionen des Wirtsorganismus zu unterdrücken. Daher tritt keine HR auf, welche die Ausbreitung des Pathogens stoppen könnte. Die unterschiedliche Beeinflussung der t18:0 Gehalte virulenter und avirulenter Stämme zeigte sich auch in Experimenten mit einem anderen *P. syringae* Stamm.

Freie Sphingobasen zeigten in dieser Arbeit typische Merkmale von Signalmolekülen: geringe basale Spiegel, schnelle und transiente Gehaltsänderungen, präzise Regulation sowie spezifische Wirkeffekte. Sphingolipide stellen somit, neben den etwa durch PAMPs ausgelösten und durch Phytohormone vermittelten, weitere Signalwege in der Pflanzen-Pathogen Interaktion dar.

Die Infiltration von *Pst* in Blätter der *A. thaliana* Mutante *sbh1-1* führte zu transient erhöhten d18:0 Spiegeln. In dieser Mutante ist die Funktion von einer der zwei Sphingobasen-Hydroxylasen gestört. Wie sich nach Totalhydrolyse zeigte, sind die Gesamtgehalte von t18:0 in der Mutante allerdings nicht reduziert. Dies spricht dafür, dass der pathogenabhängige transiente Anstieg von t18:0 durch *de novo* Synthese aus d18:0 entsteht und nicht durch Freisetzung aus komplexen Sphingolipiden mittels unspezifischer Lipasen. Somit ist die Hydroxylase SBH1 für den schnellen signalvermittelten Anstieg von t18:0 verantwortlich.

Neben t18:0 lösen auch strukturell ähnliche freie Sphingobasen, z.B. d18:1 und d18:0, Abwehrreaktionen und Zelltod aus, während andere Sphingobasen (d20:0 und d20:1) sowie Ceramide keine Reaktionen auslösten. Dies weist auch direkt auf die Spezifität der beteiligten Mechanismen hin.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass die Immunabwehr ist ein sehr komplexes Netzwerk aus verschiedenen Signalwegen, in denen Sphingolipide eine zentrale Rolle spielen. Für eine umfassende Betrachtung der Abwehrmechanismen wird es daher in Zukunft nötig sein, in einem systembiologischen Ansatz die verschiedenen Ebenen der Interaktion und Regulation, also genomische, transkriptomische, proteomische und metabolomische Erkenntnisse, zu integrieren.

Summary

Sphingolipids (SPL) are important and ubiquitously distributed constituents of biological membranes. Moreover, they are involved in diverse signaling processes and are of structural importance. Sphingolipid homeostasis is crucial for proliferative and apoptotic responses in animal cells. In plants, changes in Sphingolipid levels, among other factors, among other factors, lead to cell death.

Due to the tremendous variety, complex structure and diverse physicochemical properties of sphingolipids, qualitative and quantitative analysis has only recently been possible due to newly developed methods in mass spectrometry and chromatography.

In this work, analytical methods to quantitatively detect the SPL content in *A. thaliana* leaves were established based on published literature. Using a targeted metabolic profiling approach, the role of specific SPL in the plant-pathogen interaction was characterized.

In line with the production of reactive oxygen species (ROS), a hallmark of biotic stress, infiltration of the avirulent form of the phytopathogen *P. syringae* pv. *tomato* (*Pst*) led to a fast and transient increase of the free long chain base Phytosphingosine (t18:0). Virulent *Pst* showed also a fast and transient, but clearly less prolonged elevation of t18:0 levels. Also, no HR was elicited in response to the infiltration, pointing to a positive regulatory role of t18:0 in this plant defense response.

This work shows, for the first time, that SPL, namely t18:0, were regulated in response to bacterial pathogens. The t18:0 kinetics showed a strong correlation with the course of the pathogen-elicited HR. There was also evidence, that virulent *Pst* influences the plants' own biosynthetic and regulatory mechanisms to inhibit the SPL mediated defense response. This was also the case with another tested *Pseudomonas syringae* strain.

In this work, free long chain bases showed characteristics typical for signaling molecules: low basal levels, a fast and transient increase in response to pathogens and a tight regulation. Hence, SPL may represent members of signaling pathways in plant-pathogen interactions in addition to or besides PAMP-triggered and hormonal mediated signaling pathways.

Infiltration of *Pst* into leaves of the *A. thaliana* hydroxylase mutant *sbh1-1* led to transiently increased d18:0 levels in leaves. In this mutant, one of the two functional sphingobase hydroxylases of *A. thaliana* is impaired. As the total pool of t18:0 was not significantly reduced in the mutant after total hydrolysis, we argue that the pathogen-dependent transient increase of

t18:0 was due to *de novo* synthesis from d18:0 and not to the action of unspecific lipases. Furthermore SBH1 was responsible for the fast increase of t18:0 levels.

In addition to t18:0, also other free long chain bases, e.g. d18:0, elicited plant reactions and cell death, whereas other long chain bases (d20:0 and d20:1) or ceramides elicited no response. Apparently, the specific lipid structure plays a major role for the efficiency in different signaling pathways.

The results of this work show, that immunity is a very complex network of different signaling pathways, with sphingolipids being not the least important molecules. For a comprehensive understanding of plant defense strategies, future work will surely have to follow a systems biology approach, combining genomic, transcriptomic, proteomic and metabolomic data.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	4
Summary.....	6
Abkürzungsverzeichnis	11
1. Einleitung.....	14
1.1. Sphingolipide – Struktur und Nomenklatur.....	15
1.2. Biosynthese, Metabolismus und strukturelle Vielfalt der Sphingolipide	17
1.3. Funktionen von Sphingolipiden	20
1.4. Pflanzen-Pathogen Interaktionen.....	25
1.5. Zelltod in Pflanzen	27
1.6. Analyse von Sphingolipiden – <i>targeted metabolite profiling</i>	30
1.7. Ziele der Arbeit	33
2. Material und Methoden	35
2.1. Chemikalien, Enzyme, Verbrauchsmaterial.....	35
Antibiotika	35
Enzyme und Puffer.....	35
Laborgeräte	35
Spezielle Chemikalien, Materialien und Kits.....	37
2.1.1. Nährmedien	38
2.1.2. Puffer- und Extraktionslösungen	38
2.1.3. Primer	39
2.1.4. Sphingolipide und Toxine	42
2.1.5. UPLC-ESI-MS/MS Eluenten	43
2.1.6. Organismen und Wachstumsbedingungen	44
2.2. Molekularbiologische Methoden	45
2.2.1. Quantifizierung von DNA bzw. RNA.....	45
2.2.2. RNA-Extraktion	45

2.2.3.	DNase Verdau und Fällung der RNA.....	46
2.2.4.	cDNA-Synthese	46
2.2.5.	DNA Extraktion	46
2.2.6.	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	46
2.2.7.	Agarose-Gelelektrophorese.....	47
2.2.8.	Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)	48
2.2.9.	Gesamtproteinbestimmung	51
2.3.	Methoden für die Arbeit an <i>Arabidopsis thaliana</i>	51
2.3.1.	Infiltration ganzer Blätter	51
2.3.2.	Verwundung	52
2.3.3.	Nachweis von Zelltod in <i>Arabidopsis thaliana</i>	52
2.3.3.4	Nachweis von Zelltod mittels Leitfähigkeitsmessung.....	55
2.3.4.	Nachweis des Bakterienwachstums	56
2.3.5.	Sphingolipidanalytik.....	57
3.	Ergebnisse.....	64
3.1.	Etablierung, Qualifizierung und Validierung der Sphingolipid-Analytik	64
3.1.1.	Ionisierungs- und Fragmentierungsparameter.....	64
3.1.2.	Auftrennung verschiedener SPL-Klassen mittels Flüssigkeitschromatographie....	66
3.1.3.	Qualifizierung und Validierung der SPL-Analytik	69
3.1.4.	HPLC-Fluoreszenzdetektion	74
3.1.5.	Analyse basaler Sphingolipidgehalte in <i>Arabidopsis thaliana</i>	75
3.2.	Analyse der Sphingolipidgehalte in Antwort auf biotischen Stress.....	77
3.2.1.	Infiltration von <i>A. thaliana</i> mit <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	77
3.2.2.	Verwundung von <i>A. thaliana</i>	80
3.2.3.	Behandlung von <i>A. thaliana</i> mit weiteren Pathogenen	81
3.2.4.	Einfluss von Effektoren, Inhibitoren und SPL	84
3.3.	Selektion homozygoter T-DNA Mutanten	89
3.4.	Untersuchungen an <i>A. thaliana</i> T-DNA Insertionsmutanten	91

3.4.1.	Analyse der Sphingolipidgehalte in den T-DNA Hydroxylasemutanten <i>sbh1-1</i> und <i>sbh2-1</i>	94
3.4.2.	Analyse der SPL-Gesamtgehalte in <i>A. thaliana</i> nach Totalhydrolyse	97
3.5.	Sphingolipide als Signalmoleküle.....	98
3.5.1.	SPL, ROS und HR	99
3.5.2.	Einfluss von Sphingolipiden auf das Bakterienwachstum und Suszeptibilitätsuntersuchungen in <i>A. thaliana</i>	104
3.5.3.	Genexpressionsanalysen	106
4.	Diskussion	107
4.1.	Entwicklung und Etablierung der Sphingolipidanalytik	108
4.2.	Sphingolipide in biotischen Stressreaktionen.....	113
4.3.	Biosynthese bioaktiver Sphingolipide.....	122
4.4.	Ausblick.....	125
5.	Literaturverzeichnis	128
	Publikationen	147
	Danksagung	148
	Ehrenwörtliche Erklärung	149

Abkürzungsverzeichnis

m/v	Massenprozent (Masse in g pro 100 ml Lösung)
m/z	Masse zu Ladungsverhältnis
v/v	Volumenprozent (Volumen in ml pro 100 ml Lösung)
Abs _x	Absorption bei x nm
Au	„arbitrary units“ (willkürliche Einheit)
AuC	„Area under Curve“ (Peakfläche unter der Kurve)
bp	Basenpaare
BSA	„Bovine Serum Albumine“ (Rinderserumalbumin)
cDNA	complementary DNA
cfu	„colony forming unit“ (koloniebildende Einheit)
Col-0	<i>A. thaliana</i> Wildtyp Columbia-0
CTAB	Hexadecyltrimethyl-Ammoniumbromid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat (N=A, C, G, T)
DTT	Dithiotreitol
DW	„dry weight“ (Trockengewicht)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrospray Ionisation
EtOH	Ethanol
F ₀	minimale Fluoreszenz (dunkeladaptierter Zustand)
F ₀ '	minimale Fluoreszenz (lichtadaptierter Zustand)
F _m	maximale Fluoreszenz (dunkeladaptierter Zustand)
F _m '	maximale Fluoreszenz (lichtadaptierter Zustand)
F _s bzw. F _t	Fluoreszenz im sog. „steady state“, d.h. Fluoreszenz unter konstanten äußeren Bedingungen
F _v (=F _m -F ₀)	variable Fluoreszenz (dunkeladaptierter Zustand)
F _v ' (=F _m '-F ₀ ')	variable Fluoreszenz (lichtadaptierter Zustand)
F _g /F _m	maximale Photosystem II Quantenausbeute
g	Gramm

h	„hour“ (Stunde)
HCl	Salzsäure
hpi	„hours post incubation/inoculation“ (Stunden nach Behandlung)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HR	„hypersensitive response“ (Hypersensitive Reaktion)
kb	kilo-Basen
kV	kilo-Volt
λ	Wellenlänge in nm
l	Liter
LCB	freie Sphingobase
Lux	Beleuchtungsstärke
μ	mikro
μ l	Mikroliter
M	molar
MeOH	Methanol
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
mRNA	„messenger RNA“ (Boten-RNA)
MS/MS	Tandem Massenspektrometer
MW	„molecular weight“ (Molekulargewicht)
n	nano
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
OD _x	optische Dicht bei x nm gemessen
PAM	pulse amplitude modulated fluorometry
PAMP	„pathogen associated molecular pattern“
PCD	„programmed cell death“ (programmierter Zelltod)
PCR	„polymerase chain reaction“ (Polymerase-Kettenreaktion)
pi	„post infiltration“ (nach Infiltration)
pv.	Pathovar
qRT-PCR	quantitative Real Time PCR
RF	Responsefaktor
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	„reactive oxygen species“ (reaktive Sauerstoffspezies)

rpm	„rounds per minute“ (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TIC	„total ion count“ (Gesamtionenstrom)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	„unit“ (Enzymaktivität [μmol bzw. $\mu\text{g}/\text{min}$])
üN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
WT	Wildtyp
x g	x-fache Erdbeschleunigung
Y(II)	„Yield (II)“ (Effektive Photosystem II Quantenausbeute)

1. Einleitung

Bereits 1884 wurden Sphingolipide von Johann Ludwig Wilhelm Thudichum entdeckt und erstmals beschrieben (THUDICHUM 1884). Doch damals befand sich die Naturwissenschaft, wie wir sie heute kennen, erst in den Anfängen und Thudichum stieß v.a. auf Skepsis und Unverständnis mit seinen neuartigen Entdeckungen (CHRISTENSEN 2003). Und selbst heute, mehr als 120 Jahre später, sind erst ein paar weitere Schritte zum Verständnis der Sphingolipide gemacht worden. Dabei haben Sphingolipide mit z.T. über 40 mol% großen Anteil an tierischen und pflanzlichen Membranlipiden (SPERLING *et al.* 2005; NILSSON 2007). In Pflanzenzellen machen Sphingolipide sogar ca. 10% der Gesamtlipide aus (DUNN *et al.* 2004). Der Bedeutung von Sphingolipiden wurde dennoch lange Zeit wenig Beachtung geschenkt, obwohl Schätzungen davon ausgehen, dass der Mensch durch die Nahrung etwa 115-140 g Sphingolipide pro Jahr (ca. 0,3-0,4 g/Tag) aufnimmt und metabolisiert (VESPER *et al.* 1999). Doch durch sich rapide verbessernde technische Möglichkeiten wurde auch die geheimnisvolle („Sphinx“-ähnliche) Natur der Sphingolipide, besonders in den letzten 20 Jahren, immer mehr enträtselt. Heute ist man sich der Bedeutung der Sphingolipide durchaus bewusst, zählen Sphingolipide doch zu den „bioaktiven Lipiden“. Ihnen wird eine Vielzahl von Funktionen in den unterschiedlichsten Organismen zugeordnet. Neben ihrer Bedeutung für die Zusammensetzung und die strukturelle Integrität von Membranen sowie von „Lipid Rafts“ wurden auch zahlreiche direkte Signal- und „second messenger“-Funktionen der Sphingolipide, überwiegend in Entwicklungs- und Zelltodprozessen, nachgewiesen. Sphingolipide sind auch von medizinischer Bedeutung und stellen einen potentiellen Ansatz dar, um in nicht allzu großer Ferne u.a. Krebs und multiple Sklerose zu therapieren (OGRETMEN and HANNUN 2004; BRINKMANN 2007). Sphingolipide spielen vermutlich auch eine zentrale Rolle bei Arteriosklerose, Diabetes mellitus und Adipositas (BARTKE and HANNUN 2009; MERRILL *et al.* 2009; MORO *et al.* 2009). Weiterhin könnte ein vertieftes Wissen der in Pflanzen und Tieren durch Sphingolipide regulierten Prozesse zukünftig auch eine effizientere Agrarproduktion gewährleisten. Bis dieses Ziel erreicht werden kann, ist jedoch noch viel Forschungsarbeit nötig. Das „rätselhafte“ Erscheinungsbild sowie eine nur geringe Aufmerksamkeit in weiten Kreisen der Naturwissenschaften konnten Sphingolipide allerdings noch nicht so recht ablegen. In der vorliegenden Arbeit wurden weitere Schritte unternommen, um diesen biologisch und medizinisch interessanten Molekülen ihre geheimnisvolle Aura zu nehmen. Gerade ihre Beteiligung in Zelltodprozessen wirft noch viele Fragen auf. Anhand von Pathogen-Interaktionen der Pflanze *Arabidopsis thaliana* sollte daher die Beteiligung von Sphingolipiden an Abwehrreaktionen untersucht werden.

1.1. Sphingolipide – Struktur und Nomenklatur

Sphingolipide (SPL) sind eine äußerst diverse Molekülklasse, welche im Laufe der Zeit in einer Vielzahl von Organismen, unter anderem in allen Eukaryoten sowie auch in Bakterien, Pilzen und sogar Viren, nachgewiesen wurden (SPERLING and HEINZ 2003; SPIEGEL and MILSTIEN 2003; LYNCH and DUNN 2004; MERRILL *et al.* 2007; HANNUN and OBEID 2008; PRUETT *et al.* 2008; MERRILL *et al.* 2009; PATA *et al.* 2009). Ihre *de novo* Biosynthese in Eukaryoten ist essentiell für Wachstum und Entwicklung (MERRILL 2002). Für einen allgemeine Überblick über Lipide siehe auch (BOU KHALIL *et al.* 2010). Während man schon früh erkannte, dass es unter den Sphingolipiden eine enorme strukturelle Vielfalt gibt und diese auch immer besser untersucht wurde, so ließ der komplexe Aufbau allerdings eine funktionelle Untersuchung lange nicht zu (HANNUN and LUBERTO 2000; PATA *et al.* 2009).

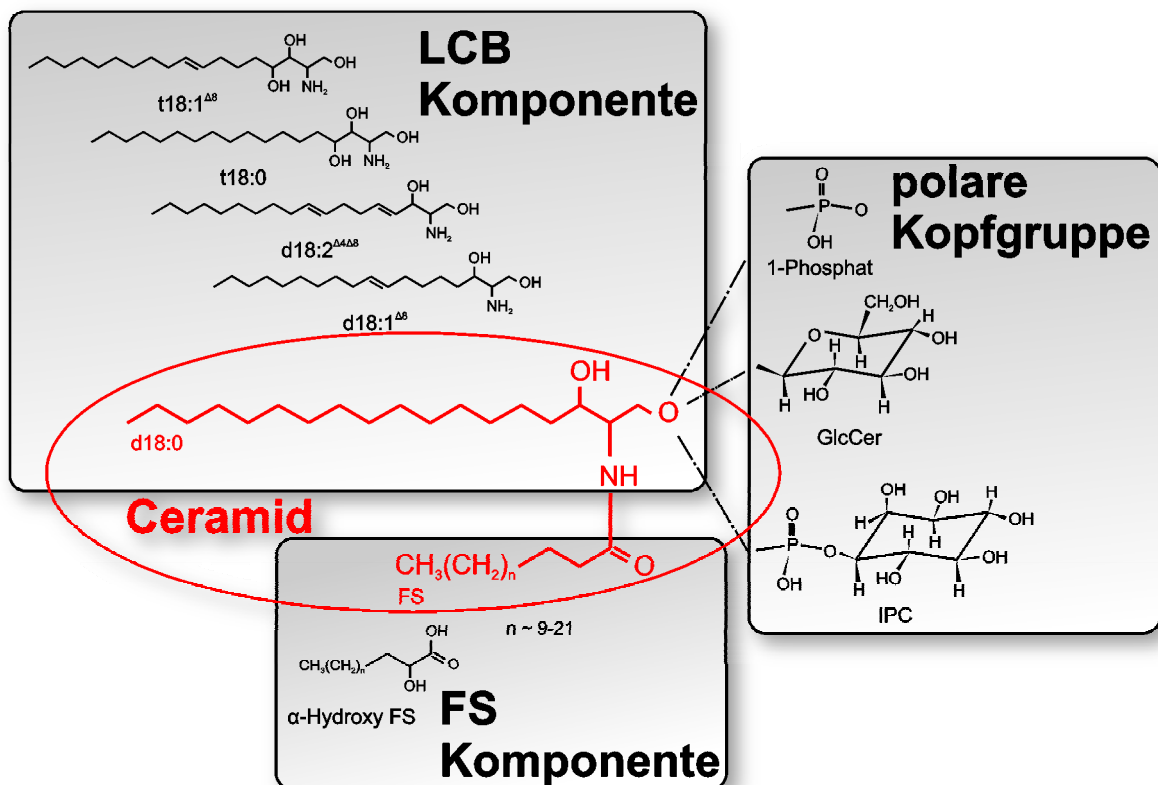


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Sphingolipide. Komplexere Sphingolipide setzen sich aus drei Teilen zusammen. (i) Der Sphingobasen (LCB)-Komponente, (ii) der Fettsäure (FS)-Komponente und (iii) der (polaren) Kopfgruppe. Gezeigt sind nur einige mögliche Molekülgruppen. Jede der drei Komponenten kann weiter modifiziert sein. Durch Kombination unterschiedlicher Komponenten ist die große strukturelle Vielfalt der Sphingolipide gegeben. GlcCer: Glycosylceramid. IPC: Inositol-Phosphoceramid. Verändert nach PATA (2009).

Erst durch moderne Analyse- und Detektionsmethoden im Rahmen der sogenannten „-omics“, wie etwa „Metabolomics“, „Lipidomics“ bzw. „Sphingolipidomics“, konnten neben einer

umfassenden Strukturaufklärung und Klassifizierung auch erste Einsichten bezüglich der funktionellen Eigenschaften der Sphingolipide erhalten werden (MERRILL *et al.* 2005; BIELAWSKI *et al.* 2006; ZHENG 2006; MARKHAM and JAWORSKI 2007; SULLARDS *et al.* 2007; PRUETT *et al.* 2008; MERRILL *et al.* 2009)

Alle Sphingolipide teilen sich als Grundstruktur ein 2-Amino,-1,3-dihydroxyalkan. Diese allgemeine Grundstruktur, auch Sphingobase oder long chain base (LCB) genannt, kann auf verschiedene Weise modifiziert sein. So gibt es unterschiedliche Längen der Alkylkette (meist c16-c22), wobei in Eukaryoten Sphingobasen mit 18 Kohlenstoffatomen dominieren (SULLARDS and MERRILL 2001). Desweiteren kann, besonders bei Pflanzen und Pilzen, eine dritte Hydroxylgruppe an Position C4 vorkommen (4-Hydroxy-Sphinginin; Phytosphingosin).

Auch Doppelbindungen können an Position C4 ($\Delta 4$; etwa bei der häufigsten Sphingobase in Säugetieren, trans-4-Sphingenin oder Sphingosin), Position C8 ($\Delta 8$; z.B. bei 8-Sphingenin) oder an Position C4 und C8 ($\Delta 4, \Delta 8$; z.B. bei 4, 8-Sphingadien, abundant in einigen Pflanzenarten) vorkommen. Es treten auch weitere Modifikationen wie etwa Methylierungen auf. Um die Molekülnamen abzukürzen, hat sich eine Nomenklatur etabliert (z.B. Sphinginin: d18:0), welche das Sphingobasenrückgrat beschreibt. Durch Angabe der Anzahl an Hydroxylgruppen (d: di-, t: trihydroxy) und an Kohlenstoffatomen der Alkylkette (z.B. 18) sowie des Sättigungsgrads (z.T. auch mit Kennzeichnung der Position und Stereochemie) können die LCBs (z.B. Sphingosin; d18:1 bzw. d18:1 ^{$\Delta 4E$}) eindeutig unterschieden werden.

Ceramide werden solche SPL genannt, welche über die 2-Aminoposition mit einer Fettsäure (FS) acyliert sind. Diese kann ebenso unterschiedliche Kettenlängen (meist c14-c26) und andere Modifikationen wie Hydroxylierungen, Sättigungsgrad und Methylierungen aufweisen (SPERLING and HEINZ 2003; LYNCH and DUNN 2004). Weisen die Fettsäuren eine Kettenlänge von ≥ 20 Kohlenstoffatomen auf, so spricht man auch von „very long chain fatty acids“ (VLCFAs) (ROUDIER *et al.* 2010).

Die C1-Hydroxylgruppe kann sowohl bei Sphingobasen als auch bei Ceramiden phosphoryliert oder auch mit weiteren polaren Gruppen oder Zuckern (u.a. β -Glucose oder β -Mannose) verestert sein, was zu den komplexen Sphingolipiden führt (SULLARDS and MERRILL 2001; SPASSIEVA and HILLE 2003; SPERLING and HEINZ 2003; LYNCH and DUNN 2004; PATA *et al.* 2009). Bei Pflanzen unterscheidet man dabei neben Ceramiden und freien Sphingobasen v.a. Glycosyl-Inositol-Phosphoceramide (GIPC; exklusiv in Pflanzen und Pilzen), die sich von den Inositol-Phosphoceramiden (IPCs) ableiten, und Glycosylceramide (GlcCer; auch „Cerebroside“ oder „Glucocerebroside“) mit unterschiedlichen Zuckerresten (WARNECKE and HEINZ 2003; MARKHAM and JAWORSKI 2007; PRUETT *et al.* 2008; HAYNES *et al.* 2009; PATA *et al.* 2009). In tierischen

Organismen finden sich u.a. auch Sphingomyeline, Galactosylceramide, Ganglioside und Sulfatide (VESPER *et al.* 1999; NILSSON 2007; PATA *et al.* 2009; MILHAS *et al.* 2010).

Fettsäuren in Ceramiden oder komplexen SPL werden wie LCBs durch die Angabe der Kettenlänge und des Sättigungsgrads abgekürzt (z.B. t18:0-c18:0 für *N*-Octadecanoyl-Phytosphingosin; *N*-octadecanoyl-(2S,3S,4R)-2-amino-1,3,4-octadecanetriol). Hydroxyfettsäuren werden ebenso deklariert (z.B. t18:0-h18:0) wie die (polare) Kopfgruppe (z.B. t18:0-c18:0-Glc oder t18:1-c18:0-P). Abbildung 1 fasst den Aufbau der Sphingolipide mit ihrem *N*-Acyl-Sphingobasenrückgrat schematisch zusammen.

1.2. Biosynthese, Metabolismus und strukturelle Vielfalt der Sphingolipide

Inzwischen konnten durch bioinformatische Ansätze und heterologe Expression bereits viele an Biosynthese und Metabolismus von Sphingolipiden beteiligte Enzyme identifiziert, kloniert und charakterisiert werden (DICKSON 1998; SPERLING *et al.* 2001; DUNN *et al.* 2004). Obwohl es einige spezifische und wichtige Unterschiede bezüglich der Biosynthese und der Zusammensetzung zwischen den Sphingolipiden von Pflanzen, Pilzen und Tieren gibt, hat sich herausgestellt, dass viele Enzyme stark konserviert sind (DUNN *et al.* 2004; PATA *et al.* 2009).

Die *de novo* Biosynthese der Sphingolipide findet hauptsächlich am endoplasmatischen Retikulum und im Cytosol statt und ist schematisch in Abbildung 2 dargestellt. Sie beginnt mit der Kondensation der c16 Fettsäure Palmitoyl-CoA und der Aminosäure Serin durch die Serin-Palmitoyltransferase zu 3-Ketosphinganin. Unter $\text{NADPH} + \text{H}^+$ Verbrauch entsteht durch Reduktion die erste „echte“ Sphingobase, das Dihydrosphingosin (DHS; Sphinganin; d18:0). Dihydrosphingosin bildet den Ursprung für alle weiteren Modifikationen, welche zu der großen Anzahl verschiedener SPL führt.

Ceramid-Synthasen (bzw. die Rückreaktion der Ceramidasen; RCDA, „reverse ceramidase activity“) ermöglichen die Addition einer Fettsäure (FS-CoA oder freie FS) an die Aminogruppe einer Sphingobase (hierbei handelt es sich meist um d18:0 oder d18:1) (PATA *et al.* 2009). Diese Reaktion findet am endoplasmatischen Retikulum statt und stellt den Übergang zu allen komplexen Sphingolipiden dar (DUNN *et al.* 2004).

Freie Sphingobasen sowie das Sphingobasenrückgrat und die Fettsäure eines Ceramids können modifiziert werden, wobei die Abfolge der Modifikationen noch nicht abschließend geklärt ist. Hydroxylasen können eine dritte Hydroxylgruppe an Position C4 der Sphingobase anfügen, wodurch Phytosphingosin gebildet wird. Für *A. thaliana* konnte gezeigt werden, dass es zwei distinkte C4-LCB-Hydroxylasen (SBH1 und SBH2) gibt (SPERLING *et al.* 2001; CHEN *et al.* 2008).

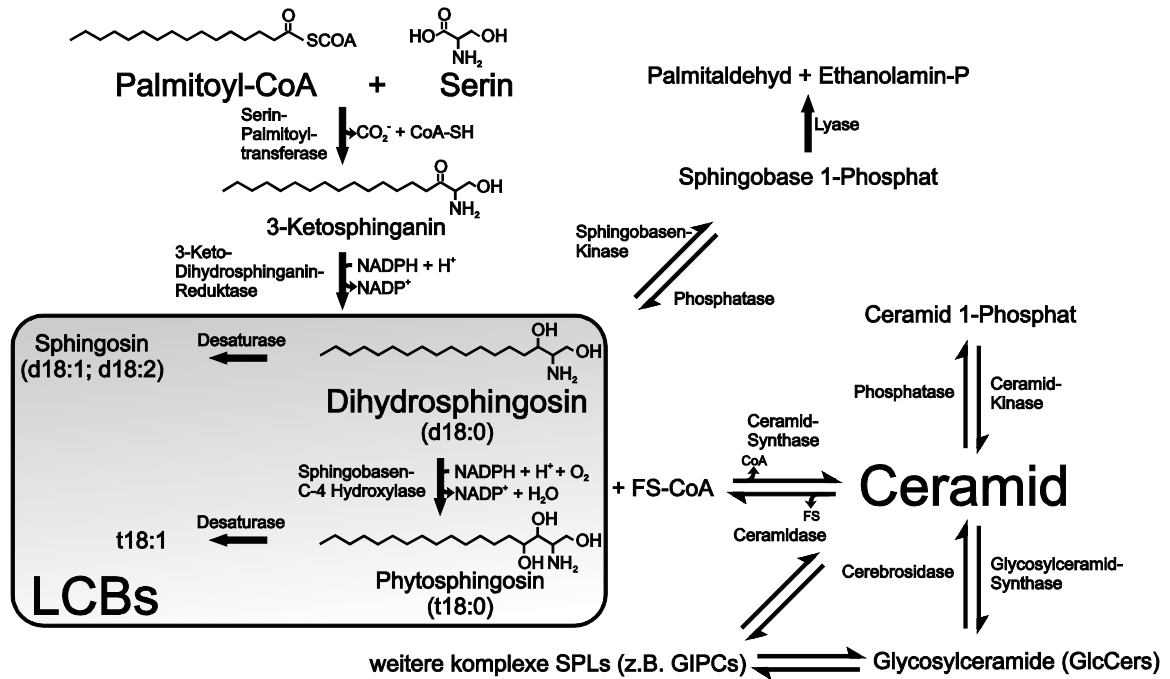


Abbildung 2: Biosynthese der Sphingolipide (SPL). Schematische Darstellung der wichtigsten Biosynthese- und Metabolismusschritte in Eukaryoten. Durch Kondensation von Palmitoyl-CoA mit Serin entsteht 3-Ketosphinganim, welches zur Sphingobase (long chain base, LCB) Dihydrophingimosin (d18:0) reduziert wird. Ausgehend von d18:0 gibt es eine Reihe weiterer Modifikationen. Desaturasen führen zu ein- oder zweifach ungesättigten LCBs, während Hydroxylasen zur Bildung von Phytosphingimosin führen. All diese LCBs können durch eine Aminobindung mit einer Fettsäure (FS) gekoppelt werden, was zu den Ceramiden führt. LCBs und Ceramide können an ihrer C1-Hydroxylgruppe durch Kinasen phosphoryliert, aber auch glykosyliert oder anderweitig modifiziert werden. Phosphorylierte LCBs können durch eine Lyase gespalten werden, wodurch der endgültige Abbau einer Sphingobase ermöglicht wird. Mögliche Rückreaktionen sind durch Doppelpfeile gekennzeichnet. Verändert nach HANNUN und LUBERTO (2000).

Beide Hydroxylasen werden konstitutiv in allen Pflanzenorganen exprimiert, sind im ER lokalisiert und es gibt Hinweise auf ihre funktionelle Redundanz (CHEN *et al.* 2008). Allerdings konnte 2008 von CHEN *et al.* gezeigt werden, dass sich ein Knock-out von SBH1 auf die Sphingolipidzusammensetzung in allen Organen auswirkt, während das Fehlen von SBH2 v.a. Wurzeln, Sprossachse und Schoten, nicht aber die Blätter, betrifft (CHEN *et al.* 2008).

Neben dieser sogenannten *de novo* Synthese aus d18:0 gibt es in *A. thaliana* eine zweite Möglichkeit, die zur Bildung von t18:0 führen kann. Durch Recycling komplexer Sphingolipide („salvage pathway“) mittels Ceramidasen oder durch Ceramidase-Aktivität von Ceramid-Synthasen (Abbildung 3).

Doppelter T-DNA Knockout führt zu Mutanten, welche kein freies oder gebundenes t18:0 oder t18:1^{Δ8} mehr, dafür aber erhöhte Gesamtsphingolipidspiegel (v.a. C16-FS Ceramide) aufweisen (CHEN *et al.* 2008). Da in der Doppelmutante die Gehalte der VLCFA-Ceramide geringer sind

gehen die Autoren von einem spezifischen Syntheseweg aus, welcher t18:x und VLCFAs für die Ceramidsynthese verwendet (CHEN *et al.* 2008).

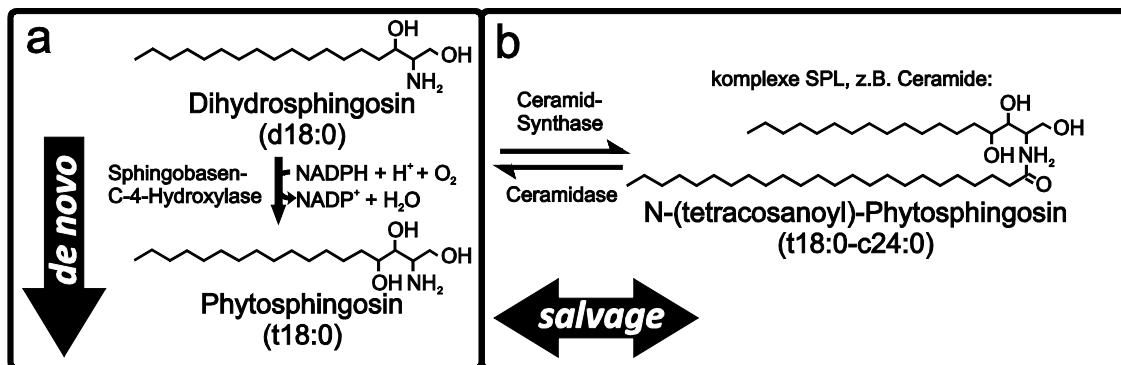


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Biosynthese der freien Sphingobase t18:0 in *A. thaliana*. (a) *de novo* Synthese aus d18:0 mittels C4-Hydroxylasen (SBH1: Atg69640; SBH2: At1g14290). (b) Freisetzung aus komplexen Sphingolipiden (salvage pathway).

Spezifische Desaturasen fügen Doppelbindungen an Position $\Delta 4$ oder $\Delta 8$ der Sphingobase ein. Im Unterschied zu Säugern sind in Pflanzen zwei unterschiedliche Desaturasen bekannt (NAPIER *et al.* 2002; SPERLING *et al.* 2003; MICHAELSON *et al.* 2008). Auch die Fettsäurekomponente kann Doppelbindungen aufweisen. Besonders in Pflanzen erfolgt häufig auch eine α -Hydroxylierung der Fettsäure. Über 90% der pflanzlichen Sphingolipide enthalten gesättigte oder einfach ungesättigte α -Hydroxyfettsäuren mit Kettenlängen zwischen 16 und 26 Kohlenstoffatomen, wobei z.B. in *A. thaliana* c16:0, c24:0, c24:1 und c26:0 (Hydroxy)Fettsäuren die abundantesten Spezies bilden (DUNN *et al.* 2004; MARKHAM and JAWORSKI 2007). Dazu kommen noch weitere funktionelle Modifikationen, z.B. durch Methylierungen.

Ceramide können, ebenso wie die Sphingobasen, an der C1-Hydroxylgruppe durch Ceramid-Kinasen phosphoryliert werden. Desweiteren können auch verschiedenste Zucker (Glycosylceramid-Synthasen) und weitere funktionelle Gruppen, z.B. durch Phosphodiesterbindungen, an C1 verestert werden, wodurch letztlich die Vielzahl an komplexen Sphingolipiden (u.a. GIPC und GlcCer) entstehen kann (DESAI *et al.* 1993; SUZUKI 1998; SULLARDS and MERRILL 2001; SPASSIEVA and HILLE 2003; SPERLING and HEINZ 2003; WRIGHT 2003; LYNCH and DUNN 2004; CHEN *et al.* 2008; PATA *et al.* 2009). Komplexe Sphingolipide können durch Cerebrosidasen und Ceramidasen auch wieder gespalten werden, was zu einer Vielzahl an Lysoformen (z.B. Sphingosin-Phosphorylcholin und Psychosine) führt. Der katabole Stoffwechsel („salvage pathway“) ist, neben der *de novo* Synthese, die zweite Möglichkeit, wie Ceramide und Sphingobasen für Biosynthese- und Metabolismusprozesse zur Verfügung gestellt werden können (MERRILL 2002; HANNUN and OBEID 2008; KITATANI *et al.* 2008).

Die häufigsten Sphingolipide in Pflanzen sind die GIPC, gefolgt von den GlcCer, Cers und LCBs, wobei das Sphingobasentrückgrat pflanzlicher SPL überwiegend aus *cis*- und *trans*-Isomeren von t18:1, t18:0, d18:0, aber auch d18:2 und d18:1^{Δ8} gebildet wird (DUNN *et al.* 2004; MARKHAM and JAWORSKI 2007; PATA *et al.* 2009).

Die enorme Vielfalt und Komplexität der Sphingolipide bedarf einer aufwendigen und strengen Regulation. Wichtige regulatorische Enzyme sind die Serin-Palmitoyltransferase sowie die Ceramid-Synthasen, da sie die wichtigsten Start- bzw. Verzweigungspunkte der Biosynthese darstellen und durch Regulation die Gleichgewichte der Sphingolipidklassen unmittelbar verändern können (MERRILL 2002). Allerdings ist über den funktionellen Zusammenhang bisher noch recht wenig bekannt. So könnte eine Regulation auf Ebene der Genexpression, der posttranslationalen Modifikation oder allosterischer Mechanismen stattfinden. Einige von diesen Mechanismen sind spezifisch für manche Zelltypen und können sowohl von der jeweiligen Entwicklungsstufe, als auch von bestimmten internen oder externen Signalen abhängig sein. So werden die Serin-Palmitoyltransferase (SPT) sowie die Ceramid-Synthasen kompetitiv durch eine Vielzahl von synthetischen oder natürlichen Substanzen, etwa von diversen Mikroorganismen, inhibiert (MERRILL *et al.* 1988; MERRILL 2002). Eine dauerhafte Blockade der SPT ist für viele Zellen letal. Besonders in tierischen Zellen stellen auch Desaturasen einen wichtigen Regulationspunkt dar, da dort v.a. ungesättigte Ceramide Zelltod auslösen (MERRILL 2002). Auch der Vorläufer der GIPC, IPC, wird durch die IPC-Synthase aus Ceramiden und dem Phospholipid Phosphatidylinositol (PI) gebildet (BROMLEY *et al.* 2003). Inhibierung der IPC-Synthase in *A. thaliana* (*erh1*) führt zu einem endogen stark erhöhten Ceramidspiegel (WANG *et al.* 2008).

Ebenso konnte gezeigt werden, dass *A. thaliana* α -Hydroxylasen aufgrund ihres Einflusses auf die Konzentration langkettiger Hydroxyceramide regulatorisch wirken (NAGANO *et al.* 2009). Interessanterweise führen die durch beide Wege erhöhten (Hydroxy)Ceramidspiegel in Pflanzen verstärkt zu Zelltodreaktionen (PATA *et al.* 2009).

1.3. Funktionen von Sphingolipiden

So groß die strukturelle Vielfalt der Sphingolipide ist, so vielfältig sind auch die Funktionen, mit denen sie in Verbindung gebracht werden. Sphingolipiden werden allgemeine strukturelle Funktionen, wie die Aufrechterhaltung der Membranintegrität, die Bildung von Lipid Rafts etc. sowie Signalfunktionen zugeordnet. Wichtig dabei ist, die Lokalisation der verschiedenen Sphingolipidklassen zu beachten. Denn die spezifische subzelluläre Lokalisation der meisten Enzyme der SPL Biosynthese und des Metabolismus wirkt sich direkt auf mögliche Funktionen

der SPL aus (HANNUN and OBEID 2008). Durch eine spezifische Verteilung der Genexpression sowie der Isoenzyme auf bestimmte Gewebe lässt sich ebenfalls die Funktion verschiedener Sphingolipide steuern. Die Biosynthese aller SPL startet am endoplasmatischen Retikulum. Weitere Modifikationen, wie Ceramidsynthese und Anfügen komplexer Zuckerreste, finden auch im Cytosol, im Golgi-Apparat und an anderen Membransystemen der Zelle statt. Sofern nicht spezifische Transporter vorhanden sind, ist der Ort der Biosynthese und des Metabolismus aufgrund der schlechten Löslichkeit der SPL meist auch der Ort der Funktion. Einige SPL, wie etwa Ceramid-1P oder GIPC, tragen bei neutralem pH eine Ladung, besitzen aber auch zwei hydrophobe Alkylketten. Diese Moleküle sind relativ unbeweglich an dem Ort ihrer Biosynthese festgehalten und können kaum zwischen den Schichten einer Doppelmembran wechseln. Neutrale bzw. hydrophobe SPL, wie etwa Ceramide oder Glycosylceramide, werden zwar ebenfalls in ihren Membrankompartimenten festgehalten, können aber relativ einfach durch molekulare Flip-Flop die Membranseite wechseln (LÓPEZ-MONTERO *et al.* 2010). LCBs und deren Phosphate hingegen haben eine ausreichende wässrige Löslichkeit, um sich zwischen unterschiedlichen Membrankompartimenten zu bewegen (KAHN *et al.* 1991). Aufgrund ihrer grenzflächenaktiven amphiphilen Natur ist ihre freie Konzentration allerdings sehr gering.

Sphingolipide können metabolisch leicht ineinander umgewandelt werden und zeigen dabei oft antagonistische Effekte, was direkt auf mögliche Wirk- und Regulationsmechanismen hinweist (MERRILL 2002). Aufgrund der strukturellen Vielfalt und Verteilung ist es allerdings gefährlich, von „den“ Sphingolipiden und „ihren“ Funktionen zu sprechen. Bisher sind hunderte verschiedene Sphingolipide bekannt, wobei tatsächlich tausende Kombinationen aus Sphingobase, Fettsäure und (polarer) Kopfgruppe möglich sind (CAHOON and LYNCH 1991; VESPER *et al.* 1999; HANNUN and LUBERTO 2000; FUTERMAN and HANNUN 2004). In *Arabidopsis thaliana* konnten bereits mindestens 200 SPL-Spezies identifiziert werden, in Säugern alleine wurden mehr als 500 Glycosphingolipide beschrieben (FUTERMAN and HANNUN 2004; MARKHAM *et al.* 2006; MARKHAM and JAWORSKI 2007). Es ist daher sinnvoll, die möglichen und bisher nachgewiesenen Funktionen für jede Sphingolipidklasse getrennt zu betrachten:

Glycosyl-Inositol-Phosphoceramide - GIPC

GIPC sind überwiegend in der Plasmamembran lokalisiert und sind die abundantesten komplexen Sphingolipide in Pflanzen und Pilzen, kommen aber nicht in tierischen Zellen vor (OBEID *et al.* 2002; WARNECKE and HEINZ 2003; WORRALL 2003; LYNCH and DUNN 2004; MARKHAM *et al.* 2006; MARKHAM and JAWORSKI 2007). Aufgrund ihrer komplexen Struktur gestaltet sich ihre Analyse schwierig, so dass trotz ihrer Abundanz erst wenig über ihre Funktionen bekannt ist. Wie bereits erwähnt führen Mutationen bei der IPC-Synthase, einem Biosyntheseenzym der

GIPC, zu Zelltodprozessen (WANG *et al.* 2008), außerdem sind GIPC als GPI-Anker von solchen Proteinen von Bedeutung, welche vornehmlich in Lipid Rafts zu finden sind (BHAT and PANSTRUGA 2005; BORNER *et al.* 2005). GIPC könnten somit wichtige Rollen bei der intra- und interzellulären Signaltransduktion sowie bei der Proteinsortierung spielen (RAMSTEDT and SLOTTE 2006; PATA *et al.* 2009).

Glycosylceramide - GlcCer

Glycosylceramide (GlcCer) sind ebenfalls abundante SPL und finden sich verstärkt in der Plasma- und Vakuolenmembran von Pflanzen, aber auch in tierischen Zellen sowie in Bakterien (WARNECKE and HEINZ 2003). In Pflanzen dominieren GlcCer mit Hydroxyfettsäuren (SULLARDS *et al.* 2000). Die letzten Schritte ihrer Biosynthese finden im Golgi-Apparat statt.

Sie werden durch ihre membranstabilisierenden und –formenden Eigenschaften (veränderte Rigidität und Struktur aufgrund stärkerer Wechselwirkungen zwischen den Membranlipiden) neben der Aufrechterhaltung der Membranintegrität und -stabilität auch mit Kältetoleranz (CAHOON and LYNCH 1991; UEMURA and STEPONKUS 1994; IMAI *et al.* 1995; UEMURA *et al.* 1995; IMAI *et al.* 1997; SPASSIEVA and HILLE 2003; WARNECKE and HEINZ 2003) und Trockenadaptation in Verbindung gebracht (QUARTACCI *et al.* 2002; WARNECKE and HEINZ 2003; COURSOLO *et al.* 2005). GlcCer in der äußeren Schicht der Plasmamembran können in Kontakt mit dem Apoplasten treten und sind an Pathogenese Prozessen beteiligt (PATA *et al.* 2009). Dass SPL die Membranpermeabilität in Pflanzen beeinflussen, konnte auch anhand erhöhter Aluminiumresistenz in *Triticum aestivum* (ZHANG *et al.* 1997) und *Zea mays* (DA SILVA *et al.* 2006) gezeigt werden. Dabei spielt in Pflanzen offenbar die spezifische Struktur der einfach ungesättigten Phytoceramide eine Rolle, da sich die Stereoisomere (mit den Sphingobasentrückgraten t18:1^{Δ8E} und t18:1^{Δ8Z}) unterschiedlich auf die Sensitivität bzw. Resistenz bezüglich der Phytotoxizität von Aluminiumstress auswirken (DA SILVA *et al.* 2006; RYAN *et al.* 2007).

Ceramide und Ceramid-1Phosphate – Cer & Cer-P

Ceramide kommen, relativ zu GIPC und GlcCer, in geringerer Konzentration in Pflanzenmembranen vor (MARKHAM *et al.* 2006; WANG *et al.* 2006; MARKHAM and JAWORSKI 2007). Die häufigsten Sphingobasentrückgrate sind t18:x und ihre Fettsäurekomponente ist sehr variabel, wobei VLCFAs und Hydroxyceramide in vielen Pflanzenspezies die Mehrheit stellen (BARTKE *et al.* 2006; MARKHAM *et al.* 2006; MARKHAM and JAWORSKI 2007).

Aus dem Tierreich ist schon seit längerem bekannt, dass Ceramide einen wichtigen Faktor des programmierten Zelltods (PCD) darstellen, wobei eine Reihe spezifischer Mechanismen bereits

aufgeklärt wurden (HANNUN and LUBERTO 2000; PETTUS *et al.* 2002; GULBINS 2003; HANNUN and OBEID 2008). Auch in Pflanzen konnten Ceramide mit PCD in Verbindung gebracht werden. So weist etwa die Mutante *accelerated cell death 5 (acd5)* verstärkte Krankheitssymptome, vor allem typische Läsionen, nach Pathogenbefall auf (GREENBERG *et al.* 2000). Verantwortlich dafür ist die Mutation einer Ceramid-Kinase (LIANG *et al.* 2003). Dabei wurde ebenfalls gezeigt, dass die Verhältnisse von Ceramiden und Ceramid-1-Phosphaten für die Ausprägung der Zelltodreaktionen entscheidend sind und dass die Abwehrreaktion von der Virulenz der Pathogene abhängt (LIANG *et al.* 2003; CHALFANT and SPIEGEL 2005). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass Ceramide mit kurzen Fettsäuren (C2), welche basal praktisch nicht nachweisbar sind, besonders gut den mitochondrien- und Ca²⁺-abhängigen PCD in *A. thaliana* auslösen, während die abundanteren längerkettigen Ceramide weniger potent sind (TOWNLEY *et al.* 2005). Die Rolle von reaktiven Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“, ROS) im ceramidabhängigen PCD ist jedoch noch unklar (TOWNLEY *et al.* 2005). Dies lässt auch den Schluss auf einen strengen Regulationsmechanismus zu, der für PCD-Reaktionen nötig ist (PATA *et al.* 2009).

Freie Sphingobasen und Sphingobasen-1-Phosphate – LCB & LCB-P

Die Grundform der Sphingolipide stellen die Sphingobasen (LCBs) dar. LCBs und LCB-Ps wurden bereits bezüglich ihrer Auswirkungen auf eine Vielzahl zellulärer und molekularer Mechanismen untersucht. So wurde v.a. in tierischen Zellen der besondere Effekt von d18:1^{Δ4} und Ceramiden auf Zelltodprozesse hin untersucht, wobei d18:1^{Δ4}-P einen anti-apoptotischen und proliferativen Einfluss auf Zellen ausübt sowie bei der Organisation des Cytoskeletts und bei Differenzierungsprozessen beteiligt ist (CUVILLIER *et al.* 2000; PYNE and PYNE 2010). In Pilzen konnte für Phytosphingosin (t18:0) eine direkte PCD auslösende Funktion nachgewiesen werden (CASTRO *et al.* 2008). Allgemein hat sich gezeigt, dass die Gleichgewichte unterschiedlicher SPL-Metabolite für das Schicksal einer Zelle entscheidend sind (LE STUNFF *et al.* 2002; MACEYKA *et al.* 2002; CHALFANT and SPIEGEL 2005; HAIT *et al.* 2006; HANNUN and OBEID 2008; HU *et al.* 2010).

Doch auch in Pflanzen gibt es Hinweise auf die Bioaktivität freier LCBs. In *A. thaliana* etwa wurde ein Lipid-Transferprotein (ACD11) entdeckt, welches LCBs, nicht aber komplexe SPL, durch Membranen transportiert und somit für die Verteilung der LCBs zwischen den Kompartimenten einer Zelle sorgt. Durch Knockout des entsprechenden Gens wurde eine Mutante (*accelerated cell death 11; acd11*) generiert, in der es durch das gestörte Verteilungsmuster von SPL zu spontanem salicylsäure- und lichtabhängigen Zelltod kommt (BRODERSEN *et al.* 2002; PETERSEN *et al.* 2008). Weitere Hinweise auf die Funktion freier LCBs in Pflanzen lieferten auch Untersuchungen an *Solanum lycopersicum*. Dabei wurde gezeigt, dass das Toxin des

necrotrophen Pilzes *Alternaria alternaria* f. sp. *lycopersici* (AAL-Toxin) die *de novo* Synthese der Ceramide hemmt (ABBAS *et al.* 1995; WANG *et al.* 1996; SPASSIEVA *et al.* 2002). Dadurch erhöhen sich die Gehalte an freien LCBs, v.a. d18:0 und t18:0, und es kommt zu hypersensitiven Zelltodreaktionen (ABBAS *et al.* 1994; WANG *et al.* 1996; BRANDWAGT *et al.* 2000). Dass es dabei die AAL-Toxin abhängige Akkumulation freier LCBs ist, welche zu PCD führt, konnte durch die Blockade der *de novo* LCB-Synthese mit Hilfe von gleichzeitiger Gabe von Myriocin, einem spezifischen Inhibitor der Serin-Palmitoyltransferase aus *Myriococcum albomyces*, gezeigt werden. Myriocingabe führte zu niedrigeren LCB Gehalten und zu verringertem PCD nach AAL-Toxin (SPASSIEVA *et al.* 2002; DELGADO *et al.* 2006; TAKAHASHI *et al.* 2009).

Auch Fumonisin B1, ein Toxin aus *Fusarium moniliforme*, führt durch Inhibierung der Ceramid-Synthese zu erhöhten LCB Spiegel in Pflanzenzellen, fehlender Ceramidneusynthese und zu verstärktem und spontanem PCD (WANG *et al.* 1991; MERRILL *et al.* 1993; ABBAS *et al.* 1994; WANG *et al.* 1996; ASAI *et al.* 2000; STONE *et al.* 2000; KUROYANAGI 2005). Dagegen kommt es in der Mutante *fumonisin B1 resistant 11-1 (fbr11-1)*, bei der eine Untereinheit der Serin-Palmitoyltransferase defekt und somit die *de novo* Synthese der LCBs gestört ist, nach FB1 Applikation zu keinen erhöhten LCB Spiegel und damit zu keinem PCD (SHI *et al.* 2007). Dabei haben freie LCBs (t18:0, d18:0 und d18:1^{Δ4}) einen direkten Einfluss auf die Bildung von ROS und lösen dadurch Zelltod in *A. thaliana* aus (SHI *et al.* 2007). Die PCD auslösende Wirkung von d18:0 kann durch die Applikation von d18:0-P auch wieder aufgehoben werden, was für ein streng reguliertes Signalsystem spricht (SHI *et al.* 2007). Dies zeigt auch die Analyse von Lyase-Mutanten (TSEGAYE *et al.* 2007; NISHIKAWA *et al.* 2008). Lyasen sind, zusammen mit Kinasen und Phosphatasen, an der Regulation der SPL-Konzentrationen beteiligt und stellen den einzigen Weg dar, um SPL katabolisch aus dem Kreislauf des Metabolismus endgültig zu entfernen (LE STUNFF *et al.* 2007). Fehlt diese Möglichkeit der Regulation, so sammeln sich nach Pathogenstress die Substrate (u.a. t18:1-P) bzw. deren Vorläufer (LCBs) in den Zellen an und es kommt zu Zelltod (TSEGAYE *et al.* 2007). Dass phosphorylierte Sphingobasen in Pflanzen- neben Zelltodprozessen- auch weitere bioaktive Rollen spielen, konnte durch Untersuchungen an (Ca²⁺-abhängigen) Stomatabewegungen gezeigt werden (NG 2001; NG *et al.* 2001; WORRALL *et al.* 2008). Hierbei handelt es sich um streng regulierte Metabolismusprozesse, an deren Regulation u.a. Abscisinsäure (ABA) und heterotrimere G-Proteine beteiligt sind (COURSOL *et al.* 2003; COURSOL *et al.* 2005; WORRALL *et al.* 2008). Ebenso wurden d18:1^{Δ4}-P und t18:0-P, nicht aber d18:0-P, als Wirksamkeit bestimmende Faktoren identifiziert (WORRALL *et al.* 2008). Aufgrund der bisher nachweisbaren niedrigen Abundanz der LCB-Ps in den meisten Pflanzen, v.a. von d18:1^{Δ4}-P, muss eine tatsächliche physiologische Relevanz aber weiter überprüft werden (NG *et al.* 2001; COURSOL *et al.* 2005; MICHAELSON *et al.* 2008; LYNCH *et al.* 2009).

1.4. Pflanzen-Pathogen Interaktionen

Treffen Pathogene auf einen Wirtsorganismus, so gibt es zwei Möglichkeiten: entweder der betroffene Wirt ist resistent bzw. inkompatibel oder kompatibel und damit suszeptibel gegenüber einer Infektion. Neben konstitutiven Barrieren bestimmen oft induzierte Reaktionen über Erfolg oder Misserfolg des Pathogens.

Pflanzliches Material kann sowohl Lebensraum als auch Nahrungsquelle phytopathogener Organismen darstellen. Je nach Art der Parasitierung ihrer Wirtspflanzen werden Phytopathogene als biotroph, hemibiotroph oder nekrotroph klassifiziert (BONFIG 2008).

Während biotrophe Pathogene im Prinzip durch „einfache“ Abwehrmechanismen, wie etwa lokal induziertem Zelltod, bekämpft werden können, reicht Zelltod alleine z.B. bei nekrotrophen Pathogenen nicht aus. Daher existieren weitere Abwehrmechanismen, welche in ihrer Ausprägung und zeitlichen Abfolge oft erheblich bei verschiedenen Pflanzen-Pathogen-Interaktionen variieren können und komplex reguliert sind (HEATH 2000). Die frühesten messbaren Kennzeichen einer Abwehr sind eine Veränderung der Membranpermeabilität, eine Alkalisierung des Apoplasten und der Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die betroffene Zelle.

Anschließend erfolgt meist die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“, ROS) sowie von Salicylsäure, hydrolytischen Enzymen und Sekundärmetaboliten (Phytoalexine). Oft werden auch spezifische Abwehrgene exprimiert (z.B. *PR1*, *SAG13* und *PDF1.2*) und es kann zu Zellwandverdickung und meist auch zu programmiertem Zelltod („programmed cell death“; PCD) bzw. der hypersensitiven Antwort kommen (MUR *et al.* 2008; PANSTRUGA *et al.* 2009; JEWORUTZKI *et al.* 2010).

Mechanismen der Pathogenerkennung

Verschiedene Mechanismen können zu Abwehrreaktionen bzw. Resistenz oder Suszeptibilität führen (OH *et al.* 2010). Pflanzenpathogene wie Bakterien, Pilze, Oomyceten und Nematoden sekretieren Proteine und andere Moleküle, sogenannte Effektoren oder Virulenzfaktoren, um durch Beeinflussung von Struktur und Funktion der Wirtszellen eine erfolgreiche Infektion durchzuführen (ALFANO 2009; HOGENHOUT *et al.* 2009). So benutzen biotrophe Pilze und Oomyceten u.a. Haustorien zur Infektion und gram-negative Bakterien, etwa *Pseudomonas syringae*, ein Typ III-Sekretionssystem (TTSS), welches Typ III-Effektoren in die Wirtspflanze injiziert und dadurch Pathogenität auslösen kann (Guo *et al.* 2009). Dieses Sekretionssystem wird von bestimmten Bereichen, den „hypersensitive response and pathogenicity“ (*hrp*) und „*hrp* conserved“ (*hrc*) Genen, der Hrp Pathogenitäts-Insel kodiert (Guo *et al.* 2009). Bei suszeptiblen Wirtspflanzen wird die Pathogenität einer kompatiblen Reaktion v.a. durch eine Unterdrückung der angeborenen Immunität („innate immunity“) durch diese Effektoren erreicht

(ABRAMOVITCH *et al.* 2006; ALFANO 2009; HOGENHOUT *et al.* 2009; ALLWOOD *et al.* 2010). In resistenten Pflanzen jedoch können diese Effektoren durch Resistenzproteine (R-Proteine) der Pflanze erkannt werden, wodurch es zu einer effektorabhängigen Immunität („effector-triggered immunity“; ETI) kommt (BRODERSEN *et al.* 2005; JONES and DANGL 2006). R-Proteine werden durch spezifische Resistenz (*R*)-Gene kodiert und es erfolgt eine „Gen für Gen“ Antwort. Die Abwehr wird also nur ausgelöst, wenn das Pathogen ein zu dem *R*-Gen Produkt passendes avirulentes (*Avr*) Genprodukt aufweist (HEATH 2000). *Avrpm1* stellt solch ein Effektorprotein aus *P. syringae* dar. Fehlen entsprechende R-Proteine oder besitzen Pathogene noch zusätzliche potentere Effektoren um die Immunantwort zu unterdrücken, kommt es zur Virulenz und damit zu einer erfolgreichen Infektion (ALLWOOD *et al.* 2010). Dabei weisen die bisher bekannten *avr* Proteine kein gemeinsames Motiv auf. Neben R-Genen sind auch RDR („required for disease resistance“)-Gene bei Abwehrreaktionen kompatibler Pathogene beteiligt (MOREL and DANGL 1997; LAM and FUKUDA 2000).

Ein zweiter Weg der angeborenen Immunität in Pflanzen wird durch konservierte molekulare Strukturen, sogenannte Pathogen- oder Mikrobenassoziierte molekulare Muster („pathogen/microbe-associated molecular patterns“; PAMPs/MAMPs), vermittelt und als PAMP-abhängige Immunität („PAMP-triggered immunity“; PTI) bezeichnet (GUO *et al.* 2009; MILLET *et al.* 2010). Typische MAMPs sind Lipopolysaccharide, Peptidoglycane, Proteine oder Oligosaccharide. Ein besonders gut untersuchtes MAMP ist das bakterielle Protein Flagellin, ein wichtiger Virulenzfaktor (JONES and DANGL 2006). Die Sequenz ist in Eubakterien hochkonserviert und findet sich auch in *P. syringae* (FELIX *et al.* 1999). Ein 22 Aminosäuren langes Konsensusmotiv im N-Terminus des Flagellins, das Peptid flg22, bildet dabei das aktive Epitop und löst spezifische Abwehrreaktionen aus (BAUER *et al.* 2001). In *A. thaliana* wird es durch die Rezeptorkinase FLS2 erkannt (GOMEZ-GOMEZ and BOLLER 2002; GUO *et al.* 2009).

Eine Reihe von Signalwegen der Abwehrreaktionen ist bereits bekannt. Der „oxidative burst“, die transiente inter- und intrazelluläre Bildung von ROS (vor allem H_2O_2 , HO , 1O und O_2^-), ist das bekannteste Merkmal der Pathogenabwehr und meist mit programmiertem Zelltod assoziiert, wobei unklar ist, ob ROS bei der Initiation oder Transduktion (oder bei beiden) beteiligt ist (BAKER and ORLANDI 1995; HEATH 2000; MUR *et al.* 2008). Der „oxidative burst“ weist in den meisten inkompatiblen Pflanzen-Pathogen Interaktionen einen biphasischen Verlauf auf (VAN BREUSEGEM and DAT 2006). ROS werden in Pflanzen durch verschiedene Mechanismen produziert, darunter zellwandgebundene Peroxidasen oder NADPH-Oxidasen in der Plasmamembran (HEATH 2000; MUR *et al.* 2008). Die Elektronentransportketten in Mitochondrien und Chloroplasten sind aber die Hauptlieferanten intrazellulärer ROS (DANON *et al.* 2005; GADJEV *et al.* 2006; MUR *et al.* 2008; CHENG *et al.* 2010). Reaktive Sauerstoffspezies

lösen vermutlich vorwiegend über Lipidperoxidation direkt Zelltod aus (MUR *et al.* 2008). Hydroxylradikale ($\cdot\text{OH}$) entfernen Protonen eines Lipids (L), wodurch eine Lipid-Radikal-Lipid-Hydroperoxid (LOOH) Kettenreaktion ($\text{LH} + \cdot\text{OH} \rightarrow \text{L}\cdot + \text{H}_2\text{O}$; $\text{L}\cdot + \text{O}_2 \rightarrow \text{LOO}\cdot$; $\text{LOO}\cdot + \text{LH} \rightarrow \text{LOOH} + \text{L}\cdot$; etc.) in Gang gesetzt wird (MUR *et al.* 2008). Peroxidation ungesättigter Acylketten („polyunsaturated fatty acids“; PUFAs) in Membranen beeinträchtigen erheblich deren Integrität. Dies wird auch durch Lipoxygenasen (LOX) vermittelt, jedoch sind die genauen Zusammenhänge noch nicht vollständig aufgeklärt (MONTILLET *et al.* 2004; MONTILLET *et al.* 2005). Für einen tieferen Einblick in die Rolle der oxidierten Lipide in Pflanzen-Pathogen-Interaktionen siehe MUELLER (2009).

Auch eine Beteiligung von Glutathion (GSH) bzw. Modifikationen des Redoxstatus sowie Salicylsäure (SA), Jasmonsäure (JA), Ethylen (ET) und Stickstoffmonoxid (NO) in der betroffenen Zelle werden diskutiert (ZEIER *et al.* 2004; VAN BREUSEGEM and DAT 2006; MUR *et al.* 2008). Mitochondrien, aber auch Chloroplasten, scheinen bei diesen Signalwegen eine zentrale und integrative Rolle einzunehmen (HOEBERICHTS and WOLTERING 2003; KAWAI-YAMADA *et al.* 2004; LAM 2004; YAO *et al.* 2004; YOSHINAGA 2005; MOEDER and YOSHIOKA 2008; MUR *et al.* 2008). Auch Sphingolipide werden mit Abwehrmechanismen in Verbindung gebracht und die Applikation von Ceramiden löst einen Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration in Pflanzenzellen aus (TOWNLEY *et al.* 2005). Calciumsignale werden mit Phosphorylierungsprozessen in Verbindung gebracht, was vermutlich wie in tierischen Zellen durch MAP-Kinasen vermittelt wird (HEATH 2000).

1.5. Zelltod in Pflanzen

Zelltod ist ein wichtiger Abwehrmechanismus der Pflanzen-Pathogen Interaktion. Mittlerweile gibt es auch zahlreiche Hinweise auf die Beteiligung von Sphingolipiden in Zelltodprozessen. Um die Bedeutung von Sphingolipiden für diese Prozesse und den Fokus dieser Arbeit besser einordnen zu können ist es allerdings nötig, zuerst die zugrundeliegenden Mechanismen näher zu beschreiben.

Zelltod und PCD

Unter Zelltod werden oft ganz unterschiedliche Prozesse verstanden. Zelltod ist nicht zwangsläufig ein unerwünschter Prozess, der zur Vernichtung eines ganzen Organismus führt. In allen Eukaryoten ist er für eine normale Entwicklung notwendig, aber auch, wie erwähnt, als Abwehrreaktion und Antwort auf eine Vielzahl von biotischen und abiotischen Stressfaktoren nötig (REAPE and MCCABE 2008). In Pflanzen ist PCD etwa für die Ausbildung der Fortpflanzungsorgane oder des Xylems sowie bei der Seneszenz wichtig (GREENBERG 1996; LAM 2004; VAN DOORN and WOLTERING 2004; REAPE and MCCABE 2008). Eine zentrale Rolle spielt PCD

zudem in Pflanzen bei der Bildung des Aerenchyms nach Wasserstress oder bei Pflanzen-Pathogen Interaktionen (PENNEL and LAMB 1997; REAPE *et al.* 2008).

Dieser erwünschte programmierte Zelltod ist eine aktive Form des Zelltodes und basiert auf zelleigenen Mechanismen. Der auslösende Stimulus kann dabei vielfältig sein, etwa endogen durch Stoffwechselfparameter der Zelle selbst, oder exogen durch entwicklungsabhängige Signale oder Umwelteinflüsse (REAPE and MCCABE 2008). Es ist wichtig zu beachten, dass der programmierte Zelltod einerseits durch gewisse Auslöser, andererseits aber auch durch die Absenz spezifischer Überlebenssignale ausgelöst werden kann (MUR *et al.* 2008).

Apoptose, Autophagie und Nekrose

All diese Prozesse, die letztlich zum Tod der Zelle führen, müssen streng reguliert sein, um effektiv und gezielt ablaufen zu können. Besonders gut wurde der Zelltod in tierischen Zellen untersucht und klassifiziert. Um dort die unterschiedlichen Arten des Zelltodes voneinander abzugrenzen, verwendet man drei Kategorien: Apoptose (Typ I), Autophagie (Typ II) und Nekrose (Typ III) (LOCKSHIN and ZAKERI 2004; BRAS *et al.* 2005).

Apoptose bezeichnet dabei den kontrollierten und initiierbaren Zelltod (KERR *et al.* 1972). Der Begriff „Apoptose“ stammt aus dem griechischen (*apo*: weg; *ptosis*: Fall) und beschrieb „herabfallende Blätter“ im Herbst (CASTRO *et al.* 2008). Allerdings ist der Mechanismus, durch den Apoptose zustande kommt, im biologischen Sinn eng gefasst, so dass nur in Zusammenhang mit tierischen Zelltodprozessen von echter Apoptose gesprochen wird. Die spezifischen Merkmale der Apoptose sind ein Abrunden und Schrumpfen der betroffenen Zelle, Kondensation und Fragmentierung des Chromatins und ROS-Produktion, während die Integrität der Plasmamembran bis zum Auflösen der Zelle in apoptotische Körperchen aufrechterhalten wird (KERR *et al.* 1972). Die molekularen Mechanismen, u.a. die Aktivierung von Caspasen und die Bildung eines Apoptosoms, sind dabei sehr gut verstanden, wobei die Mitochondrien und Cytochrom *c* eine zentrale Rolle spielen (ADRAIN and MARTIN 2001; HILL *et al.* 2003; SKULACHEV 2006).

Autophagie bezeichnet spezifisch das katabolische und organisierte Auflösen cytoplasmatischer Komponenten durch die lysosomale Maschinerie, was letztlich zur Zerstörung der betroffenen Zelle führt (REAPE *et al.* 2008), während Nekrose die unphysiologische, unorganisierte und unkontrollierte Form des Zelltodes darstellt (PENNEL and LAMB 1997). Nekrosen entstehen oft durch übermäßigen Stress, wobei die Zelle den apoptotischen Zelltod nicht auslöst. In Folge einer gestörten Osmoregulation kommt es zu einem Wasser- und Ioneneinstrom in die Zelle und damit zu einem Anschwellen während des Zelltodes (LENNON *et al.* 1991). In tierischen Zellen kommt es u.a. durch Nekrosen zu Entzündungsreaktionen (DOONAN 2008).

In Pflanzen existieren ebenfalls verschiedene Arten von Zelltod, welche den tierischen sehr ähnlich sind (HEATH 2000; VAN DOORN and WOLTERING 2005; REAPE and MCCABE 2008; REAPE *et al.* 2008). Es lassen sich ebenfalls aktive Zelltodprozesse, Nekrose und Autophagie unterscheiden, wobei die zugrundeliegenden Mechanismen natürlich auch Unterschiede aufweisen und somit eine Klassifizierung manchmal nicht eindeutig ist (MCCABE *et al.* 1997; REAPE *et al.* 2008; VAN DOORN and WOLTERING 2010). Dies liegt nicht zuletzt an der evolutionären Vergangenheit. Jedoch gibt es auch einige wichtige Unterschiede. Bei Pflanzen spricht man statt von Apoptose von Apoptose-ähnlichem PCD („apoptose like“ PCD; AL-PCD) oder einfach PCD. Auch in Pflanzen ist die Fragmentierung des Chromatins ein typisches Merkmal des PCDs (HOEBERICHTS and WOLTERING 2003). Weiterhin tritt ein Schrumpfen des Protoplasten auf und Caspase-ähnliche Moleküle sowie Mitochondrien sind an der Signalverarbeitung beteiligt (WOLTERING 2004; REAPE *et al.* 2008). Die Bildung apoptotischer Körperchen wie in Tieren gibt es jedoch nicht in Pflanzen, wobei bei manchen Formen des PCD ähnliche Strukturen auftreten können (MUR *et al.* 2008).

Hypersensitive Antwort

Besonders durch Studien an *A. thaliana* wurden die Mechanismen pflanzlichen PCDs eingehend untersucht (MCDOWELL and DANGL 2000; DANGL and JONES 2001; GREENBERG and YAO 2004). Eine wichtige PCD-Form in Pflanzen ist die so genannte hypersensitive Antwort („hypersensitive response“; HR) als Antwort auf invasive Pathogene bei der lokalen und systemischen Resistenz („systemic acquired resistance“; SAR) (HEATH 2000; LAM and FUKUDA 2000; LAM *et al.* 2001). Die HR zeichnet sich durch DNA-Fragmentierung, ROS- und NO-Produktion sowie der Expression spezifischer Abwehrgene aus und basiert v.a. auf den Signalwegen des Lipidhormons Salicylsäure (SA) und der Jasmonate (JA) sowie dem Gas Ethylen (ET) (MOREL and DANGL 1997; RICHBERG *et al.* 1998; RICHAEEL and GILCHRIST 1999; ASAI *et al.* 2000; LAM 2004).

Für einen Überblick zur SAR siehe auch (GRANT and LAMB 2006; JUNG *et al.* 2009). Die hypersensitive Antwort (HR) führt zu einem schnellen lokalisierten Zelltod. Dabei ist die HR nicht nur auf die direkt betroffenen Zellen beschränkt, sondern kann sich auch auf benachbarte Zellen ausweiten. Dadurch entstehen oftmals Läsionen, braune Bereiche toter Zellen.

Eine eindeutige Abgrenzung Pathogen-induzierter HR von anderen PCD- und Abwehrprozessen in Pflanzen ist jedoch oft schwierig. Dies liegt vermutlich an unterschiedlichen Erkennungs- und Signalwegen, die mehr oder weniger stark überlappen können (HEATH 2000). Auch löst der Tod einer Zelle durch HR die Expression von Abwehrgenen und die Aktivierung weiterer Abwehrsignale in benachbarten Zellen aus (LA CAMERA *et al.* 2009).

Welche Signalwege aber auch immer zu Abwehrreaktionen führen, sind sie durch externe Stimuli oder Elicitoren erst einmal in Gang gesetzt, so läuft der Mechanismus stets nach einem

sehr ähnlichen Muster ab. Allerdings gibt es auch hierbei Unterschiede zwischen diversen Pflanzen-Pathogen Interaktionen und viele Mechanismen der HR, welche letztlich zum programmierten Tod der Zelle führen, sind nach wie vor nur ungenügend untersucht (HEATH 2000; LA CAMERA *et al.* 2009).

1.6. Analyse von Sphingolipiden – targeted metabolite profiling

Sphingolipide bilden eine sehr komplexe und große Molekülfamilie, welche besonders in Pflanzen zwischen verschiedenen Organismen, aber auch zwischen einzelnen Zellen eine hohe Diversität aufweisen (MARKHAM and JAWORSKI 2007; PATA *et al.* 2009). In den letzten zwanzig Jahren wurde der Begriff Sphingolipidomics geprägt, der den Versuch beschreibt, Biosynthese, Metabolismus und Funktion der Sphingolipide integrativ zu beschreiben. Dabei soll die Zusammensetzung aller Sphingolipide in jeder Zelle oder jedem Gewebe zu einem spezifischen Zeitpunkt bestimmt werden, um auf die Funktion zu schließen (FUTERMAN and HANNUN 2004).

Dabei gibt es neben globalen Analysemethoden, bei denen nach sämtlichen theoretisch möglichen Molekülen innerhalb eines bestimmten Massenbereichs gefahndet wird, auch gezielte Methoden, sogenannte „targeted metabolite profiling approaches“, wobei nach spezifischen Molekülen gesucht wird (LEE *et al.* 2005; SHULAEV *et al.* 2008). Dieser selektive Ansatz erhöht die Sensitivität und die Präzision der Messung und reduziert die Datenmenge enorm, erfordert aber auch ein gewisses Vorwissen über die zu untersuchenden Moleküle und die Zusammensetzung der Probe und ist eben nicht so umfassend wie ein globaler Ansatz. Je nach Aufgabenstellung muss daher abgewogen werden, welcher Verfahrensansatz geeignet ist. Es hat sich vor allem die mit chromatographischen Methoden gekoppelte Massenspektrometrie als geeignet erwiesen, um diese Molekülklassen analysieren zu können (CAHOON and LYNCH 1991; SULLARDS 2000; NG *et al.* 2001; TERNES 2002; SPASSIEVA and HILLE 2003; BIELAWSKI *et al.* 2006; MARKHAM *et al.* 2006; WANG *et al.* 2006; MARKHAM and JAWORSKI 2007; SHI *et al.* 2007; HAN and JIANG 2009; HAYNES *et al.* 2009). Aktuell werden v.a. LC-MS/MS Methoden zur Sphingolipidanalyse angewendet, wobei der Probenaufarbeitung aufgrund der unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften der SPL besondere Bedeutung zukommt (MARKHAM *et al.* 2006; MERRILL *et al.* 2007; MERRILL *et al.* 2009). Mit Hilfe dieser neuen Methoden lässt sich das breite Spektrum der unterschiedlichen Sphingolipidklassen, wie etwa Sphingobasen, Ceramide und deren Phosphate (ANN and ADAMS 1993; GU *et al.* 1997; MANO *et al.* 1997; LIEBISCH *et al.* 1999; SULLARDS 2000; SULLARDS and MERRILL 2001; HAN 2002; PETTUS *et al.* 2003), Sphingomyeline (KARLSSON *et al.* 1998; ISAAC *et al.* 2003; LIEBISCH *et al.* 2004; MERRILL *et al.*

2005) oder Glycosphingolipide (SUZUKI *et al.* 1989; MERRILL *et al.* 2005; MARKHAM and JAWORSKI 2007; SULLARDS *et al.* 2007), untersuchen.

Dabei ist zu beachten, dass Sphingolipide als Isomere und Stereoisomere vorkommen, was zur Heterogenität der SPL in Pflanzen beiträgt. So ist sowohl die Lage der Doppelbindungen als auch die Stellung der Hydroxylgruppen variabel. In Pflanzen herrschen $\Delta 8$ ungesättigte Sphingobasen vor, während im tierischen System $\Delta 4$ Sphingobasen die Regel sind. *Cis*- und *trans*-Konfiguration der Doppelbindung(en), aber auch *R*- und *S*-Konfiguration der Hydroxylgruppen, sind dabei wohl von essentieller Bedeutung für eine mögliche bioaktive Funktion (IMAI *et al.* 1997; GARTON *et al.* 2003; SPERLING and HEINZ 2003; DUNN *et al.* 2004). Wie bei fast allen aktuell verfügbaren Methoden ist auch bei der in dieser Arbeit angewandten Analytik leider keine Unterscheidung diesbezüglich möglich. Grundsätzlich fehlen auch kommerziell erhältliche Standards für eine erschöpfende Analyse. Weitere Standards und eine Kombination der LC-MS Methodik mit NMR-basierten Untersuchungen würden zur weiteren Aufklärung beitragen.

(U/H)PLC-MS/MS bietet eine hohe Spezifität in der Erfassung einer Vielzahl komplexer Moleküle über deren Molekülmassen und Fragmentierungsmuster. Ebenfalls wird mit dieser Technik ein hohes Maß an Sensitivität erreicht, die es ermöglicht, Komponenten sogar noch im femtomolaren Bereich zu detektieren. Durch die Verwendung nicht endogen vorkommender Sphingolipide als interne Standards ist es zudem möglich, quantitative Aussagen über die analysierten Moleküle zu treffen.

Der Erfolg einer massenspektrometrischen Analyse hängt davon ab, ob die Analyten gut ionisierbar sind und die gebildeten Ionen wiederum charakteristisch für die entsprechende Molekülspezies sind. Sphingolipide lassen sich aufgrund ihrer Aminogruppe sehr gut ionisieren. So ergeben viele komplexe Sphingolipide und freie Sphingobasen im positiven Ionisationsmodus eines Elektrosprayionisations (ESI)-Massenspektrometers $(M + H)^+$ Ionen, während die Phosphatderivate besser im negativen Ionisationsmodus $(M - H)^-$ Ionen bilden. Beim Elektrospray-Verfahren wird eine Lösung des Analyten bei Atmosphärendruck aus einer LC-Kapillare in ein starkes elektrisches Feld versprüht. Die an der Kapillarspitze und einer Gegenelektrode angelegte kV-Spannung ist verantwortlich für die rasche und feine Zerstäubung der aus der Kapillare austretenden Lösung und für die effektive Ionisierung der Analyt-Moleküle. Ab eines Schwellenwerts der angelegten Spannung bildet sich ein stabiler Spray, der je nach Ladungspolarität zur Bildung von positiven bzw. negativen Ionen führt. Diese lassen sich über den Massendetektor analysieren.

Über das Muster der Fragmentierung eines Sphingolipidmoleküls während des MS/MS Experiments können letztlich freie Sphingobasen identifiziert werden. Auch komplexe Sphingolipide lassen sich bezüglich ihrer Zusammensetzung analysieren, um etwa das

Sphingobasenrückgrat, die Fettsäurekomposition und die Beschaffenheit der polaren Kopfgruppe zu bestimmen.

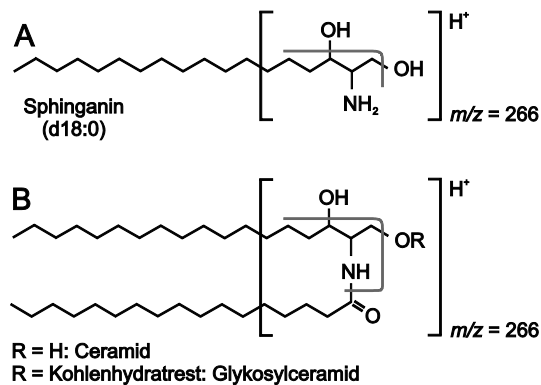


Abbildung 4: Mögliche Sphinganine (A) und (Glc-)Ceramid (B) Fragmente, wie sie im positiven Ionisationsmodus eines ESI-MS/MS Experiments erzeugt werden. Gezeigt sind jeweils die Orte der Spaltung im Molekül (graue Linie). R: Rest. m/z: Masse/Ladung. Verändert nach MERRILL (2005).

Abbildung 4 zeigt stellvertretend Fragmentierungen von Sphinganine und Ceramiden mit dem entsprechenden Masse zu Ladungsverhältnis für die Detektion. Charakteristisch für die Fragmentierung der Sphingolipide ist eine Dehydratisierung der Moleküle und ein Verlust der polaren Kopfgruppen, was über mehrere Schritte abläuft (siehe Abbildung 5).

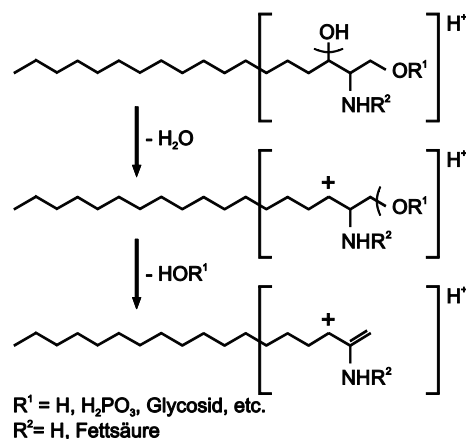


Abbildung 5: Fragmentierung von Sphingolipiden im Massenspektrometer. Zuerst erfolgt eine Dehydratisierung der freien Hydroxylgruppe, gefolgt von einem weiteren Wasserverlust bzw. der Abspaltung der polaren Kopfgruppe. R: Rest. Verändert nach MERRILL (2005).

Durch Veränderung bestimmter MS/MS Parameter erreicht man eine einfache oder zweifache Dehydratisierung bzw. eine zusätzliche Abspaltung der polaren Kopfgruppe und der Fettsäure. In dieser Arbeit wurden die MS/MS Parameter so gewählt, dass ein einfacher Wasserverlust, bzw. ein Verlust der Fettsäure oder der Phosphatgruppe bei Phosphatderivaten im „MRM“ Scan-Modus detektiert wurde.

1.7. Ziele der Arbeit

Der programmierte Zelltod (PCD) ist ein essentieller und komplexer Vorgang in allen Eukaryoten. Dabei gibt es zwischen Pflanzen und Tieren neben vielen Gemeinsamkeiten aber auch einige Unterschiede. Die hypersensitive Antwort (HR) ist eine Form von PCD und tritt in Pflanzen häufig als Abwehrreaktion gegen Pathogene auf. Trotz intensiver Forschung sind immer noch einige Lücken im Wissen um Signalwege und Regulationsmechanismen der HR in Pflanzen vorhanden. Vieles spricht dafür, dass Lipide bzw. Membranen und damit verbundene Proteine wichtige Aufgaben bei der Pathogenperzeption sowie der Signalverarbeitung und der Signalweiterleitung, Regulation und Ausführung von HR/PCD-Prozessen in Pflanzen übernehmen (REAPE *et al.* 2008).

In Tieren, aber auch in Pflanzen, konnte die Beteiligung von Sphingolipiden an Zelltodreaktionen nachgewiesen werden. Dabei war man lange auf molekularbiologische Untersuchungen und die Verwendung artifizierlicher Systeme und von *in vitro* Untersuchungen begrenzt. Die komplexen Biosynthese-, Metabolismus- und Regulationsmechanismen wichtiger Signalmoleküle sowie funktionelle Redundanz erschweren allerdings diese Ansätze. Erst durch die seit kurzem verfügbaren verbesserten Massenspektrometriemethoden ist es möglich die wichtigste Ebene bei Signalprozessen, das Metabolom und damit Sphingolipide und ihre Funktionen in Zelltodreaktionen, diesbezüglich umfassend zu untersuchen.

Ziel dieser Arbeit war, die Bedeutung von Sphingolipiden in der Pflanzen-Pathogen Interaktion zu charakterisieren. Hierzu wurde als Modellsystem die Interaktion von *Arabidopsis thaliana* mit dem Pflanzenpathogen *Pseudomonas syringae* zu Grunde gelegt.

Zuerst sollte eine Extraktionsmethodik und Analytik etabliert werden die es ermöglicht, Sphingolipidspezies präzise zu quantifizieren. Durch Einsatz geeigneter interner Standards und eines „targeted metabolite profiling approaches“ sollten gezielt solche putativ an Signalprozessen beteiligte SPL erfasst werden.

Diese Analytik sollte helfen, spezifische Aspekte der Pflanzen-Pathogen Interaktion in *A. thaliana* zu untersuchen. Die Mechanismen und zellulären Grundlagen von pflanzlichen Abwehrreaktionen sind bisher nicht vollständig bekannt. Einerseits sollte daher untersucht werden, ob SPL nach Pathogeninfektion an Erkennungs- sowie Abwehrreaktionen beteiligt sind. Neben der Notwendigkeit, dazu möglichst viele und frühe Zeitpunkte nach einer Infektion zu analysieren, spielt auch die Erfassung der komplexen Regulation der Homöostase verschiedener SPL eine Rolle. Dabei könnten SPL der Signalweiterleitung in diversen Metabolismuswegen, aber auch direkt als Signale in aktiven Zelltodprozessen dienen.

Andererseits sind auch die Biosynthese- und Metabolismuswege der SPL selbst noch nicht umfassend aufgeklärt. Durch den Einsatz von Inhibitoren und Mutanten sollten diese weiter

aufgeklärt sowie spezifische an den putativen Signalprozessen beteiligte Enzyme identifiziert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien, Enzyme, Verbrauchsmaterial

Handelsübliche Chemikalien wurden, soweit möglich, in höchster Reinheit von folgenden Herstellern bezogen: AppliChem (Darmstadt), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Deisenhofen) oder VWR (Darmstadt).

Lösungen und Reaktionsansätze wurden stets mit Wasser angesetzt, welches durch einen Millipore-Ionenaustauscher gereinigt wurde (Millipore, USA).

Bei Ribonukleinsäure-Analysen (RNA) wurden die Lösungen und Reaktionsansätze mit DEPC-H₂O behandelt. Dazu wurde 1 l H₂O mit 100 µl DEPC über Nacht (üN) inkubiert und das DEPC anschließend durch Autoklavieren inaktiviert.

Antibiotika

Alle Antibiotika wurden von AppliChem (Darmstadt) bezogen.

Stocklösung		Endkonzentration
Ampicillin	(100 mg/ml)	100 µg/ml
Rifampicin	(30 mg/ml)	50 µg/ml
Tetracyclin	(5 mg/ml)	10-50 µg/ml

Enzyme und Puffer

DNase I Amplification Grade	Invitrogen (Karlsruhe)
M-MLV Reverse-Transcriptase	Promega (Mannheim)
ABsolute™ QPCR SYBR® Green Mix	Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe)
Taq-DNA-Polymerase	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
2 x Rapid Ligation Buffer	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)

Labogeräte

Absorptionsmessung	RNA/DNA Calculator Gene Quant (Pharmacia Biotech, Schweden)
	Gene Quant Pro (Amersham Biosciences, USA)
	NanoDrop ND-2000 (PEQLAB, Erlangen)

Autoklaven	Systec 5075ELV (Tuttnauer, USA)
Chlorophyllfluoreszenz- Messung	IMAGING PAM, Modell: IMGA-K (Walz, Effeltrich)
Gefrierschränke	-20 °C-Gefrierschrank (Liebherr, Ochsenhausen) -80 °C-Gefrierschrank (New Brunswick Scientific, Nürtingen)
Gefriertrocknung	Alpha 2-4 (Heraeus-Christ, Osterode)
Geldokumentation	UV-Systeme (INTAS, Göttingen)
HPLC-System	600E Multisolvent Delivery System; 717plus Autosampler; 474 Scanning Fluorescent Detector (alle Waters, USA)
Inkubatoren, Schüttler und Heizschränke	diverse (Heraeus, Hanau; GFL, Burgwedel; VWR, Darmstadt) Multitron II (Infors-HT, Schweiz)
Klimaschränke	diverse (Percival, USA)
Kugelmühle	MM 301 (Retsch, Haan)
Leitfähigkeitsmessung	B-173 TwinCond (Horiba, UK)
Lumineszenzmessung	Micro Beta JET 1450 LSC & Luminescence Counter (Perkin Elmer/Wallac, USA)
Massenspektrometer	Quattro Premier XE tandem quadrupole mass spectrometer (Waters/Micromass, USA)
Messen/Wiegen	0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl Einkanalpipetten Eppendorf Research Variabel (Eppendorf, Hamburg) Analysenwaage BP211D und Laborwaage 1600 (beides Sartorius, Göttingen)
PCR- Geräte	LightCycler (Roche, Penzberg) Realplex Thermal Cycler und Realplex2 Mastercycler egradient S (beides Eppendorf, Hamburg) PCR Express/Sprint (Thermo Hybaid, Garching)
pH-Messung	HI 9321 Microprocessor pH-Meter (Hanna Instruments, Portugal)
Probenkonzentrierung	Rotationsvakuumkonzentrator RVC2-18 und RVC 2-25 (beides Heraeus-Christ, Osterode) jeweils mit Membranvakuumpumpe MZ 2C (Vakuubrand, Wertheim)
Reinstwasseranlage	RiOs™/Milli-Q® Water Purification System (Millipore, Schwalbach)
Spektralphotometer	RNA/DNA Calculator Gene Quant (Pharmacia Biotech, Schweden) Gene Quant Pro (Amersham Biosciences, USA.) NanoDrop ND-2000 (PEQLAB, Erlangen)
Sonifizierung	diverse Ultraschallbäder (VWR, Darmstadt) Sonifier (Branson, USA)
Thermoblöcke, Wasserbäder, Magnetrührer, Tischschüttler	diverse (IKA, Staufen; VWR, Darmstadt) Vortex Genie 2 (Scientific Industries, USA) Thermo Stat Plus (Eppendorf, Hamburg)
UPLC	ACQUITY UPLC System (Waters, USA)
Zentrifugen	Centrifuge 5415C, 5417R und 5804 (alle Eppendorf, Hamburg) Minifuge RF (Heraeus, Hanau)

Spezielle Chemikalien, Materialien und Kits

Agarose LOW EEQ	AppliChem (Darmstadt)
Bacto-Agar	AppliChem (Darmstadt)
BCA Protein Assay Reagent Kit	Thermo-Fischer (Karlsruhe)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Coomassie Brilliant Blau R250	AppliChem (Darmstadt)
Desoxynucleotide	MBI Fermentas (St. Leon-Roth)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	AppliChem (Darmstadt)
GeneRuler 100 bp DNA-Ladder	MBI Fermentas (St. Leon-Roth)
E.Z.N.A.® Plant RNA Kit	OMEGA bio-tek / VWR(Darmstadt)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem (Darmstadt)
Gene Ruler 1 kb DNA Ladder 0,5 µg/µl	MBI Fermentas (St. Leon-Roth)
Glycerin 98%, wasserfrei	AppliChem (Darmstadt)
Hefeextrakt	AppliChem (Darmstadt)
Meerrettich-Peroxidase	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Murashige & Skoog (MS) Salze	Duchefa (Haarlem, NL)
N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid (CTAB)	AppliChem (Darmstadt)
N-Lauroylsarcosyl	AppliChem (Darmstadt)
o-Phthaldialdehyde (OPA)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Percoll	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
pGEM®-T-easy Vektor	Promega (Mannheim)
PMSF	AppliChem (Darmstadt)
Proteose Peptone 3	BD (Spark,USA)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
Sodiumdodecylsulfat	AppliChem (Darmstadt)
s-Mercaptoethanol	Merk (Darmstadt)
Trypton	AppliChem (Darmstadt)

pGEM-T-easy

Dieser linearisierte Vektor wurde zur Klonierung von PCR-Produkten verwendet. Er weist eine Größe von 3015 bp auf und trägt an den 3'-Enden jeweils einen Thymidinüberhang. Der Vektor enthält die T7 und SP6 RNA Polymerase Promotoren, welche eine MCS flankieren und das Gen für die Ampicillin-Resistenz.

Weitere Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte standen entsprechend der Standardausstattung eines molekularbiologischen und analytischen Labors zur Verfügung.

2.1.1. Nährmedien

King`s-B-Medium (KB-Medium) (KING <i>et al.</i> 1954)	40 g/l Proteose Peptone 3; 20 g/l Glycerin 10 ml/l MgSO ₄ (10% m/v); 10 ml/l K ₂ HPO ₄ (10% m/v) für Festmedium: 15 g/l Agar
Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) (SAMBROOK <i>et al.</i> 1989)	10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl pH 7.0 für Festmedium: 15 g/l Agar
Murashige-Skoog-Medium (MS-Medium) (MURASHIGE and SKOOG 1962)	4,8 g/l MS-Salze (inkl. MES); 30 g/l Saccharose; 0,1 g/l myo-Inositol; 1 ml/l B5-Vitamine pH 5,7 + 0,3 für Festmedium: 11 g/l Agar
Pilz-Minimalmedium	1 g NaOH; 3 g DL-Äpfelsäure; 2 g NH ₄ NO ₃ 0,1 g MgSO ₄ für Festmedium: 39 g/l Bacto-Agar

Alle Medien wurden 20 min bei 121°C und 2 bar autoklaviert. Die nicht autoklavierbaren Komponenten, wie die verwendeten Antibiotika, wurden vor Zugabe zum Medium sterilfiltriert.

2.1.2. Puffer- und Extraktionslösungen

Pufferlösungen für die molekularbiologischen Untersuchungen wurden in der Regel in zehnfacher Konzentration (10 x) angesetzt. Soweit möglich, wurden sämtliche Puffer und Lösungsmittelgemische autoklaviert (30 min 121°C, 2 bar) oder sterilfiltriert. Die jeweiligen pH-Werte wurden entweder mit HCl, KOH oder NaOH eingestellt.

DNA-Extraktionspuffer	0,22 M Tris-HCl pH 7,8; 0,022 M EDTA; 0,8 M NaCl; 0.14 M Mannitol; 1% N-Laurylsarcosin; 0,8% CTAB in H ₂ O; frisch 14 µl/10 ml β-Mercaptoethanol zugeben
FA-Puffer	20 mM MOPS; 5 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA; 1 M NaOH in H ₂ O; pH 7,0
TAE	40 mM Tris-Acetat; 1 mM EDTA in H ₂ O

6 x DNA-Probenpuffer	0,25% Bromphenolblau w/v; 0,25% Xylencyanol F w/v; 30% Glycerin v/v in H ₂ O
5 x RNA-Probenpuffer	40% 10 x FA-Puffer v/v; 30,8 % Formamid v/v; 20% Glycerin v/v; 7,2% Formaldehyd v/v; 0,8% EDTA v/v; 0,16% Bromphenolblau-Lösung v/v
SPL Extraktionslösung	55% Isopropanol v/v; 20% n-Hexan v/v; 25% H ₂ O v/v
LC-MS Probenlösungsmittel	90% Methanol v/v; 10% H ₂ O v/v
Luminollösung	20 µg/ml Luminol; 20 µg/ml Meerrettichperoxidase; 2% DMSO v/v in H ₂ O
Methylaminlösung	70% Methylamin (33%ig in Ethanol) v/v; 30% H ₂ O v/v
OPA-Reaktionsmix	5 mg <i>o</i> -Phthaldialdehyd (in 100 µl Ethanol); 9,9 ml Boratpuffer (3% Borsäure in H ₂ O w/v); 5 µl β- Mercaptoethanol; pH 10,5

2.1.3. Primer

Die Primer zur Überprüfung der T-DNA-Mutanten sind für eine Annealing Temperatur von 54,4 °C optimiert, die Sequenzen wurden mit der Online Software SIGnAL T-DNA Express (SALK Institute; <http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) erhalten (Tabelle 1).

Tabelle 1: Primer zur Überprüfung der T-DNA Mutanten. LP: linker-Primer (forward); RP: rechter-Primer (reverse); LB: Left-Border Primer; bp: Basenpaare

Name	Gen / Mutante	Primersequenz LP/RP (je 5'→3')	LP + RP (bp)	LB + RP (bp)
CA1a (3) Ceramidase	At4g22330 SALK_032990	ACATTGGAAGAACAACAAGCG TTGGTTTCAAGGTCCACTACG	1028	513-813
CA2a (19) Ceramid-Glucosyltransferase	At2g19880 SALK_005521	TGTCGCAGGGTCACTAAAAAG ACGAAAGGATATGGGACCAAC	1153	585-885
CK1 a (1) Ceramid-Kinase	At5g51290 SALK_017173	CCAAAACCTGAGCACCAGAAG ATGGGTTACAGGCACCTAACC	983	472-772
CS1a (33) Ceramid-Synthase	At1g13580 SALK_150849	GACTTGGCCTGATCAACAAAC GTTCCATGAGTTGGTCCAATG	1106	498-798
CS2a (24) Ceramid-Synthase	At3g19260 SALK_018608c	CCAGGAGTTCAATGCTTCAAC ATGCTGCTTGTGACTTTTTCG	969	436-736

CS3b (29) Ceramid-Synthase	At3g25540 SALK_043676	ATTGGTTTCAGTCTTCTCGGC TCCACTTTAGCGTTTGTCTTG	1229	544-844
CH1a (28) Ceramid-α-Hydroxylase	At2g34770 SALK_025578c	AACGAACCTGATGGATCTCAG TCGTCCATTCTTCTCTGTG	1088	516-816
CH2b (32) Ceramid-α-Hydroxylase	At4g20870 SALK_011293	CTCCAAGAATAGCAGGTGCTG ATGAGCAGAATTTTGCAGCAC	1193	521-821
DA1a (4) Desaturase (4 E)	At4g04930 SALK_107761	AGGTTGTGCGAAGAAACAAACG TGATGAACTCCCAGTAGCCAG	993	460-760
DA2a (11) Desaturase (8-E/Z)	At2g46210 SALK_013243	ACCGGTATACACATCTGCTGC TTTCTCTGGTTCATCAATGGC	1036	491-791
DA2b (22) Desaturase (8-E/Z)	At2g46210 SALK_013243c	ACCGGTATACACATCTGCTGC TTTCTCTGGTTCATCAATGGC	1036	491-791
DA2c (34) Desaturase (8-E/Z)	At2g46210 SALK_016492c	AACTGAACATGTTGAATCGCC TTCGAACATCGATTCCAAAAC	1188	597-897
DA3a (17) Desaturase (8-E/Z)	At3g61580 SALK_131851	TAAACCGGATAAAGGAAACCG GTGGTTCAAGAGCTTTGCAAG	1086	492-792
DA3b (27) Desaturase (8-E/Z)	At3g61580 SALK_046300	TAAACCGGATAAAGGAAACCG GTGGTTCAAGAGCTTTGCAAG	1086	507-807
HA1a (2/SBH2-2) Hydroxylase (C4)	At1g14290 SALK_032139	TTTCTAATCATATTTTCACCATT CG CACCAAATGTGTCCACAATTG	1173	582-882
HA1c (SBH2-1) Hydroxylase (C4)	At1g14290 SALK_047916	TACTTTGATTGGCCGTGTTTC ATGTTGTTGCCTCCTTGTC C	1149	530-830
HA2a (9/SBH1-1) Hydroxylase (C4)	At1g69640 SALK_090881	TTCTGTGATTTGGCAATAGGG CTTGAGAAGAAACGCAAAACG	1153	563-863
HA2b (30) Hydroxylase (C4)	At1g69640 SALK_023550	TCAAGAATGGCCTCGTAGATG TGGTTTGAATTCGTCTGATCC	995	452-752
SK1 a (6) S1P-Kinase	At4g21540 SALK_009027	GCAATGGTCGAGTTTGAATC GCATAGACGAACCAGACAAGG	998	447-747
SK1 b (10) S1P-Kinase	At4g21540 SALK_000250	AATACAGATTCCGAAGGCTCG TCCATTTTGATCGATGAGAGG	1137	524-824
SK1 c (14) S1P-Kinase	At4g21540 SALK_022916	CCTCCTTTCTCAACCAAGGTC TGATCAAAGGCCTTGATGTC	1097	580-880
SK1d (23) S1P-Kinase	At4g21540 SALK_000250c	AATACAGATTCCGAAGGCTCG TCCATTTTGATCGATGAGAGG	1137	524-824
SK2 a (15) S1P-Kinase	At5g23450 SALK_022769	TCCCCTCAACACAAATAATTC GACGTTTAGGTTTTTGCTCCC	1225	574-874
SK2 b (16) S1P-Kinase	At5g23450 SALK_152371	ACACGAGACAGCGTCCAATAG TTTCGCCCTATTTTGTTAGG	1233	546-846

SK2 c (21) S1P-Kinase	At5g23450 SALK_152371c	ACACGAGACAGCGTCCAATAG TTTCGCCCTATTTTGGTTAGG	1233	546-846
SK3a (5) S1P-Kinase	At2g46090 SALK_129175	ACGTAATTGGTGCCTACAAG AAAGGCAGGATTTTACGCTTC GCAACTCACTCCAGTTGCTTC	1071	423-723
SK3b (25) S1P-Kinase	At2g46090 SALK_053022c	GAAGCAGTGGAGCGCATTGC TGGCACCCGGTAACACCTGA	956	440-740
SL1a (8) S1P-Lyase	At1g27980 SALK_093662	CATGCCATCACACATAGCAAC ATCCATGTTGATTCAAGCTCG	1161	546-846
SL1b (20) S1P-Lyase	At1g27980 SALK_093662c	CATGCCATCACACATAGCAAC ATCCATGTTGATTCAAGCTCG	1161	546-856
SL1c (31) S1P-Lyase	At1g27980 SALK_078119	TATTTGGATGGTCCAAGCTTG GCCATTACAGGAACAATCTGC	1170	573-873
SP2a (13) S1P-Phosphatase	At5g03080 SALK_055510	TTCGATAATTTAGGTGGCTG TCGCTAGTCTCAGAGACAGCC	1099	440-740
SP1a (7) S1P-Phosphatase	At3g58490 SALK_035202	ATTGGCAGCAATCACAAAATC GGCAGTAATCCTTCTAACCGG	1156	525-825
SP1b (26) S1P-Phosphatase	At3g58490 SALK_048908	GGCTTGGTGCTCGTTGGTATTG GAGACAAGTGTTATGACCTC	1128	602-902
LB_a1 pBIN-pROK2 für SALK Linien		TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG		
LB_b1 pBIN-pROK2 für SALK Linien		GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT		
LB_b1.3 pBIN-pROK2 für SALK Linien		ATTTTGCCGATTTTCGGAAC		

Die Primer für die qRT-PCR wurden mit Hilfe der Programme LightCycler Probe Design Version 1.0 (Roche) und OLIGO Version 6.63 (Molecular Biology Insights Inc., Cascade, USA) entworfen und anschließend von TibMolBiol (Berlin) synthetisiert. Sequenzierungsprimer wurden vom Lehrstuhl für Botanik I, Julius-von-Sachs-Institut (Würzburg) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 2: Sequenzierungsprimer, RT-PCR und qRT-PCR-Primer. LP: Left-Border Primer; RP: Right-Border Primer

Name	Primersequenz	LP/RP (je 5'→3')
Oligo-dT-5' CDS Primer		
Actin 2/8	GGTGATGGTGTGTCT ACTGAGACAATGTTAC	
T7 hat (für pGEM-T-Easy); Sequenzierungsprimer	TAATACGACTCACTATAGGG	
SP6ht(für pGEM-T-Easy) Sequenzierungsprimer	ATTTAGGTGACACTATAGAATAC	
SAG13	TGTCCTTGGTATATCACAAC TTCATAGATTATGGATGCGG	
DA1a	TCTTGTACCCTCAGATTAG/GAACAAACAATAATGGGGA TTCGGTGTAAAGTAGGAAC/TTGCGAAAATACCGAGACA	
DA2a	AGATACGTTACAAGCGAG CTCTCACGTGATAGCCAT	
DA2b	GACTCTTACACTCACG CGTTTCGAGAATAGCAAT	
DA2	AGATACGTTACAAGCGAG CTCTCACGTGATAGCCAT	
DA3a	ACACTTACTTATTATCCAG CCAGTTTGGTAGACATGAG	
DA3b	TGAAGCAAATGTGTTGACC CGCAAACCACAAAGTAAGT	
CA1a	CTCCCTTATGTCAAGATCG ACCAAACACAGGAAAACCA	
CS1a	TTAACTCTCCTATATTGC GAATCTGCGAATATGTAA	
CS2a	GATGTCTACCATGTAAT GCACAAATGAGATACCAC	
HA1a	TAAATCTGCCGTCGTTAAGG TAAGGCACAATAAGGCGATG	
HA2a	CTATCCTTTTGTTACGG/TGGCTACCTGGAACTTAT CATATGCATAAGGGACGA/GGGCAGATACATAACATA	
HA2b	TTCTGGCTAGGCAGTTTAT CAATGAATAAGGCAAGTAAG	
SL1a	ATCTGGTAGCAGCTCTAAG CCGACTCAGGTATAATCAT	
SL1c	TTATCGGATCTGTGTTTGGC ACTCGGCTCCACCTATGTAT	
SBH1	CTATCCTTTTGTTACGG CATATGCATAAGGGACGA	
SBH2	AAATCTGCCGTCGTTAAGG TAAGGCACAATAAGGCGATG	

2.1.4. Sphingolipide und Toxine

Sphingolipide und Toxine wurden von Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA), Sigma-Aldrich (Deisenhofen) oder Biomol (Hamburg) bezogen. Stocklösungen und Arbeitslösungen wurden bei -20 °C gelagert. Für Stocklösungen (1 bzw. 2 mg/ml) wurden LCBs und Ceramide in Chloroform:Methanol (50:50; v/v), GlcCer und SPL-Ps in Chloroform:Methanol:H₂O (25:50:25;

v/v/v) gelöst. Bei Bedarf wurden die SPL-Lösungen vor Verwendung 3 min bei 60 °C inkubiert und anschließend 2 min im Ultraschallbad sonifiziert.

Tabelle 3: Sphingolipidstandards und verwandte Substanzen

Substanz	Bezeichnung	MW	CAS-Nummer
[C17]-D-erythro-Sphingosin	d17:1 ^{Δ4}	285,3	6918-48-5
D-erythro-Sphingosin	d18:1 ^{Δ4} (Sphingosin)	299,3	123-78-4
D-erythro-Sphinganin	d18:0 (Sphinganin)	301,3	764-22-7
D-ribo-4-hydroxysphinganin	t18:0 (Phytosphingosin)	317,2	388566-94-7
[C20]-D-erythro-Sphingosin	d20:1 ^{Δ4}	327,3	6918-49-6
[C20]-D-erythro-Sphinganin	d20:0	329,3	24006-62-0
[C17]-D-erythro-Sphingosin-1-Phosphat	d17:1 ^{Δ4} -P	365,2	474923-27-8
D-erythro-Sphingosin-1-Phosphat	d18:1 ^{Δ4} -P	379,3	26993-30-6
D-erythro-Sphinganin-1-Phosphat	d18:0-P	381,3	19794-97-9
D-ribo-4-hydroxysphinganin-1-Phosphat	t18:0-P	397,26	383908-62-1
[C20]-D-erythro-Sphingosin-1-Phosphat	d20:1 ^{Δ4} -P	407,3	799812-75-2
[C20]-D-erythro-Sphinganin-1-Phosphat	d20:0-P	409,3	436846-91-2
N-octanoyl 4-hydroxysphinganin	t18:0-c8:0	443,4	475995-74-5
N-decanoyl-D-erythro-Sphingosin	d18:1 ^{Δ4} -c10:0	453,4	111122-57-7
N-lauroyl-D-erythro-Sphingosin	d18:1 ^{Δ4} -c12:0	481,5	74713-60-3
N-stearoyl-D-erythro-Sphinganin	d18:0-c18:0	567,6	2304-80-5
N-stearoyl 4-hydroxysphinganin	t18:0-c18:0	583,6	475995-75-6
N-lauroyl-Ceramid-1-Phosphat	d18:1 ^{Δ4} -c12:0-P	578,4	799812-62-7
D-glucosyl-β-1,1' N-lauroyl-D-erythro-Sphingosin	d18:1 ^{Δ4} -c12:0-Glc	643,5	111956-48-0
N-nervonoyl-D-erythro-Sphingosin (15Z)	d18:1 ^{Δ4} -c24:1 ^{15Z}	647,6	54164-50-0
N-lignoceroyl-D-erythro-Sphingosin	d18:1 ^{Δ4} -c24:0	649,6	102917-80-6
N-nervonoyl-D-erythro-Sphinganin (15Z)	d18:0-c24:1	649,6	352518-80-0
N-lignoceroyl-D-erythro-Sphinganin	d18:0-c24:0	651,7	6063-36-1
Glucocerebrosid (Soja, 98%)	d18:2 ^{Δ4Δ8} /16:0	714,0	497155-61-0
(2S,3R,4R,6E)-2-Amino-3,4-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)-14-oxo-6-eicosenoic acid	Myriocin aus <i>Mycelia sterilia</i>	401,5	35891-70-4
Fumonisin B1 (FB1)	Fumonisin B₁ aus <i>Fusarium</i>	721,8	116355-83-0
Macrofusin	<i>moniliforme</i>		

2.1.5. UPLC-ESI-MS/MS Eluenten

UPLC-ESI-MS/MS Eluent A	58% Methanol v/v; 41% H ₂ O v/v; 1% HCOOH v/v; 5 mM HCOONH ₄
UPLC-ESI-MS/MS Eluent B	99% Methanol v/v; 1% HCOOH v/v; 5 mM HCOONH ₄

2.1.6. Organismen und Wachstumsbedingungen

2.1.6.1. Pflanzenmaterial

Für alle durchgeführten Experimente kamen *Arabidopsis thaliana* Pflanzen des Ökotypus Columbia 0 zum Einsatz. Alle Mutanten waren ebenfalls in diesem Hintergrund und wurden vom European Arabidopsis-Stock Center NASC (<http://arabidopsis.info/>) bezogen (Tabelle 10). Die Mutanten *sbh1-1*, *sbh2-1* und die SBH-RNAi-Linien wurden freundlicherweise von Ming Chen (Donald Danforth Plant Science Center, Saint Louis, USA) und Ed Cahoon (Department of Biochemistry, University of Nebraska-Lincoln, USA) zur Verfügung gestellt und wurden bereits charakterisiert (CHEN *et al.* 2008).

Die Pflanzenanzucht erfolgte für 4–6 Wochen unter 9 h/15 h Kurztagbedingungen bei 22 °C Tages- und 20 °C Nacht-Temperatur (65% Luftfeuchtigkeit) in den Klimakammern 1-3 des Instituts für pharmazeutische Biologie der Universität Würzburg bzw. in Klimaschränken.

Die Induktion der Blütenbildung zur Ernte von Samen erfolgte unter 16 h/8 h Langtagbedingungen. Zur Samenernte wurden die Blütenstände nach der Reifung der ersten Schoten in Papiertüten gesteckt. Nach der vollständigen Abreifung der Blütenstände wurden die Samen mittels eines Siebes von anderen Pflanzenteilen gereinigt, in Reaktionsgefäße abgefüllt und vor einer erneuten Aussaat mindestens zwei Wochen bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

2.1.6.2. Bakterien, Pilzstämme und Pathogene

P. syringae pv. *tomato* DC3000 und DC3000 avrRpm1 stammten von Brian Staskawicz (Department of Plant and Microbial Biology, Berkeley, USA).

Escherichia coli TOP10 wurden von Invitrogen (Karlsruhe) bezogen und am Institut für Pharmazeutische Biologie kultiviert.

Tabelle 4: Eingesetzte Mikroorganismen und deren Resistenzen

Organismus	Resistenz	Abkürzung
<i>Escherichia coli</i> TOP10	Ampicillin	
<i>Pseudomonas syringae</i> DC3000 pv. <i>tomato</i>	Rifampicin	<i>Pst vir</i>
<i>Pseudomonas syringae</i> DC3000 pv. <i>tomato</i> avrRpm1	Rifampicin; Tetracyclin	<i>Pst avr</i>
<i>Pseudomonas syringae</i> DC3000 pv. <i>maculicola</i>	Rifampicin	<i>Psm vir</i>

<i>Pseudomonas syringae</i> DC3000 <i>pv. maculicola avrRpm1</i>	Rifampicin; Tetracyclin	<i>Psm avr</i>
<i>Pseudomonas syringae</i> DC3000 <i>pv. tomato hrpA</i>	Rifampicin; Kanamycin	<i>Pst hrpA</i>
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> N 1980		

Anzucht und Kultivierung der Bakterienstämme erfolgte auf KB- oder LB-Agarmedium (siehe 2.1.1) bei 28 °C, stets mit entsprechenden Antibiotika (Tabelle 4).

Kulturen wurden bis zu 2 Wochen auf KB-Agar-Medium bei 4 °C aufbewahrt. Zur langfristigen Aufbewahrung von Bakterien wurden Glycerinkulturen angelegt. Hierfür wurden 400 µl einer frischen Bakterienkultur mit 300 µl einer 50%igen sterilen Glycerinlösung versetzt, gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

Suspensionskulturen wurden über Nacht bei 28 °C (350 rpm) in flüssigem KB-Medium inkubiert. Der necrotrophe Ascomycet *Sclerotinia sclerotiorum* N 1980 (GODOY *et al.* 1990) wurde auf Pilz-Minimalmedium kultiviert.

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. Quantifizierung von DNA bzw. RNA

Die Konzentration von Nukleinsäuren in wässriger Lösung kann durch photometrische Messung bei 260 nm bestimmt werden. Eine Absorption von 1 bei 260 nm entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml einzelsträngiger RNA. Die Quantifizierung genomischer DNA oder Gesamt-RNA wurde an einem Spektralphotometer durchgeführt.

2.2.2. RNA-Extraktion

Die Extraktion von Gesamt-RNA erfolgte nach Herstellerangabe mittels E.Z.N.A.® Plant RNA Kit. Jeweils wurden etwa 50-100 mg gefrorenes oder gefriergetrocknetes Blattmaterial verwendet. Die RNA wurde in 20-50 µl DEPC-H₂O gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.3. DNase Verdau und Fällung der RNA

Um eventuelle Kontaminationen genomischer DNA aus der isolierten RNA zu entfernen, wurde mit je 1 µg RNA ein DNase I Verdau nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Fällung erfolgte in bei -20 °C. Die RNA wurde anschließend zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet, in 7 µl DEPC-H₂O gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.4. cDNA-Synthese

Die reverse Transkription von RNA → DNA wurde mit Hilfe der M-MLV Reverse-Transcriptase nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Je Ansatz wurden ca. 2,5 µg RNA und 40 pmol Oligo-dT-5`CDS Primer eingesetzt und anschließend 20-fach in Wasser für die RT-PCR verdünnt.

2.2.5. DNA Extraktion

Zur Isolation von genomischer DNA aus *A. thaliana* Blattmaterial wurde eine Hexadecyltrimethyl-Ammoniumbromid (CTAB)-Methode angewandt.

50-100 mg frisches Blattmaterial wurde in ein 2 ml Schraubdeckelgefäß gefüllt, sofort in flüssigem N₂ gefroren und mittels einer vorgekühlten Kugelmühle zerkleinert (70 s; 24 Hz). Das zerkleinerte Blattmaterial wurde mit 750 µl DNA-Extraktionspuffer (siehe 2.1.2) sowie 750 µl Chloroform für 60 min bei 65 °C im Wasserbad inkubiert.

Die zwei Phasen wurden durch Zentrifugation bei 7500 x g für 10 min bei RT getrennt. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen, mit einem gleichen Volumenanteil Isopropanol versetzt, gemischt und die ausfallende genomische DNA durch Zentrifugation gefällt (4 °C, 12000 x g, 10 min). Nach zwei Waschschrritten mit 75%igem Ethanol wurde die DNA bei RT getrocknet und in 50 µl Wasser gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.2.6. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente wurde die PCR-Methode (SAIKI *et al.* 1988) angewendet. In der vorliegenden Arbeit wurde die PCR-Technik verwendet, um genomische DNA aus *A. thaliana* auf das Vorhandensein bestimmter DNA-Sequenzen (T-DNA) zu überprüfen (ALONSO *et al.* 2003).

Ein 20 µl PCR-Ansatz enthielt:

Template DNA	1 µg
Taq-Puffer	1 x
MgCl ₂	1,5 mM
dNTP's	0,2 mM
LP/LB Primer	0,15 pmol
RP Primer	0,15 pmol
Tag-Polymerase	1-2 U
steriles H ₂ O	ad 20 µl

Folgendes PCR-Programm wurde durchgeführt:

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklen
initiale Denaturierung	5 min	95 °C	1
Denaturierung	70 s	94 °C	
Annealing	70 s	54,4 °C	33
Elongation	85 s	72 °C	
abschließende Elongation	5 min	72 °C	1

Unter Verwendung der Primer LB, LP und RP (siehe auch 2.1.3) sollte in Wildtyp DNA Proben (keine T-DNA Insertion) ein PCR-Produkt der Länge 900-1100 bp, in homozygoten Mutationslinien (Insertion in beiden Chromosomen vorhanden) eine Bande der Länge 410 bp + N (Differenz der tatsächlichen Insertionsseite und der Position der flankierenden Sequenz; 0-300 bp) und in heterozygoten Insertionslinien (nur ein Allel eines Chromosoms enthält die Insertion) beide Banden gelelektrophoretisch nachgewiesen werden können. Daher wurde jede Probe mit zwei verschiedenen PCR Ansätzen amplifiziert. In einer Reaktion wurde das Primerpaar LP und RP verwendet, wohingegen in der anderen Reaktion eine Kombination aus LB und RP verwendet wurde.

2.2.7. Agarose-Gelelektrophorese

2.2.7.1. Nichtdenaturierende Agarosegele zur Auftrennung von DNA

1%ige Agarosegele (in TAE-Puffer) wurden verwendet, um DNA-Fragmente nach ihrer Größe elektrophoretisch aufzutrennen. Um die DNA später im Gel unter UV-Licht (364 nm) detektieren zu können, wurde 0,2 µg/ul Ethidiumbromid zugegeben.

Zur Erhöhung der Dichte der Proben und zur Markierung der Lauffront wurden die DNA-Proben (10 µl Probe, ca. 10 mg/ml) mit 1/6 Volumen 6 x DNA-Probenpuffer versehen und auf das Gel

aufgetragen. Als Marker wurden 5 µl 1 kb DNA-Marker verwendet. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 80-120 V in 1 x TAE-Puffer durchgeführt. Danach konnte das Gel unter UV-Licht dokumentiert werden.

2.2.7.2. Denaturierende Agarosegele zur Auftrennung von RNA

Als denaturierende Gele für die Qualitätsprüfung und Trennung isolierter RNA wurden 1%ige (w/v in 1 x FA-Puffer; 1,8% Formaldehyd; 0,2 µg/µl Ethidiumbromid) Agarosegele verwendet. Formaldehyd zerstört die Sekundärstruktur der RNA. Die Beseitigung unerwünschter RNase-Kontaminationen an Geräten erfolgte durch Inkubation mit 3%iger H₂O₂-Lösung und anschließendem Waschen mit Methanol. Die Trocknung erfolgte an der Luft. Alle Puffer wurden mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt.

Das Gel wurde mit 1 x FA-Laufpuffer (1,8% Formaldehyd) überschichtet und 30 min äquilibriert. Vor der Beladung wurde an das Gel für 5 min eine Spannung von 100 V angelegt. Jeweils 10 µg Gesamt-RNA wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit $\frac{1}{5}$ Volumen 5 x RNA Probenpuffer versetzt (Endvolumen 10 µl), 10 min bei 65 °C erhitzt und anschließend kurz auf Eis gestellt. Die Gelelektrophorese wurde bei 80 V in 1 x FA-Puffer durchgeführt und das Gel unter UV-Licht dokumentiert.

2.2.8. Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Diese Technik erlaubt sowohl die qualitative als auch die quantitative Detektion der Expression bestimmter Gene. Die Fluoreszenz-Detektion der Amplifikate beruht im verwendeten System auf der selektiven Interkalierung des Farbstoffes SYBR Green in die, bei der PCR-Reaktion entstehende doppelsträngige DNA, so dass die Fluoreszenz während der exponentiellen Phase der PCR proportional zur DNA-Konzentration zunimmt.

2.2.8.1. Durchführung der qRT-PCR

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression verschiedener Gene mit Hilfe eines Realplex qRT-PCR Systems untersucht. Dazu wurde die RNA von *Arabidopsis thaliana* Pflanzenmaterial wie in 2.2.2, 2.2.3 und 2.2.4 beschrieben extrahiert und in cDNA transkribiert. Ein Reaktionsansatz enthielt:

Template cDNA	2 µl (aus 1:20 Verdünnung)
SYBR-Green Mix	10 µl
LP Primer	10 mmol
RP Primer	10 mmol
Light Cycler H ₂ O	ad 20 µl

qRT-PCR-Programm:

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklen
Initiale Denaturierung	15 min	95 °C	1
Denaturierung	1 s	94 °C	45
Annealing	7 s	57 °C	
Elongation	19 s	72 °C	
Abschließende Elongation	5 s	79 °C	
Denaturierung des Amplifikats	15 min	95 °C	1

Für die qRT-PCR verwendete Primer sind in Tabelle 2 angeführt. Da die absolute Molekülanzahl an eingesetzter cDNA nicht genau bestimmt werden konnte, diente ein Abgleich mit der vorhandenen cDNA-Anzahl eines Gens, das als konstitutiv exprimiert angesehen wird (Actin 2/8), für die relative Quantifizierung (SZYROKI *et al.* 2001). Alle Quantifizierungen wurden auf 10000 Actin cDNA Moleküle normalisiert. Jedes Transkript wurde durch individuelle Standards quantifiziert. Eine Eichgerade für alle zu untersuchenden cDNAs wurde mit Hilfe von Standards (10, 1, 0,1 und 0,01 fg Amplifikat/µl), die als Proben eingesetzt wurden, erzeugt (siehe 2.2.8.2).

2.2.8.2. *Test der Primer und Herstellung von Standards für die qRT-PCR*

2.2.8.2.1. *Amplifikation der cDNA*

Um die entworfenen Primer zu testen und die Standards für die quantitative Real-Time PCR herzustellen, wurde Wildtyp-cDNA mittels PCR unter Verwendung der in Tabelle 2 aufgeführten Primer amplifiziert. Diese Reaktion wurde mit dem LightCycler System durchgeführt. Ein Ansatz bestand dabei aus:

SYBR Green Mix	10 µl
Primer	8 µl Primer-Mix (388 µl H ₂ O, 6 µl LP, 6 µl RP)
cDNA Template	2 µl (1:20 Verdünnung einer Wildtyp cDNA)

Der Reaktionsansatz wurde in eine Kapillare überführt und kurz zentrifugiert. Die PCR erfolgte bei einer Annealing-Temperatur von 57 °C.

Die PCR wurde mittels Gelelektrophorese in einem 1%igen Agarosegel (siehe 2.2.7.1) aufgetrennt. Aus PCR Proben, die laut Gelanalyse das gewünschte PCR Produkt ohne Verunreinigungen enthielten, wurde die amplifizierte cDNA mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits anhand des entsprechenden Protokolls extrahiert und aufgereinigt.

2.2.8.2.2. Ligation und Transformation der cDNA in *E. coli* mit anschließender Sequenzierung

Die aufgereinigte cDNA aus 2.2.8.2.1 wurde in den pGEM-TEasy Vektor ligiert und in *E. coli* transformiert, um eine Kontroll-Sequenzierung durchzuführen. Zur Durchführung der Ligation wurden

Puffer	5 µl 2 x Rapid Ligation Buffer
Vektor	1 µl pGEM TEasy Vektor (50 ng)
Ligase	1 µl T4 DNA Ligase (4 U/µl)
PCR-Produkt	3 µl

vermischt und bei 4 °C üN inkubiert. Der komplette Ligationsansatz wurde am nächsten Tag zu einem 50 µl Aliquot chemisch kompetenter *E. coli* Top10 gegeben.

Für die Hitzeschock-Transformation wurde der Ansatz zunächst für 30 min auf Eis gekühlt und anschließend für 70 s bei 42 °C inkubiert. Nach weiteren 2 min auf Eis wurden 500 µl LB-Medium (ohne Antibiotika) zugesetzt und der Ansatz schüttelnd inkubiert (37 °C, 300 rpm, 1 h).

Zur Selektion wurden je 150 µl der transformierten Zellen auf LB-Agarose Platten (+ 100 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen und über Nacht in einen Brutschrank (37 °C) gestellt. Bakterienkolonien wurden am nächsten Tag gepickt und in ein 10 ml Kulturröhrchen mit 3 ml LB Medium überführt (+ 100 µg/ml Ampicillin). Das Röhrchen wurde bis zur Sequenzierung über Nacht auf einem Schüttler inkubiert (37 °C, 300 rpm, 1 h). Am nächsten Tag wurde die Plasmid-Präparation sowie die Sequenzierungsreaktion im Labor des Lehrstuhls für Botanik I der Universität Würzburg nach Sanger durchgeführt (SANGER *et al.* 1977).

2.2.8.2.3. Standards für die qRT-PCR

Nach Überprüfung der Spezifität der Primer sowie der Sequenz des amplifizierten cDNA Produkts wurden die in 2.2.8.2.1 amplifizierten und aufgereinigten cDNA Stücke zur Herstellung der Standards für die späteren Messungen zur quantitativen Real Time PCR verwendet.

Dazu wurde zunächst die jeweilige Konzentration des aufgereinigten PCR Produktes bestimmt und anschließend eine cDNA Konzentration von 10 ng/μl eingestellt. Daraus wurde eine Verdünnungsreihe erstellt, die als Standard für die Quantifizierung diente.

2.2.9. Gesamtproteinbestimmung

Die quantitative Bestimmung von Proteinen wurde modifiziert nach Bradford (BRADFORD 1976) durchgeführt. Dazu wurde das *BCA Protein Assay Reagent Kit* entsprechend der Herstelleranleitung angewendet. Rinderserumalbumin (BSA) diente dabei als externer Standard.

2.3. Methoden für die Arbeit an *Arabidopsis thaliana*

Um Biosynthese- und Metabolismuswege der Sphingolipide in *A. thaliana* direkt zu untersuchen sowie diverse HR und PCD-Prozesse sichtbar machen zu können, wurden 4-6 Wochen alte unverletzte Pflanzen verschiedenen Stessbedingungen ausgesetzt.

2.3.1. Infiltration ganzer Blätter

Eine uniforme Behandlung gewährleistete die Infiltrationsmethode (KATAGIRI *et al.* 2002). Dazu wurden die Pflanzen am Vortag ausreichend gewässert, um offene Stomata und einen hohen Turgor zu gewährleisten. Die zu behandelnden Blätter wurden am Ansatz der Blattspreite markiert und möglichst in den ersten Stunden nach dem Beginn der Tageslichtperiode an ihrer abaxialen Seite mittels einer 1 ml Einwegspritze ohne Nadel mit den entsprechenden Lösungen infiltriert, um eine maximale und vergleichbare Belichtungsdauer der behandelten Pflanzen zu erzielen. Für die lipidomischen Untersuchungen sowie RNA-Extraktionen wurden, falls nicht anders angegeben, pro Behandlung und Zeitpunkt jeweils 8-10 Rosettenblätter mittleren Alters von je 3 Pflanzen zu einer Probe gepoolt. Je 3 unabhängige Proben wurden für einen Zeitpunkt angefertigt. Nach den jeweiligen Inkubationszeiten wurden die Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

2.3.1.1. Behandlung mit Pathogenen

Um Bakteriensuspensionen für die *A. thaliana* Infiltration zu erhalten, wurden entsprechende Glycerinkulturen (siehe Tabelle 4) auf KB-Agarmedium mit Selektionsantibiotika überimpft und

2-3 Tage bei 28 °C inkubiert. Anschließend wurden 100 ml flüssiges KB-Medium (incl. Antibiotika) angeimpft und bis zu ihrer logarithmischen Wachstumsphase inkubiert (28 °C; 350 rpm). Die Bakteriensuspension wurde in 50 ml Reaktionsgefäße überführt und abzentrifugiert (4 °C; 3000 x g; 10 min). Das Pellet wurde in 40 ml sterilem MgSO₄ (10 mM) gewaschen, zentrifugiert (4 °C; 3000 x g; 10 min) und erneut in 3 ml MgSO₄ (10 mM) resuspendiert. Die Konzentration der Bakteriensuspension wurde mittels Photometer auf eine OD₆₀₀=0,2 eingestellt. Dies entspricht etwa 10⁸-10⁹ Bakterien/ml (KATAGIRI *et al.* 2002). Als Kontrollinfiltration wurde ebenfalls MgSO₄ (10 mM) verwendet.

Zur *S. sclerotiorum* Infektion wurden mit dem Ascomyceten befallene Agarstücke aus den Kulturschalen ausgestochen (Ø 2,5 mm) und auf den Spreitengrund der Lamina platziert (Guo and STOTZ 2007). Nach 60 h wurden die Blätter geerntet. Zur Kontrolle wurden unbehandelte Blätter von den gleichen Pflanzen (= systemische Blätter) sowie Blätter gänzlich unbehandelter Pflanzen verwendet.

2.3.1.2. Infiltration mit SPL, Elicitoren und Toxinen

Lösungen verschiedener SPL und anderer Substanzen wurden ebenfalls durch Infiltration in *A. thaliana* Blätter appliziert.

Dazu wurden entsprechende Aliquote aus den Stocklösungen entnommen und unter Vakuum zur Trockene eingengt. Anschließend wurden die Substanzen in DMSO vorgelöst (Endkonzentration 0,1%) und in MgSO₄ (10 mM; 10 µg/ml BSA) verdünnt. Zur Kontrolle diente ebenfalls MgSO₄ (10 mM; 0,1% DMSO; 10 µg/ml BSA).

2.3.2. Verwundung

Durch die Blattinfiltration mit einer Spritze ist es möglich, dass mechanische Verletzungen am Blatt auftreten. Der Einfluss dieser Verwundung auf den Sphingolipidmetabolismus sollte untersucht werden.

Dazu wurden *A. thaliana* Blätter acht Mal auf jeder Seite der Lamina mit einer Metallpinzette gequetscht. Die Mittelrippe blieb dabei unverletzt. Das Blattmaterial wurde zu den jeweiligen Zeitpunkten nach Verletzung in flüssigem Stickstoff gefroren und entsprechend den Infiltrationsproben weiterverarbeitet.

2.3.3. Nachweis von Zelltod in *Arabidopsis thaliana*

Zelltod, wie etwa durch Pathogenbefall ausgelöst, geht oft einher mit der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und kann über eine Reihe verschiedener Nachweismethoden dargestellt

bzw. quantifiziert werden. Im Folgenden sind die Methoden dargestellt, welche in dieser Arbeit zum Nachweis von Zelltod verwendet wurden.

2.3.3.1. Färbungen

Bewährt hat sich die Färbung mittels DAB (3,3'-Diaminobenzidin), wodurch H_2O_2 in Blättern nachgewiesen werden kann (SNYRYCHOVÁ *et al.* 2009). Dazu werden Blätter nach der jeweiligen Behandlung geerntet und in 50 ml Reaktionsgefäßen vollständig mit DAB-Lösung (1 mg/ml DAB; pH 3,8 mit KOH) überschichtet und mindestens 5x mittels Vakuumpumpe „infiltriert“. Eine vollständige Infiltration erkennt man an der veränderten Lichtdurchlässigkeit des Blattes. Nach 3 h Inkubation kann das Blatt in 70 %igem EtOH entfärbt (1-3 Tage; mehrfach Lösung wechseln) und eine etwaige Braunfärbung durch vorhandenes H_2O_2 betrachtet werden. Der Vorgang lässt sich durch vorsichtiges Erhitzen in 100%igem EtOH mittels Mikrowelle beschleunigen. Zur Dokumentation wurde das Blatt danach wieder in 70%igem EtOH äquilibriert.

2.3.3.2. Lumineszenzmessung

Die ROS-Produktion in *A. thaliana*-Blättern kann auch durch Lumineszenzdetektion mit Hilfe von Luminol und Meerrettichperoxidase nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den Färbemethoden handelt es sich hierbei um eine sehr sensitive Methode. Dabei macht man sich eine chemische Reaktion zu Nutze, wobei von Luminol emittierte Photonen detektiert werden. Endogen produziertes Wasserstoffperoxid dient dabei als Substrat für die katalytische Peroxidase und fungiert als Elektronenquelle für das Luminol.

Blattscheiben aus unverletzten Blättern wurden mittels Biopsiestanzer (\varnothing 5 mm) ausgestanzt, in einer weißen 96-Well-Platte verteilt und im Dunkeln für 3 h in 100 μ l H_2O äquilibriert. Anschließend wurde das Wasser gegen 50 μ l Luminollösung (siehe 2.1.2) ausgetauscht, erneut 20 min äquilibriert und mit 50 μ l Elicitorlösung (88% Luminollösung, 10% Elicitor, 2% DMSO) versetzt. Als Positivkontrolle diente Flagellin (*flg22*) (50 nM; 2%ig DMSO). Als Elicitor kamen verschiedene SPL (50-200 μ M Endkonzentration) zum Einsatz. Aliquote der jeweiligen SPL Methanolstocklösungen wurden zur Trockene eingengt, in DMSO vorgelöst (10 min im Ultraschallbad) und anschließend die entsprechende Konzentration der Elicitorlösung eingestellt. Anschließend wurde sofort die Messung gestartet. Die gemessene Lumineszenz entspricht der Anzahl der detektierten Photonen pro Sekunde. Die Behandlungen erfolgten jeweils in 6-8facher Wiederholung. Als Negativkontrolle diente die Inkubationslösung ohne Elicitor.

2.3.3.3. *Imaging PAM*

In dieser Arbeit wurde das Prinzip der Chlorophyllfluoreszenzmessung mit Hilfe der Imaging PAM („Pulse amplitude modulated fluorometry“) Technologie verwendet, um Effekte von verschiedenen Sphingobasen auf die Chlorophyllfluoreszenz zu untersuchen und sie unter anderem mit Auswirkungen nach *P. syringae* Infektion zu vergleichen. Bei dieser Methode handelt es sich um eine nichtinvasive Technik zur qualitativen und quantitativen Bestimmung photosynthetischer Parameter *in vivo* (BILGER *et al.* 2001). Dabei wird ein Lichtsättigungspuls verwendet, um ein schnelles Schließen der Photosynthesereaktionszentren zu induzieren und dadurch ein Maximum an Chlorophyllfluoreszenz zu generieren. Eine Schädigung des pflanzlichen Gewebes, etwa durch „hypersensitive response“ Reaktionen nach *P. syringae* Infektionen, führt zu einem Rückgang der Chlorophyllfluoreszenz, quantifizierbar anhand verschiedener Messparameter (BONFIG *et al.* 2006).

Messlicht, aktinisches Licht und Sättigungspulse wurden von zwölf Luxeon 3W Royal Blue LEDs (Peakwellenlänge 450 nm; Emissionsfilter mit Kurzpasskante bei 470 nm) erzeugt. Die Lichtintensitäten am gemessenen Objekt betragen für das Messlicht (Intensitätsstellung 3, Messfrequenz 1) maximal 0,4 $\mu\text{mol Quanten}/\text{m}^2\text{s}$, für das aktinische Licht (Intensitätsstellung 20) maximal 1570 $\mu\text{mol Quanten}/\text{m}^2\text{s}$ und für die Sättigungspulse (Stellung 10) maximal 3000 $\mu\text{mol Quanten}/\text{m}^2\text{s}$. Die CCD-Kamera vom Typ schwarz-weiß C-Mount wurde im 10-Bit-Modus bei 30 Frames/s betrieben. Der zugehörige CCD-Chip der Größe 1/3“ hatte 640 x 480 Pixel Auflösung. Das Objektiv Cosmicar/Pentax F1.2, f=12 mm war im festen Arbeitsabstand von 39 mm zum gemessenen Objekt angebracht. Die abgebildete Fläche eines gemessenen Objekts betrug maximal 17 x 22 mm. Der Detektor-Filter-Schieber zur wahlweisen Messung von Chlorophyll- oder phenolischer bzw. GFP-Fluoreszenz bestand für die Messungen der Chlorophyllfluoreszenz aus einem Langpassfilter mit einer Kante bei 645 nm. Messungen erfolgten in der Software ImagingWin.exe (Walz) nach einem voreingestellten Messprotokoll. Die Aufnahme der aktuellen Fluoreszenz (F_t) erfolgte fortlaufend.

In Abwesenheit von aktinischem Licht wurde zunächst die minimale Fluoreszenz ($F_t=F_0$), nach Applikation eines sättigenden Lichtpulses die maximale Fluoreszenz des Messobjektes in dunkeladaptiertem (mind. 10 min) Zustand bestimmt. Aus diesen beiden Parametern wurde automatisch die maximale PSII-Quantenausbeute (F_g/F_m) berechnet. Für verschiedene Pflanzenarten wurde gezeigt, dass F_g/F_m im nicht-gestressten Zustand bei etwa 0,83 liegt (BJÖRKMAN and DEMMIG 1987). Liegt der Wert darunter, so ist dies ein Indikator für Photoinhibition bzw. Schädigung des PSII durch eine vorausgegangene Stresseinwirkung (KRAUSE and WEIS 1991).

In Anwesenheit aktinischen Lichtes wurden dann die aktuelle Fluoreszenz ($F_t=F$) und die maximale Fluoreszenz im lichtadaptierten Zustand (F_m') bestimmt, aus denen die effektive Quantenausbeute ($Y(II)=[F_m'-F_t]/F_m'=\Delta F/F_m'$) abgeleitet wurde, welche ein Maß für die Effizienz der PSII-Reaktionszentren darstellt (MAXWELL and JOHNSON 2000). Erfolgt eine Energieabgabe nach starker Bestrahlung einer Pflanze nicht in Form photochemischer Prozesse, sondern z.B. durch Wärmeabgabe, so kann dies durch den Parameter $q_N=(F_m-F_m')/(F_m-F_o')$ („nichtphotochemisches Quenching“) dargestellt werden (KRAUSE and WEIS 1991). Die Aufnahmen der Fluoreszenzparameter wurden mit Hilfe eines Falschfarbensystems angezeigt, welches auf einer Skala von 0 (schwarz) bis 1000 (violett) reichte. Nach Aufnahme einer Kinetik wurden bestimmte Bereiche des Messobjektes, sogenannte „areas of interest“ (AOI) definiert, über die in einer angezeigten Markierung die Mittelwerte für den ausgewählten Parameter berechnet und als Zahlenwert dargestellt wurden.

2.3.3.4 Nachweis von Zelltod mittels Leitfähigkeitsmessung

Die Leitfähigkeitsmessung („ion leakage“) stellt eine weitere Möglichkeit dar, Zelltodprozesse direkt nachzuweisen. Dabei wird eine Änderung der spezifischen Leitfähigkeit eines Mediums erfasst, in dem sich das zu untersuchende Gewebe oder das Zellmaterial befindet. Durch den Verlust der Membranintegrität einer toten Zelle strömen Ionen entsprechend ihres Konzentrationsgefälles aus dem Inneren der Zelle in das Medium aus.

Dazu wurden Blattscheiben aus unversehrten *A. thaliana* Rosettenblättern ausgestanzt (\varnothing 5 mm) und 2 h in Wasser äquilibriert. Anschließend wurden je Behandlung 20 Blattscheiben in 6-Well Testplatten mit je 2 ml Elicitorlösung überdeckt. Jede Behandlung erfolgte in vierfacher Wiederholung. Die Leitfähigkeitsmessung (100 μ l Aliquote) erfolgte jeweils zu bestimmten Zeitpunkten nach Inkubationsbeginn. Anschließend wurden die Blattscheiben jedes Ansatzes inklusive Medium in ein 10 ml Reaktionsgefäß mit Teflondichtung (Pyrex, UK) überführt und 2 h bei 120°C inkubiert. Dabei sollten sämtliche Membranen zerstört werden, wodurch Ionen aus allen Kompartimenten aller Zellen in das Medium freigesetzt werden. Das Medium wurde anschließend auf RT abgekühlt und erneut 100 μ l vermessen, um die maximale Leitfähigkeit der untersuchten Blattscheiben zu ermitteln.

2.3.4. Nachweis des Bakterienwachstums

2.3.4.1. Einfluss von SPL auf das Bakterienwachstum

Um den direkten Einfluss von SPL auf Wachstums- und Überlebensrate von *P. syringae* DC3000 zu überprüfen wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt:

- **Wachstumsassay**

Hierfür wurden KB-Agarplatten mit SPL versetzt (je 50 μ M, gelöst in 0,1% DMSO, d18:1, d18:0, t18:0, d20:1, d20:0; 0,1% DMSO als Kontrolle) und jeweils 10 μ l einer Bakterienverdünnungsreihe ausplattiert. Nach 24-48 h (28 °C) wurden die Kolonien ausgezählt und die durchschnittliche Größe der Plaques bestimmt.

- **Zelltodassay**

Bakterienkulturen wurden $\bar{u}N$ angezogen und auf eine $OD_{600}=0,002$ eingestellt. 3 ml der Bakteriensuspension wurden mit SPL versetzt (je 50 μ M, gelöst in 0,1% DMSO, d18:1, d18:0, t18:0, d20:1, d20:0; 0,1% DMSO als Kontrolle) und für 5 h inkubiert (28 °C, 350 rpm). Anschließend wurde von jedem Aliquot eine Verdünnungsreihe erstellt, auf KB-Agarplatten (mit Antibiotika) ausplattiert und bei 28 °C inkubiert. Die Zählung der Kolonien erfolgte nach 24-48 h.

2.3.4.2. In vivo Untersuchung zur Suszeptibilität von *A. thaliana*

Die Bestimmung des Bakterienwachstums von *P. syringae* in *A. thaliana* WT und Mutanten erfolgte entsprechend dem Protokoll von (WHALEN *et al.* 1991; KATAGIRI *et al.* 2002). Die Blätter wurden mit Bakterien ($OD_{600}=0,005$) infiltriert und nach Resorption der Bakteriensuspension (1 hpi), 24 hpi, 48 hpi und 72 hpi geerntet. Anschließend wurden die Blätter je 45 s in 70%igem Ethanol und H₂O gewaschen, abgetrocknet und Blattscheiben mit einem Biopsiestanzer (\varnothing 5 mm) aus den infizierten Bereichen ausgestanzt. Vier Blattscheiben von vier individuellen Pflanzen wurden in zwölfacher Wiederholung zu einer Probe zusammengefasst, in einem 2 ml Reaktionsgefäß (1 ml 10 mM MgSO₄) mittels Kugelmühle homogenisiert (90 s, 24 Hz), kurz zentrifugiert und eine Verdünnungsreihe erstellt. Jeweils 10 μ l von vier unterschiedlichen Verdünnungsstufen (1:10-1:10000) wurden auf KB-Agarplatten ausplattiert und die gewachsenen Bakterienkolonien nach 24-48 h Inkubation bei 28°C ausgezählt.

2.3.5. Sphingolipidanalytik

Um Sphingolipidbiosynthese und -metabolismuswege zu untersuchen wurde eine Analytik etabliert, die der strukturellen und chemischen Vielfalt der SPL Rechnung trägt. Die Methodik erfolgte dabei weitestgehend nach bereits publizierten Vorschriften (SULLARDS *et al.* 2000; SPASSIEVA *et al.* 2002; BIELAWSKI *et al.* 2006; MARKHAM *et al.* 2006; MARKHAM and JAWORSKI 2007; CHEN *et al.* 2008; MICHAELSON *et al.* 2008).

In dieser Arbeit wurde u.a. ein „ultra performance liquid chromatography“ (UPLC) –System mit Umkehrphasen- („reversed phase“; RP) Säulen eingesetzt, welches über eine ESI-Quelle direkt mit einem Tandem-Massenspektrometer zur Detektion gekoppelt wurde. Dieses ist aus zwei Quadrupolen mit dazwischen geschalteter Kollisionszelle aufgebaut. Im ersten Quadrupol werden unfragmentierte Ionen des Extrakts erfasst (Vorläuferionen; „Parent Ions“), in der Kollisionszelle mit Argon fragmentiert und die zugehörigen Fragmente im zweiten Quadrupol analysiert (Produkt oder Tochterionen; „Daughter Ions“). Zur Analyse der Sphingolipide wurde der MRM Modus („multiple reaction monitoring“) verwendet, wobei mehrere Produktscans pro MS-Methode hintereinander geschaltet durchgeführt wurden.

2.3.5.1. Etablierung und Validierung der UPLC-MS/MS Methodik

Die Validierung der UPLC-MS/MS-Methode erfolgte nach (SHANER *et al.* 2009) und ist im Ergebnisteil angeführt.

2.3.5.2. Interne Standards

Die quantitative massenspektrometrische Analyse pflanzlicher Sphingolipide setzt adäquate interne Standards voraus, um für die Variabilität bei der Probenaufarbeitung und oft sehr unterschiedliche Ionisierbarkeiten und Matrixeffekte zu kompensieren. In dieser Arbeit sollte eine Vielzahl an Analyten untersucht werden. Dabei war es unmöglich, für jede Substanz ideale interne Standards zu benutzen. Einerseits ist die Verfügbarkeit isotopenmarkierter Sphingolipide nicht gegeben, andererseits lässt die große Anzahl und physiko-chemische Divergenz dies nicht zu. Daher wurden in dieser Arbeit SPL mit unnatürlicher Kettenlänge als interne Standards verwendet. Sie weisen somit ähnliche Strukturen, Ionisierbarkeit und Fragmentierungsmuster aber geringfügig veränderte Retentionszeiten bei der Säulenchromatographie auf. Für die Quantifizierung der in dieser Arbeit untersuchten SPL-Klassen (LCBs, LCB-Ps, Ceramide, Hydroxyceramide, GlcCer) wurden mehrere interne Standards eingesetzt, da anhand zusätzlicher Standards neue Fragestellungen auch nach der Probenaufarbeitung zu behandeln wären. In dieser Arbeit hingegen fanden für die endgültige Berechnung nur die freien

Sphingobasen d20:1, d20:1-P sowie das Ceramid d18:1-c10:0 Verwendung. Zur Quantifizierung freier LCBs nach Hydrolyse wurden ebenfalls interne Standards verwendet.

Die folgenden Standards wurden als Mischung zusammengefügt und vor der Aufarbeitungen zu den jeweiligen Proben gegeben:

IS-Mix für Lipidextraktion und LC-MS-Analyse (MS-IS-MIX)	d17:1, d20:0, d20:1, t18:0-c8:0, d18:1-c10:0, d20:1-P, d18:1-c12:0-P und d18:1-c12:0-Glc je 0,1 nmol/10 µl in Methanol
IS-Mix für Totalhydrolyse (Hyd-IS-MIX)	d17:1, d20:0 und d20:1 je 2 nmol/10 µl in Methanol

2.3.5.3. Gefriertrocknung

Pflanzenmaterial für die Lipiduntersuchungen wurde üN bei -70 °C (0,03 mbar) gefriergetrocknet und anschließend bei RT zu einem feinen Pulver homogenisiert. Das Probenmaterial wurde bei -20 °C gelagert.

2.3.5.4. Extraktion von Sphingolipiden

In der vorliegenden Arbeit wurden sämtliche Sphingolipide mittels Ein-Phasen-Extraktion (MARKHAM *et al.* 2006) aus Blattmaterial isoliert, da die Ausbeute aufgrund der ausgeprägten amphiphilen Natur der SPL bei einer klassischen Lipidextraktion, wie etwa Bligh-Dyer (BLIGH and DYER 1959), sehr variabel sein kann (SHANER *et al.* 2009).

Etwa 20 mg gefriergetrocknetes und fein gepulvertes Pflanzenmaterial wurde in ein 10 ml Reaktionsgefäß mit Teflondichtung (Pyrex, UK) überführt, mit MS-IS-Mix (siehe 2.3.5.2) versetzt und mit je 3 ml SPL-Extraktionslösung (siehe 2.1.2, obere Phase) extrahiert (65 °C; 15 min). Nach Zentrifugation (RT, 4000 x g, 15 min) wurde der Überstand in ein neues 10 ml Reaktionsgefäß überführt und der Rückstand noch zwei Mal extrahiert. Die Überstände wurden vereinigt und mittels Vakuum-Rotationskonzentrator zur Trockene eingeengt.

Um den Einfluss von (Glyco-) Phospholipiden zu minimieren, welche bei der HPLC, ESI und Detektion stören, wurde der Rohextrakt deesterifiziert. Dazu wurde der Rückstand in 3 ml Methylaminlösung (2.1.2) gelöst und für 1 h bei 50 °C inkubiert. Anschließend wurde der organische Lösungsmittelanteil unter Vakuum verdampft. Der wässrige Lösungsmittelanteil wurde üN durch Gefriertrocknung entfernt. Der Rückstand wurde drei Mal mit je 300 µl

Methanol (10% H₂O v/v) in ein gläsernes HPLC-Probengefäß überführt und bei -20 °C bis zur UPLC-MS/MS Messung gelagert.

2.3.5.5. UPLC-Bedingungen

In dieser Arbeit kam als chromatographische Trennmethode vor der massenspektrometrischen Detektion ein UPLC-System zum Einsatz. Durch Verwendung kleiner Partikel unter erhöhtem Arbeitsdruck ergeben sich dadurch Vorteile in Bezug auf Auflösung, Empfindlichkeit und Geschwindigkeit der chromatographischen Trennung. Zudem sind bereits sehr geringe Probenvolumina für eine effiziente Analyse ausreichend.

Die Umkehrphasenchromatographie (2.1 x 50 mm BEH c18 1.7 µm; mit BEH Vorsäule 2.1 x 5; 1.7 µM; beides Waters, USA) erfolgte mit dem in Tabelle 5 angegebenen Gradienten und den in 2.1.5 angegebenen Eluenten. Die Proben wurden vor der Injektion auf 60°C erhitzt und im Ultraschallbad für 5 min sonifiziert. Nach Zentrifugation (RT, 4000 x g, 10 min) wurden sie im Autosampler auf 20 °C temperiert. Der Säulenofen hielt die Temperatur bei 30 °C. Das Injektionsvolumen betrug jeweils 14 µl.

Tabelle 5: UPLC Gradient zur Auftrennung von Sphingolipiden. Die Flussrate betrug 350 µl/min.

Zeit [min]	% A	% B
0,0	60	40
2,0	60	40
4,0	20	80
5,5	15	85
8,0	5	95
14,0	0	100
20,0	0	100
20,1	60	40
24,0	60	40

2.3.5.6. MS/MS Bedingungen

Die optimalen Bedingungen für Ionisierung und Fragmentierung wurden einzeln für jede Standardsubstanz und jeden kommerziell erhältlichen Analyten optimiert und Standardkurven dazu etabliert. Dazu wurde jeder SPL-Standard in Methanol gelöst (100 µg/ml) und über die Spritzenpumpe des Massenspektrometers bei variabler Flussrate in die Ionenquelle injiziert.

Über ein Mehrwegeventil wurde ein konstanter Eluentenfluss (Startbedingungen, siehe Tabelle 5) aus dem UPLC-System während der Messung gewährleistet. Dies ermöglichte einen durchgängigen Elektrospray sowie eine Eluentenzusammensetzung, wie sie auch bei der Auftrennung eines SPL-Extraktes durch Säulenchromatographie auftritt. Dies ist nötig, da Ionisierbarkeit, Fragmentierung und Matrix-Effekte stark von der Zusammensetzung des Eluenten abhängig sind.

Nachdem die Einstellungen für den ersten Quadrupol optimiert waren, wurden Massenspektren der Produktionen über einen weiten Bereich der Kollisionsenergie aufgenommen, spezifische Fragmente identifiziert und die Parameter in Kollisionszelle und zweitem Quadrupol dahingehend verändert, um ein optimales Signal für das ausgewählte Fragment zu erhalten. Die Detektion der SPL erfolgte durch direkte Kopplung der UPLC mittels ESI an das Massenspektrometer, welches im positiven Ionisationsmodus betrieben wurde (Tabelle 6).

Tabelle 6: Allgemeine Parameter des Massenspektrometers. Die Parameter wurden durch Analyse aller in dieser Arbeit verwendeten kommerziell erhältlichen SPL optimiert und überprüft.

Quelle		Analysator	
Kapillarspannung [kV]	3,5	Kollisionsgasfluss [ml/min] - Ar	0,35
Quellentemperatur [°C]	120	LM1 Auflösung	14,5
Desolvatisierungstemperatur [°C]	450	HM1 Auflösung	14,5
Konusgasfluss [L/H] - N ₂	50	Ionenenergie 1	0,5
Desolvatisierungsfluss [L/H] - N ₂	800	Eingang	0
		LM2 Auflösung	15
		HM2 Auflösung	15
		Ionenenergie 2	1
		Photomultiplier [V]	650
Kollisionszelle			
Druck [mbar]	$3,8 \times 10^{-3}$		
Kollisionsgasfluss [ml/min] – Ar	0,3		

Die Fragmentierung der SPL folgt dem Muster, wie es in Abbildung 4 und Abbildung 5 gezeigt ist. Um eine hohe Sensitivität während der Messung zu gewährleisten, wurden für jedes SPL spezifische Kollisionsenergien verwendet, was wiederum unterschiedliche Fragmentintensitäten zu Folge hat. Das Fragment mit der höchsten Signalintensität wurde als diagnostisches Fragment ausgewählt (siehe 3.1.1). Die Sequenzen des MRMs für die einzelnen SPL wurden anhand ihrer Retentionszeiten optimiert, wobei für alle Funktionen eine Dwell-Time von 50 ms eingestellt wurde. Die an jede SPL-Spezies angepassten Parameter und ausgewählten Fragmentationen sind in Tabelle 7 aufgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der MassLynx Software (Waters, USA) und Excel (Microsoft, USA).

Tabelle 7: Masse/Ladungsverhältnisse der Parent-Ions und der dazugehörigen Fragmente sowie die verwendete Konusspannung und Kollisionsenergie analysierter SPL im MRM-Modus. IS: interner Standard.

Sphingolipid	MRM-Übergang [m/z]	Konusspannung [V]	Kollisionsenergie [eV]
d17:1 (IS)	286,2 → 268,2	16	18
d18:2	298,2 → 280,2	22	17
d18:1	300,2 → 282,2	22	17
d18:0	302,2 → 284,2	28	18
t18:1	316,1 → 298,2	22	20
t18:0	318,2 → 282,1	22	20
d20:1 (IS)	328,1 → 310,2	18	22
d18:1-c10:0 (IS)	454,3 → 264,2	11	22
d18:1-c16:0	538,8 → 264,2	28	32
d18:0-c16:0	540,8 → 266,3	36	37
t18:1-c16:0	554,5 → 262,3	30	30
t18:0-c16:0	556,5 → 264,3	30	30
d18:0-c18:0	568,3 → 266,4	36	37
t18:0-c18:0	584,3 → 300,2	30	30
t18:1-c22:1	636,6 → 262,3	35	40
t18:1-c22:0	638,6 → 262,3	35	40
t18:0-c22:1	638,6 → 264,3	35	40
t18:0-c22:0	640,6 → 264,3	35	40
d18:1-c24:1	648,6 → 264,3	22	32
d18:1-c24:0	650,6 → 264,3	28	32
d18:0-c24:1	648,6 → 266,3	45	35
d18:0-c24:0	650,6 → 266,3	45	36
t18:1-c24:1	664,7 → 262,3	35	40
t18:1-c24:0	666,7 → 262,3	35	40
t18:0-c24:1	666,7 → 264,3	35	40
t18:0-c24:0	668,7 → 264,3	35	40
d18:1-c26:1	676,7 → 264,2	30	32
d18:1-c26:0	678,7 → 264,4	30	32
d18:0-c26:1	678,7 → 266,3	43	35
d18:0-c26:0	680,7 → 266,3	43	35
t18:1-c26:1	692,7 → 262,3	35	40
t18:1-c26:0	694,7 → 262,3	35	40
t18:0-c26:1	694,7 → 264,3	35	40
t18:0-c26:0	696,7 → 264,3	35	40
t18:1-h16:0	570,5 → 262,3	30	30

t18:1-h20:0	626,6 → 262,3	30	30
t18:1-h22:0	654,6 → 262,3	30	30
t18:1-h24:1	680,7 → 262,3	30	30
t18:1-h24:0	682,7 → 262,3	30	30
t18:1-h26:1	708,7 → 262,3	30	30
t18:1-h26:0	710,7 → 262,3	30	30
t18:0-h16:0	570,5 → 264,3	30	30
t18:0-h20:0	628,6 → 264,3	30	30
t18:0-h22:0	656,6 → 264,3	30	30
t18:0-h24:1	682,7 → 264,3	30	30
t18:0-h24:0	684,7 → 264,3	30	30
t18:0-h26:1	710,7 → 264,3	30	30
t18:0-h26:0	712,7 → 264,3	30	30

2.3.5.7. *Totalhydrolyse komplexer Sphingolipide*

Sphingolipide kommen in einer so großen strukturellen Vielfalt vor, dass eine Analyse aller möglichen Varianten mit vertretbarem Aufwand in dieser Arbeit nicht möglich war. Daher wurde eine starke alkalische Hydrolyse eingesetzt, um sämtliche komplexe SPL an ihrer Amidbindung zu spalten, wodurch das Sphingobasentrückgrat als LCB freigesetzt wird.

Etwa 10 mg gefriergetrocknetes und fein gepulvertes Probenmaterial wurde dazu in ein 10 ml Reaktionsgefäß mit Teflondichtung überführt, mit Hyd-IS-Mix (siehe 2.3.5.2) versetzt und in 1 ml 1,4-Dioxan im Ultraschallbad resuspendiert. Anschließend wurde 1 ml wässriges Ba(OH)₂ (10% w/v) zugegeben und bei 110 °C für 16 h inkubiert.

Bariumionen wurden durch 2 ml wässrige (NH₄)₂SO₄ (2% w/v) präzipitiert und die freien LCBs drei Mal mit je 2 ml Et₂O extrahiert. Die Extrakte wurden vereinigt, unter Vakuum zur Trockene eingedunstet und in 100 µl Methanol gelöst. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

2.3.5.8. *OPA-Derivatisierung und Chromatographie freier Sphingobasen*

Freie LCBs sollten nach Totalhydrolyse quantifiziert werden. Primäre Amine lassen sich mittels o-Phthaldialdehyd (OPA) und 2-Mercaptoethanol zu einem fluoreszierenden Isoindol-Derivat umsetzen, das in einer HPLC-Anlage mit angeschlossenen Fluoreszenz-Detektor nachgewiesen werden kann (Abbildung 6). Diese Reaktion ist sehr empfindlich und erlaubt die Bestimmung von LCBs über einen weiten Konzentrationsbereich.

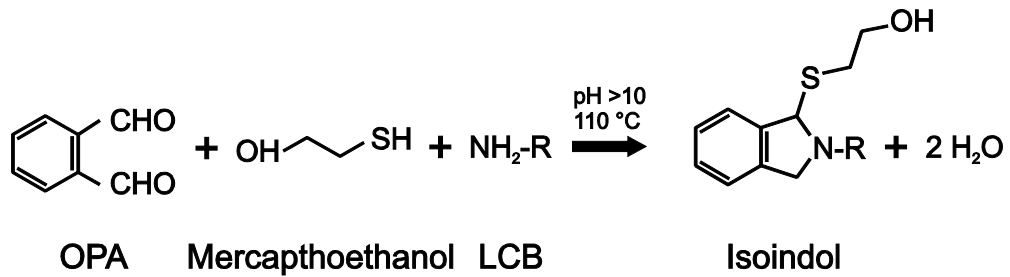


Abbildung 6: Reaktionsschema der OPA-Derivatisierung. OPA: *ortho*-Phthaldialdehyde; LCB: Long Chain Base

Für die Derivatisierungsreaktion wurde den Extrakten aus 2.3.5.7 je 50 μl frisch hergestellter OPA-Reaktionsmix (2.1.2) zugegeben, 3 min sonifiziert, 30 min im Dunkeln inkubiert und Anschließend mit 300 μl Methanol verdünnt. Für die Bestimmung der LCB-Konzentrationen wurden Standards definierter Menge chromatographisch getrennt und Kalibriergeraden erstellt. Das Maß ihrer Fluoreszenz diente als Grundlage zur Berechnung der LCB-Konzentrationen in den Proben. Der Chromophor ist bei allen derivatisierten Sphingobasen und dem internen Standard gleich, daher kann von einem Responsefaktor von 1 ausgegangen werden. Diese Methode liefert daher quantitative Daten.

Die Umkehrphasen-Säulenchromatographie (250-4; 5 μm ; Purospher STAR RP18e mit Vorsäule 4-4; 5 μm ; beides Merck, Darmstadt) erfolgte an einer HPLC-Anlage mit Fluoreszenzdetektor. Die Anregungswellenlänge lag bei $\lambda = 340 \text{ nm}$, die Emission wurde bei $\lambda = 455 \text{ nm}$ gemessen. Tabelle 8 zeigt das verwendete Elutionsprofil.

Tabelle 8: HPLC-Gradient für OPA-Derivatisierung. A: H_2O ; B: Methanol

Zeit [min]	Flussrate [ml/min]	% A	% B
0,0	0,8	20	80
4,0	0,8	20	80
6,0	1,0	5	95
10,0	1,0	5	95
18,0	1,0	0	100
22,0	1,0	0	100
22,1	1,0	20	80
40,0	1,0	20	80

3. Ergebnisse

3.1. Etablierung, Qualifizierung und Validierung der Sphingolipid-Analytik

Um Sphingolipide in *A. thaliana* auf Metabolitebene charakterisieren zu können war es zuerst nötig, eine quantitative Analytik zu etablieren. Der gewissenhaften Etablierung, Qualifizierung und Validierung analytischer Methoden kommt eine besondere Bedeutung zu, da qualitative und v.a. quantitative Aussagen stark von einer robusten Methodik abhängig sind. Hier ist es wichtig, den Nachweis zu Spezifität, Präzision, Linearität, und Bestimmungsgrenze der angewandten Analytik zu führen. Dazu konnte z.T. auf bereits etablierte Verfahren zurückgegriffen werden (MERRILL *et al.* 2000; SULLARDS 2000; BARTKE *et al.* 2006; BIELAWSKI *et al.* 2006; MARKHAM *et al.* 2006; MARKHAM and JAWORSKI 2007; BIELAWSKI *et al.* 2009; SHANER *et al.* 2009).

3.1.1. Ionisierungs- und Fragmentierungsparameter

Durch Optimierung und Vergleich der einzelnen MS-Parameter für jeden getesteten Analyten und internen Standard konnten die in Tabelle 6 dargestellten allgemeinen MS-Bedingungen etabliert werden.

Repräsentative Beispiele der massenspektrometrischen Analyse sind in Abbildung 7 und Abbildung 8 dargestellt.

Mittels Spritzenpumpe wurden die Referenzanalyten (gelöst in MeOH) direkt über die ESI-Quelle in das Massenspektrometer injiziert und entsprechende Ionen im MS-Fullscan-Modus (Abbildung 7 (a) sowie Abbildung 8 (a)) und Produktionen (Tochterionen) im MS/MS-Modus (Abbildung 7 (b-d) sowie Abbildung 8 (b)) nach Fragmentierung mittels Argon analysiert. Zur späteren Identifizierung eines Analyten in einer Probe wurden strukturspezifische Übergänge ausgewählt, welche unter den jeweils optimierten Bedingungen (unterschiedliche Kollisionsenergien) der Standards hohe Signalintensitäten ergaben (siehe auch Tabelle 7).

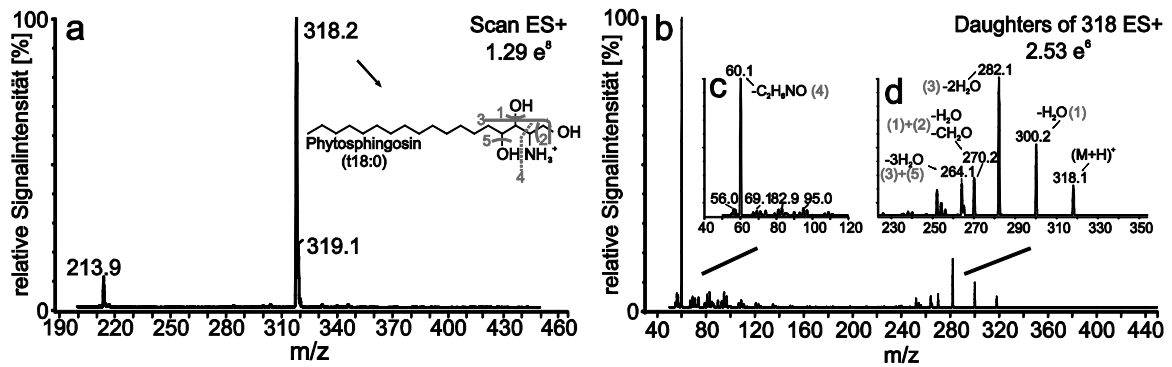


Abbildung 7: Full- und Produktscan der freien Sphingobase Phytosphingosin (t18:0; m/z=318,2). Die Probe wurde in Methanol injiziert. (a) MS-Fullscan über einen m/z-Bereich von 190-460. (b) Fragmente von t18:0 (MS/MS-Fragmentierungsmuster). (c und d) Detailvergrößerungen aus (b). Gezeigt sind die Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchung vor bzw. nach Fragmentierung des Analyten. An der Struktur von t18:0 in (a) sind typische Fragmentierungsstellen eingezeichnet. Die Nummerierung wurde für die detektierbaren Fragmente in (c) und (d) beibehalten. Eine Wasserabspaltung ist bei allen drei Hydroxylgruppen der Sphingobase, auch in Kombination, möglich. Y-Achse: relative Signalintensität in %; x-Achse: m/z (Masse/Ladung).

Wie bereits aus früheren Arbeiten bekannt (MERRILL *et al.* 2005; SULLARDS *et al.* 2007), fragmentieren die meisten Sphingolipide (Sphingobasen, Ceramide, Glycosylceramide) im positiven ESI-Modus bei Erhöhung der Kollisionsenergie unterschiedlich stark. Sequentiell werden zuerst die Hydroxylgruppen als Wassermoleküle und etwaige Kopfgruppen der Sphingobase abgespalten. Bei komplexen Sphingolipiden erfolgt nach weiterer Erhöhung der Kollisionsenergie anschließend auch eine Abtrennung der Fettsäure, was schließlich zu den in Tabelle 7 dargestellten Rückgrationen führt (siehe auch Abbildung 4 und Abbildung 5). Durch Anwendung hoher Kollisionsenergien werden auch Kohlenwasserstoffreste von den relativ stabilen Sphingobasen abgespalten.

Die untersuchten Analyten und internen Standards wiesen unter den in dieser Arbeit optimierten Bedingungen jeweils sehr ähnliche Fragmentierungsmuster auf. Wie in Abbildung 7 gezeigt, wurde etwa für die Sphingobase t18:0 ($[M+H]^+=318,2$) das Fragment mit m/z=282,2 (2fache Wasserabspaltung; Konusspannung: 22V; Kollisionsenergie: 20eV) als diagnostisches Fragmention ausgewählt. Wie aus Abbildung 7 (b-d) ersichtlich, traten aber noch eine Reihe weiterer Fragmentionen auf, welche teilweise ebenfalls hohe Signalintensität aufwiesen.

So wurde etwa bei Phytosphingosin (t18:0) unter den verwendeten Bedingungen auch ein Fragment mit m/z 60,1 freigesetzt (Abbildung 7c; C₂H₅NO durch Spaltung der C2-C3 Bindung), welches sogar die höchste relative Signalintensität erreichte.

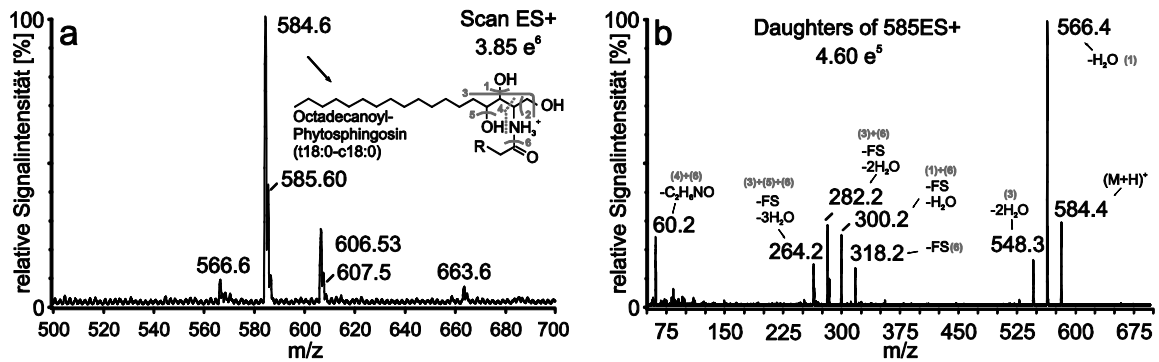


Abbildung 8: Full- und Produktskan des Ceramides Octadecanoyl-Phytosphingosin (t18:0-c18:0). Die Probe wurde in Methanol injiziert. (a) MS-Fullscan über einen m/z-Bereich von 500-700. (b) Fragmente von t18:0-c18:0 (MS/MS-Fragmentierungsmuster). Gezeigt sind die Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchung vor bzw. nach Fragmentierung des Analyten. An der Struktur von t18:0-c18:0 in (a) sind typische Fragmentierungsstellen eingezeichnet. Die Nummerierung wurde für die detektierbaren Fragmente in (b) beibehalten. Eine Wasserabspaltung ist bei allen drei Hydroxylgruppen der Sphingobase, auch in Kombination, möglich. FS: Fettsäure; y-Achse: relative Signalintensität in %; x-Achse: m/z (Masse/Ladung).

Abbildung 8 zeigt einen Fullscan des Präkursors Octadecanoyl-Phytosphingosin (t18:0-c18:0; m/z=584,6) (ohne Kollisions-induzierte Fragmentierung; „collision induced fragmentation“ CID) sowie Produktskans des Ceramids. Neben den schon für Phytosphingosin (Abbildung 7) beobachteten Wasserabspaltungen kommt es hier im MS/MS-Modus zusätzlich zur Abspaltung der Fettsäure (Abbildung 8 (b)).

Um vergleichbarere Ergebnisse trotz der strukturellen Vielfalt der untersuchten Sphingolipide zu erhalten, wurden als spezifische Fragmente nur Mono-, Di- und Tridehydratationsprodukte des Sphingobasenrückgrates, bei komplexeren SPL nach Abspaltung der Kopfgruppe und der Fettsäure, ausgewählt. Da eine Vielzahl verschiedener Substanzen innerhalb nur eines LC-Analyselaufts untersucht werden sollten, wurden die Ionisierungs- und Fragmentierungsparameter der einzelnen Analyten im sogenannten „multiple reaction monitoring“-Modus (MRM) zusammengefasst (siehe auch 3.1.2).

3.1.2. Auftrennung verschiedener SPL-Klassen mittels Flüssigkeitschromatographie

Nachdem die Detektionsparameter für die einzelnen SPL (siehe 3.1.1) gefunden waren, konnte die flüssigkeitschromatographische (LC) Auftrennung optimiert werden. Dazu wurde ein Gemisch jeweils definierter Menge aus den verfügbaren SPL-Standards im Methanol:Wasser 90:10 (bei Phosphaten: 80:20) gelöst und mittels Autosampler auf die Umkehrphasen-UPLC-Säule appliziert. Die Detektion erfolgte im Massenspektrometer. Durch Veränderung einzelner

Parameter konnte ein Gradient zur vollständigen Elution etabliert werden. Repräsentative Chromatogramme der aufgetrennten Standards sind in Abbildung 9 dargestellt.

Wie anhand Abbildung 9 zu erkennen ist, ließen sich Standardgemische freier Basen, deren 1-Phosphate und auch von Ceramiden, mit der in dieser Arbeit angewandten RP18-Chromatographie gut innerhalb eines relativ kurzen Gradienten auftrennen (24 min; inklusive Äquilibrierung). SPL, welche aufgrund ihrer physiko-chemischen Eigenschaften nur sehr geringe Unterschiede in der Retentionszeit aufwiesen, konnten dabei eindeutig anhand ihres m/z Verhältnisses im MRM-Modus unterschieden werden (z.B. t18:0 und d18:1 in Abbildung 9 (a und b)).

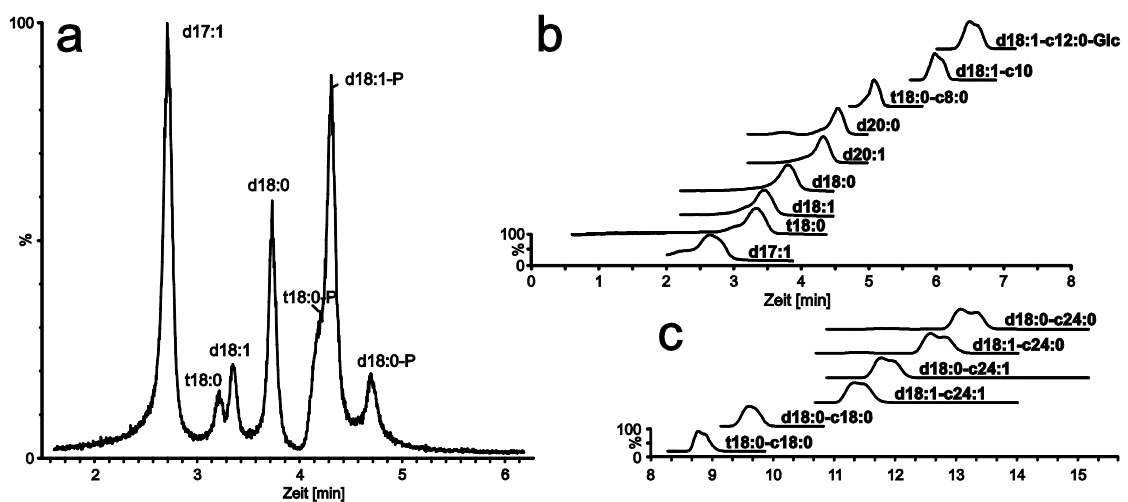


Abbildung 9: UPLC-ESI-MS/MS Elutionsprofile und relative Signalintensitäten der Sphingolipide nach Umkehrphasen-Chromatographie. (a) Sphingobasen und Sphingobasen-1-Phosphate; je 10 µg/ml in Methanol:Wasser 80:20. Gleichzeitige Messung in einem Lauf (TIC: total ion chromatogram). (b + c) Sphingobasen- und Ceramidstandards, je 1 nmol/ml in Methanol:Wasser 90:10. Analyse im MRM-Modus innerhalb eines Laufes. Die Abkürzungen stehen für die einzelnen Sphingolipide bzw. deren 1-Phosphate (z.B. d18:0 = Sphinganin). Y-Achse: relative Signalintensität in %, x-Achse: Retentionszeit (in Minuten).

Die angewandte Kombination aus UPLC und MS/MS eignete sich, um komplexe SPL-Zusammensetzungen zu analysieren. Wie aus Abbildung 9 (a) ersichtlich, ergaben jedoch gleiche Stoffmengen der unterschiedlicher Analyten unterschiedliche Signalintensitäten, abhängig von der individuellen Ionisierbarkeit und den ausgewählten Fragmentierungsparametern und Fragmentionen. Dies wurde durch Korrekturfaktoren (Responsefaktoren, siehe 3.1.3) ausgeglichen.

Durch Optimierung des UPLC-Gradienten und der MS/MS-Bedingungen des MRM-Modus konnten letztlich die in 2.3.5 (Tabelle 5, Tabelle 6 und Tabelle 7) dargestellten Parameter zur Sphingolipidanalytik etabliert werden. Abbildung 10 zeigt Lipidprofile von nach 2.3.5.4 extrahierten *A. thaliana* Lipidextrakten.

Gezeigt sind die Analyseergebnisse jeweils mit (schwarz) bzw. ohne (rot) internen Standard. Weiterhin ist das Elutionsprofil eines Standard-Gemisches (blau) überlagert. Wie in Abbildung 10 zu erkennen ist, kommen die in dieser Arbeit verwendeten internen Standards d17:1, d20:1, d20:0, t18:0-c8:0 und d18:1-c10:0 endogen nicht vor und interferieren auch nicht mit der Analytik der pflanzlichen SPL.

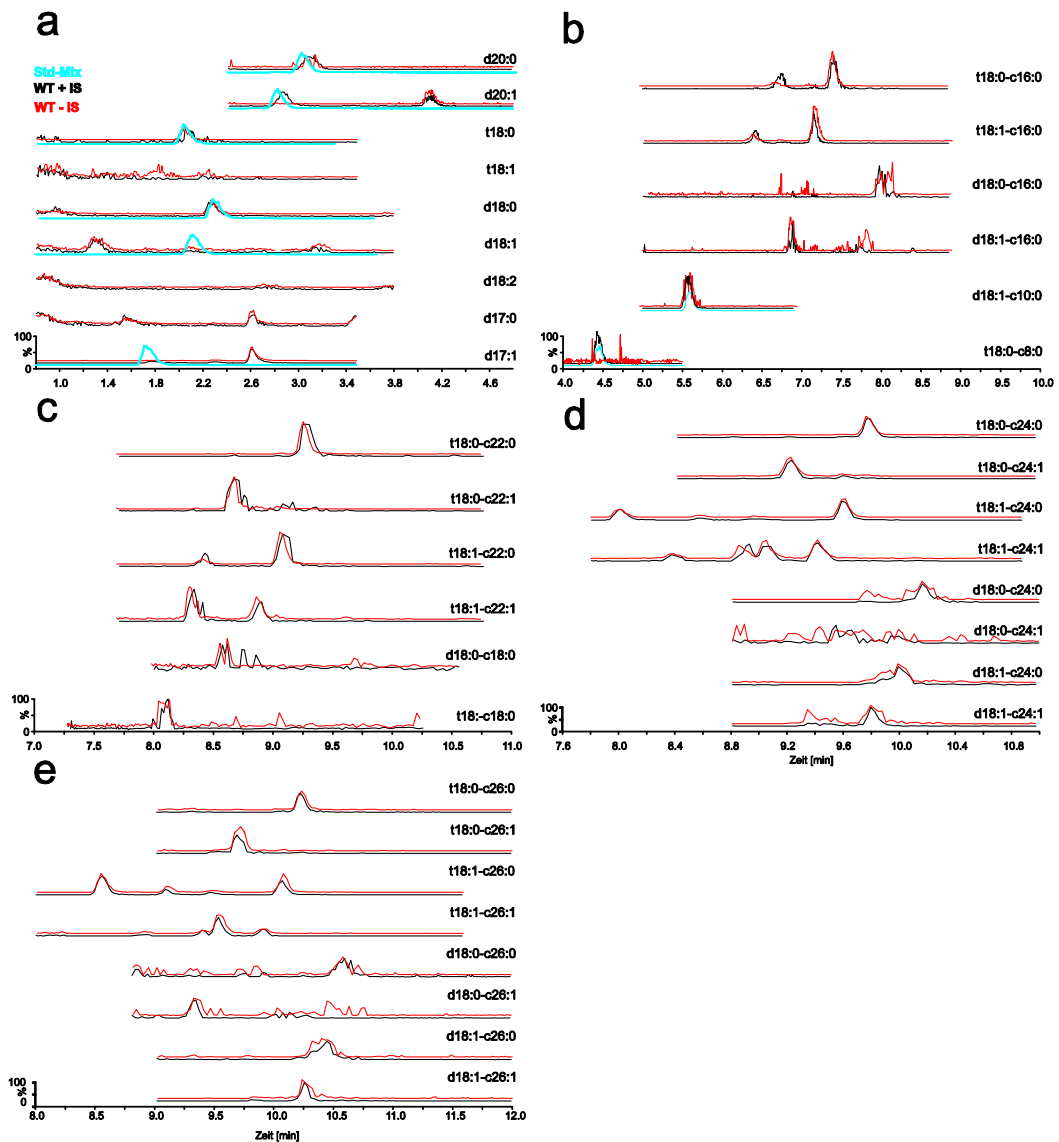


Abbildung 10: UPLC-ESI-MS/MS Elutionsprofile der Sphingolipide eines *A. thaliana* Lipidextrakts mit (je 0,1 nmol absolut) oder ohne internen Standard (IS) mittels MRM-Analyse nach Umkehrphasen-Chromatographie. (a) Sphingobasen (b - e) Ceramide. Rot: Extrakt ohne internen Standard; schwarz: Extrakt mit internem Standard; blau: Standard-Mix. Die Abkürzungen stehen für die einzelnen Sphingolipide (z.B. d18:0=Sphinganin); y-Achse: relative Signalintensität in %; x-Achse: Retentionszeit (in Minuten).

Anhand der Retentionszeiten der Standards und des Vergleichs einzelner Messungen lassen sich empirisch zudem auch solche Sphingolipide identifizieren, zu denen es keine käuflichen Standards gibt. Für diese SPL war jedoch nur eine semiquantitative Gehaltsbestimmung möglich.

3.1.3. Qualifizierung und Validierung der SPL-Analytik

Triple-QuadrupolMassenspektrometer besitzen einen großen dynamischen Messbereich über vier Dekaden. In der Praxis ist die Detektorresponse der Analyten allerdings aufgrund von Matrixeffekten auf die Ionisierbarkeiten oft nur in einem Teil dieses Bereiches tatsächlich linear. Dies trifft besonders auf Analytgemische zu, bei denen zugunsten einer gleichzeitigen Messung Kompromisse bezüglich LC- und MS-Bedingungen eingegangen werden müssen. Analytkonzentrationen außerhalb des linearen Messbereichs können somit nicht quantitativ exakt bestimmt werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass sich HPLC-ESI-MS/MS Methoden sehr gut eignen, um verschiedenste Sphingolipidklassen gleichzeitig über einen sehr weiten Messbereich hinweg zu analysieren (LIEBISCH *et al.* 1999; MARKHAM and JAWORSKI 2007; SHANER *et al.* 2009). Dabei blieb etwa bei SHANER *et al.* (SHANER *et al.* 2009) die Response des Detektorsignals z.B. über einen Bereich von 0,1-1000 pmol linear.

Zur Überprüfung, ob die in dieser Arbeit verwendete LC-MS/MS Analytik auch im in *A. thaliana* zu erwartenden Messbereich von etwa 0,5-10 pmol anzuwenden ist, wurden in Dreifachbestimmung Standardkurven der SPL-Standards erstellt (Abbildung 11). Dazu wurden die SPL in jeweils gleicher Menge einer seriellen Verdünnungsreihe unterzogen. Anschließend wurde jede Verdünnung mit einer konstanten Menge MS-IS-MIX versetzt (1,8 pmol/Injektion). Es wurden jeweils 18 µl einer Probe injiziert, was je Analyt 0,5625, 1,125, 2,25, 4,5 oder 9 pmol absolut entspricht. Die Messung erfolgte mit den in 2.3.5.5 und 2.3.5.6 dargestellten LC und MS Bedingungen.

Die Intensitäten der MRM Analyse (Peakfläche unter der Kurve, „area under curve“, AuC) sind je Injektion (Abbildung 11 (a)) oder gegen die jeweils absolut injizierte Analytmenge aufgetragen (Abbildung 11 (b-f)). Wie in Abbildung 11 (a) zu erkennen, blieb dabei die Signalintensität des Standards (bei gleicher Menge) in mehreren Injektionen etwa gleich. Dies zeigt die Robustheit und Präzision der angewandten Analyseverfahren.

Anhand der Verdünnungsreihen der Sphingobasen und Ceramide (Abbildung 11 (b-e)) ist zu erkennen, dass die Detektorresponse im Bereich von ca. 1-10 pmol für die untersuchten Analyten linear war ($R^2 > 0,99$ (Abbildung 11 b), $> 0,97$ (Abbildung 11 c), $> 0,98$ (Abbildung 11 d), $> 0,98$ (Abbildung 11 e)).

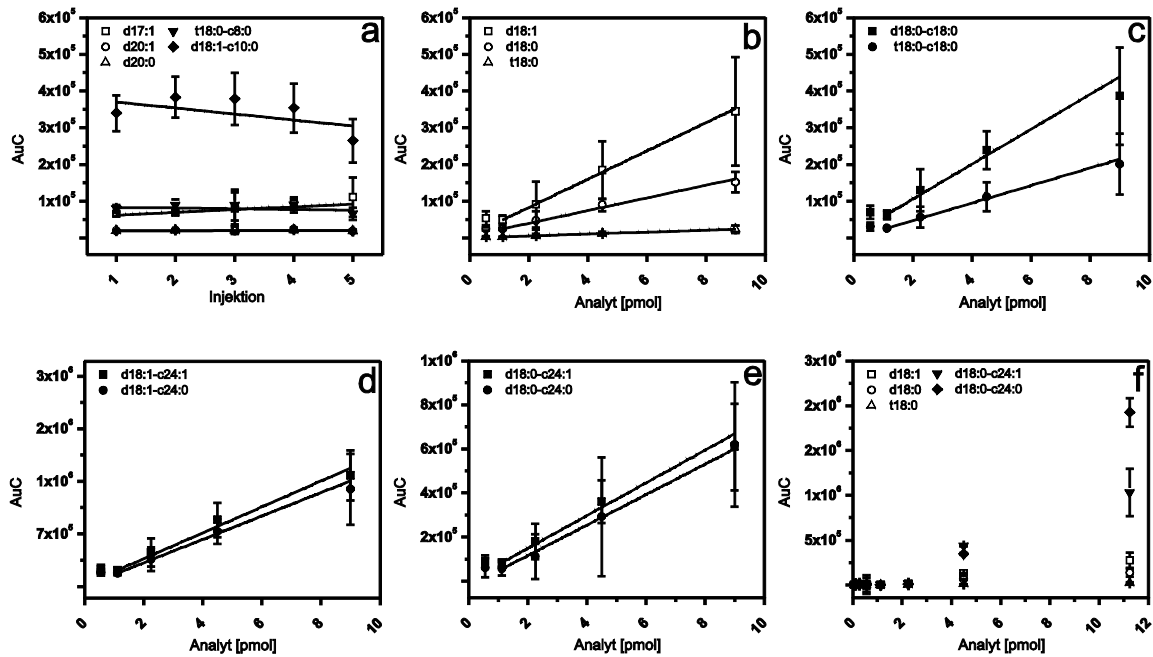


Abbildung 11: Detektorresponse der analysierten Sphingolipidstandards mit den in 2.3.5.5 und 2.3.5.6 beschriebenen LC-MS-Bedingungen im Messbereich zwischen 0,05 und 10 pmol. (a) Signalresponse der internen Standards d17:1, d20:1, d20:0, t18:0-c8:0 und d18:1-c10:0 je Injektion, jeweils 1,8 pmol absolut. (b-e) Signalresponse der analysierten Sphingobasen d18:1, d18:0 und t18:0 sowie der Ceramide d18:0-c18:0, t18:0-c18:0, d18:1-c24:1, d18:1-c24:0, d18:0-c24:1 und d18:0-c24:0, jeweils über den angegebenen Bereich der absolut injizierten Mengen. (f) Nichtlinearer Response der SPL d18:1, d18:0, t18:0, d18:0-c24:1 und d18:0-c24:0 unterhalb 1 pmol. Für die Regressionsgeraden wurden nur die Werte im linearen Responsebereich ausgewählt. AuC: area under curve (Peakfläche)

Wie aus Abbildung 11 deutlich zu erkennen ist, variierte der Response für die verschiedenen SPL stark. Dafür war vor allem die jeweilige Sphingobase verantwortlich, nicht die Fettsäure. Dies musste für die Berechnung der tatsächlichen SPL-Gehalte in einer Probe durch Responsefaktoren ausgeglichen werden. Wie in Abbildung 11 (b-e) und in (f) exemplarisch für die freien Sphingobasen d18:1, d18:0 und t18:0 sowie für die Ceramide d18:0-c24:1 und d18:0-c24:0 gezeigt, war unterhalb einer Analytmenge von ca. 1 pmol („limit of quantification“; LOQ) ein linearer Zusammenhang nicht mehr gegeben und damit eine Quantifizierung unmöglich.

Aus Abbildung 11 und Abbildung 9 (a) wird deutlich, dass unterschiedliche Analyten aufgrund unterschiedlicher Fragmentierungs- und Analysebedingungen bei gleichen Mengen unterschiedliche Ionenintensitäten (Detektorresponse) aufweisen können. Übereinstimmend mit publizierten Daten (MARKHAM and JAWORSKI 2007; SHANER *et al.* 2009), führten auch strukturelle Unterschiede in der Sphingobase zu Unterschieden in der Signalresponse (vgl. d18:1, d18:0 und t18:0 in Abbildung 11 (b) bzw. Ceramide in Abbildung 11 (c-e)). Die Kettenlänge der Fettsäure in Ceramiden bzw. deren Sättigungsgrad bei gleichem

Sphingobasenrückgrat hatte allerdings kaum Einfluss auf die Signalintensitäten (Abbildung 11 (d-e)).

Um die unterschiedliche Detektorresponse bzw. Ionisierbarkeit der verschiedenen Sphingolipide zu kompensieren, wurden für die Analyten Korrekturfaktoren (Responsefaktoren, RFs) berechnet. Dadurch sind sie bezüglich eines internen Standards (Sphingobasen: d20:1; Ceramide: d18:1-c10:0) quantifizierbar. Die jeweiligen Responsefaktoren ergaben sich nach Messung der Standardsubstanzen bekannter Konzentration nach Formel 1.

$$\text{Formel 1} \quad RF_{Analyt} = \frac{\frac{c_{iS}}{A_{iS}}}{\frac{c_{Analyt}}{A_{Analyt}}}$$

Die Berechnung der unbekanntes Analytkonzentration in den weiteren Versuchen mit Hilfe der Responsefaktoren ergibt sich nach Formel 2.

$$\text{Formel 2} \quad (c_{Analyt})_{Probe} = \frac{1}{RF_{Analyt}} * (A_{Analyt})_{Probe} * \frac{(c_{iS})_{Probe}}{(A_{iS})_{Probe}}$$

(c) = Stoffmenge und (A) = Peakfläche des Analyten (Analyt) bzw. des internen Standards (iS) in den Standardkurven oder der untersuchten Probe (Probe). RF_{Analyt} ist der jeweilige Responsefaktor (Korrekturfaktor), berechnet mit Formel 1. Die in dieser Arbeit verwendeten Responsefaktoren sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Responsefaktoren der untersuchten Analyten. Die Faktoren wurden berechnet, um für die unterschiedliche Detektorresponse zwischen den einzelnen Sphingolipiden und den internen Standards zu kompensieren, basierend auf den Werten der Standardgeraden. Für Sphingolipide, zu denen es keine kommerziell erhältlichen Standards gab, wurden empirisch RFs anhand der Daten bekannter Analyten mit ähnlicher Struktur festgelegt (in Klammern). IS: Analyten, welche als interne Standards in definierten Mengen den Proben zugesetzt wurden.

Sphingolipid	Responsefaktor	Sphingolipid	Responsefaktor	Sphingolipid	Responsefaktor
d17:1	7,7	d20:1-P	1	d18:1-c24:0	0,07
d17:0	(7)	d18:1-c12:0-P	1	d18:0-c24:1	0,5
d18:2	(9,5)	t18:0-c8:0	0,1	d18:0-c24:0	0,05
d18:1	4,3	d18:1-c10:0 (IS)	1	t18:1-c24:1	(1)
d18:0	1,9	d18:1-c16:0	(0,07)	t18:1-c24:0	(0,1)
t18:1	(3,5)	d18:0-c16:0	(0,05)	t18:0-c24:1	(1)
t18:0	0,6	t18:1-c16:0	(0,1)	t18:0-c24:0	(0,1)
d20:1 (IS)	1	t18:0-c16:0	(0,1)	d18:1-c26:1	(0,7)
d20:0	0,8	d18:0-c18:0	0,05	d18:1-c26:0	(0,07)
d17:1-P	1	t18:0-c18:0	0,1	d18:0-c26:1	(0,5)
d18:0-P	1	t18:1-c22:1	(1)	d18:0-c26:0	(0,05)
d18:1-P	1	t18:1-c22:0	(0,1)	t18:1-c26:1	(1)
d18:2-P	(1)	t18:0-c22:1	(1)	t18:1-c26:0	(0,1)
t18:0-P	1	t18:0-c22:0	(0,1)	t18:0-c26:1	(1)
t18:1-P	(1)	d18:1-c24:1	0,7	t18:0-c26:0	(0,1)

Da nicht für alle in dieser Arbeit untersuchten Analyten Referenzlipide zu Verfügung standen, wurden Responsefaktoren für die fehlenden Analyten anhand der Eigenschaften (Sphingobase; Fettsäure) und Responsefaktoren strukturell ähnlicher Sphingolipide abgeschätzt. Für diese Lipide war die angewandte Methode somit semiquantitativ.

Durch Standards konnte die grundsätzliche Eignung der massenspektrometrischen Detektion auch für die Phosphate der Sphingobasen und Ceramide gezeigt werden. Mit der in dieser Arbeit verwendeten Extraktions- und Analyseverfahren war es jedoch nicht möglich, ohne erheblichen Mehraufwand ausreichend hohe Signalintensitäten für eine qualitative oder quantitative Aussage über deren Gehalte in den tatsächlichen Lipidextrakten zu erhalten. Daher wurden hierfür keine optimierten RFs oder ISs verwendet und die Analyseergebnisse dienten nur dem qualitativen Nachweis putativ veränderter SPL-Phosphatgehalte der Behandlungskinetiken. Für Hydroxy- und Glycosylceramide wurden ebenfalls nur qualitative Daten erhoben.

Durch Einbeziehung der Menge des extrahierten Probenmaterials lässt sich weiterhin eine Gehaltsangabe je Probengewicht (Trockengewicht) bestimmen.

Abbildung 12 zeigt die Abnahme der Detektorsensitivität für die internen Standards im Laufe einer Messreihe.

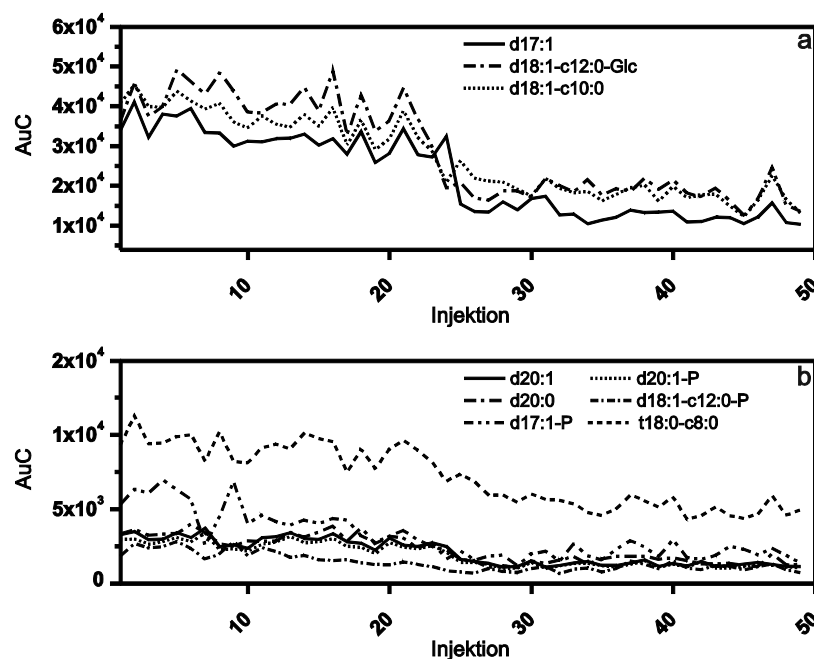


Abbildung 12: Sensitivitätsverlust des Massenspektrometers nach einer Reihe von >49 Injektionen. (a) Stark abnehmende Sensitivität um ca. 75% bei d17:1, d18:1-c12:0-Glc und d18:1-c10:0 innerhalb der Messreihe. (b) Abnahme der Sensitivität um ca. 50% innerhalb der Messreihe bei den Sphingolipiden d20:1, d20:0, d17:1-P, d20:1-P, d18:1-c12:0-P und t18:0-c8:0. Leerwerte und Standards innerhalb der Messreihe nicht gezeigt. AuC: Peakfläche.

Es wurden 49 pflanzliche Lipidextrakte mit jeweils gleichen Mengen an internem Standard analysiert. Neben den internen Standards d20:1 und d18:1-c10:0 wurden auch weitere, endogen

in *A. thaliana* nicht vorkommende, SPL in konstanter Menge eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass die Sensitivität des Detektors für eine Verbindung mit jeder Messung abnahm. Dieser Sensitivitätsverlust ist normal und zu vernachlässigen, solange das Verhältnis Analyt/Standard konstant bleibt. Während aber einige der untersuchten SPL bereits nach 20-25 Injektionen einen Responseverlust (AuC, entsprechend Detektorresponse) von 50% und ca. 75% nach 45-50 Injektionen aufwiesen (d17:1, d18:1-c12:0-Glc und d18:1-c10:0; Abbildung 12 (a)), verringerte sich die Detektorresponse bei andern Analyten weniger (ca. 50% nach 45-50 Messungen bei d20:1, d20:0, d17:1-P, d20:1-P, d18:1-c12:0-P und t18:0-c8:0; Abbildung 12 (b)). Leerwerte und Standards, welche innerhalb der Messreihe ebenfalls analysiert wurden, sind nicht aufgeführt. Auch für einige endogene Analyten lässt sich nach ca. 30 Injektionen kein einheitlicher Responseverlust mehr nachweisen (Daten nicht gezeigt). Da die untersuchten Sphingolipide mit steigender Probenanzahl offenbar stark in ihrer Ionisierbarkeit und Detektion beeinflusst werden, wurde nach ca. 25-30 Injektionen jeweils eine grobe Reinigung der leicht verschmutzbaren Teile des Massenspektrometers durchgeführt. Die ermittelten Responsefaktoren waren nach einer solchen Reinigung wieder für etwa 30 Injektionen gültig. Vor Beginn jeder neuen Messreihe wurde ebenfalls eine gründliche Reinigung des Gerätes durchgeführt.

Zur abschließenden Validierung der Extraktions- und Detektionsmethode wurde *A. thaliana* Probenmaterial mit internem Standard versetzt, die Sphingolipide nach Protokoll extrahiert und analysiert. Der Rückstand wurde reextrahiert und ebenfalls vermessen. Die Reproduzierbarkeit wurde an zwei weiteren unabhängigen Extraktionen überprüft. Dabei zeigte sich, dass die Extraktions- und Detektionsmethodik eine vernachlässigbare Varianz aufweist (Daten nicht gezeigt).

Zur Qualitätskontrolle wurden auch Standardgemische definierter Menge vor, während und nach einer Messreihe injiziert, um Veränderungen in den Retentionszeiten oder Responseprobleme zu erfassen. Dies diente auch dazu, technische Probleme während der Messungen und Sensitivitätsverluste schnell zu erkennen. Bei Abweichungen von den erwarteten Messergebnissen wurden sämtliche Proben des jeweiligen Analyselaufs erneut injiziert und vermessen. Außerdem wurden auch Leerproben (LC-Probenlösungsmittel) in unregelmäßigen Abständen analysiert, um mögliche Verschleppungen zu identifizieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden jedoch keine relevanten Retentionszeitverschiebungen beobachtet und auch die Verschleppung von Analyten durch unvollständige Elution von der Säule war zu vernachlässigen. Eine Ausnahme bilden einige Sphingobasen 1-Phosphate, welche bei unphysiologisch hohen Konzentrationen auf der eingesetzten RP18 Säule akkumulierten (Daten nicht gezeigt). Phosphorylierte Sphingolipide wurden jedoch aufgrund der zu geringen

endogenen Mengen ohnehin nicht im Detektor erfasst. Daher wurden auch keine weiteren Maßnahmen ergriffen. Die verwendete Methodik war also ausreichend robust, um die im Rahmen des Messbereichs endogen vorkommenden Analyten quantitativ bzw. semiquantitativ (SPL ohne kommerziell erhältliche Standards) zu analysieren.

3.1.4. HPLC-Fluoreszenzdetektion

Sphingolipide lassen sich nicht nur massenspektrometrisch detektieren, sondern sind nach entsprechender Derivatisierung auch fluorimetrisch nachzuweisen (siehe 2.3.5.8). Diese Methode eignet sich gut, um schnell qualitative und quantitative Daten freier Sphingobasen in Proben zu erhalten, da hierbei die substanzspezifische Ionisierbarkeit keine Rolle spielt. Durch Einsatz einer HPLC-Chromatographie (Tabelle 8) lassen sich die derivatisierten Sphingolipide ausreichend auftrennen (MERRILL *et al.* 2000).

Abbildung 13 zeigt repräsentative Chromatogramme *ortho*-Phthaldialdehyd (OPA) derivatisierter Sphingobasen.

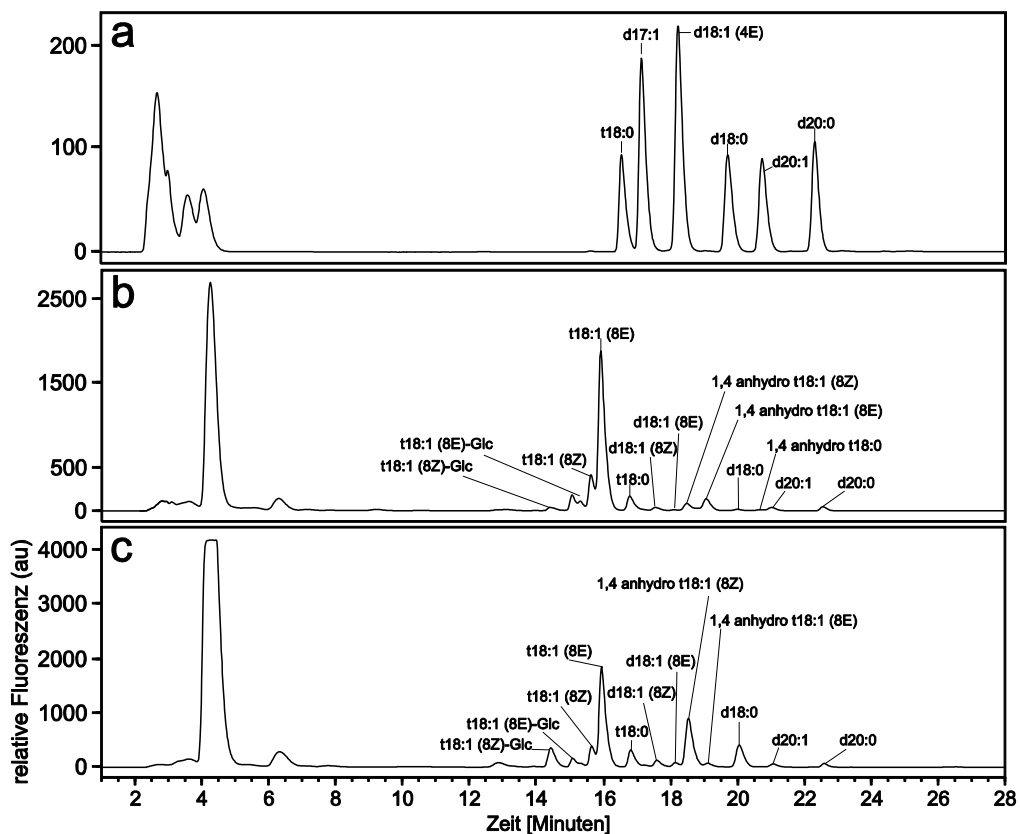


Abbildung 13: HPLC-Fluoreszenzdetektion OPA-derivatisierter Sphingolipide. SPL-Standards (a) sowie Totalhydrolysate von *A. thaliana* Col-0 (b) oder *sbh1-1* (c). Die Proben wurden mittels *o*-Phthaldialdehyd derivatisiert, chromatographisch aufgetrennt und fluorimetrisch detektiert. Gezeigt sind die jeweils detektierten Lipid-Peaks (Intensität der relativen Fluoreszenz in arbitrary units) sowie ihre Retentionszeiten (min). Eingezeichnet sind die identifizierten Sphingobasen.

Wie in Abbildung 13 (a) sichtbar, ließen sich einzelne Standardsphingobasen gut mittels der verwendeten HPLC-Methode auftrennen und anschließend im Fluoreszenzdetektor analysieren. Abbildung 13 (b) zeigt das Chromatogramm eines *A. thaliana* Wildtyp (Col-0) Hydrolysats, Abbildung 13 (c) das von der *A. thaliana* Hydroxylasemutante *sbh1-1*. Neben den freien und aus SPL freigesetzten Sphingobasen (d18:1, d18:0, t18:1 und t18:0) fanden sich auch unvollständig hydrolysierte (z.B. t18:1-Glc) Sphingolipide und weitere Spaltprodukte (z.B. 1,4 anhydro-LCBs). Durch Vergleich mit den Standards und durch Literaturvergleiche ließen sich die meisten Chromatographiepeaks zuordnen. Deutlich zu erkennen sind die relativen Gehaltsunterschiede von d18:0 in Wildtyp und *sbh1-1*. Anhand der internen Standards d20:1 und d20:0 ist auch eine Quantifizierung möglich. Durch die Verwendung einer langen RP18 Säule (250 mm, siehe 2.3.5.8) lassen sich mit dieser Methode auch E/Z Isomere (Diastereomere) der Sphingolipide unterscheiden, was jedoch in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt wurde.

3.1.5. Analyse basaler Sphingolipidgehalte in *Arabidopsis thaliana*

Aufgrund der großen strukturellen Vielfalt, welche Sphingolipide in vielen Organismen aufweisen können, war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, alle theoretisch *in vivo* vorkommenden Sphingolipidvarianten zu analysieren.

Um Änderungen der pflanzlichen Sphingolipidgehalte, etwa in Antwort auf biotischen Stress, detektieren zu können, wurde die Analyse auf sicher identifizierbare, einfache und abundante Spezies beschränkt. Dazu zählen freie Sphingobasen sowie einige abundante Ceramide, wie in MARKHAM and JAWORSKI (2007) identifiziert (vgl. Tabelle 7). Mit der in 2.3.5 und 3.1.3 beschriebenen Analytik wurden die basalen Gehalte der abundantesten freien Sphingobasen und Ceramide in *A. thaliana* untersucht (Abbildung 14).

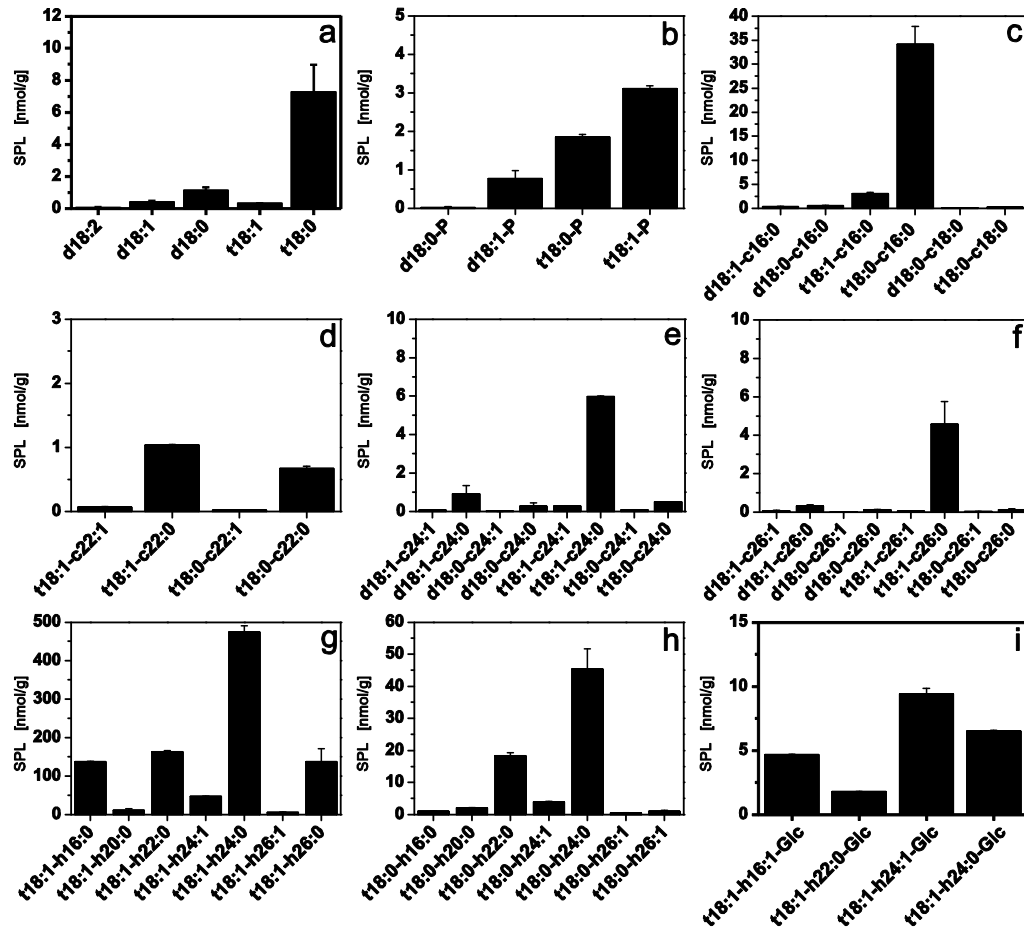


Abbildung 14: Basalspiegel untersuchter Spingolipide in Blättern von *A. thaliana*. Aufgetragen sind die jeweiligen Gehalte in nmol/g Trockengewicht für jeden Analyten. (a) Freie Spingobasen. (b) Phosphate der freien Spingobasen. (c-f) Ceramide. (g-h) Hydroxyceramide. (i) Glucosylhydroxyceramide. SPL: Spingolipide. Mittelwerte (n=3) mit Standardabweichung.

Während freie Spingobasen (Abbildung 14 (a)) und Ceramide (Abbildung 14 (c-f)) mit der angewandten Extraktions- und Analysemethodik gut zu detektieren waren, ließen sich phosphorylierte Spingolipide (Abbildung 14 (b)) innerhalb eines MRM-Laufes im positiven ESI-Modus nur sehr schwer erfassen. Hydroxyceramide (Abbildung 14 (g-h)) und Glucosylhydroxyceramide (Abbildung 14(i)) konnten nur in einem weiteren Lauf analysiert werden, um eine ausreichende Sensitivität zu gewährleisten. Bei letzteren waren semiquantitative Gehaltsbestimmungen aufgrund fehlender interner Standards allerdings nur begrenzt möglich.

3.2. Analyse der Sphingolipidgehalte in Antwort auf biotischen Stress

Wie in 3.1 dargestellt, können mit der in dieser Arbeit etablierten Sphingolipidanalytik eine Vielzahl von Sphingolipiden qualitativ und quantitativ in Blättern von *A. thaliana* nachgewiesen werden. Diese Methodik wurde im Folgenden angewandt, um die Regulation pflanzlicher Sphingolipide in der Pflanzen-Pathogen Interaktion zu untersuchen.

3.2.1. Infiltration von *A. thaliana* mit *P. syringae* pv. *tomato*

Rosettenblätter ca. 6 Wochen alter *Arabidopsis thaliana* Pflanzen wurden, wie in 2.3.1.1 beschrieben, mit *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 Kulturen oder einer 10 mM MgSO₄-Lösung (Kontrollbehandlung) infiltriert. Die Blätter wurden nach 0, 1, 2, 5, 10 und 24 h geerntet und gefriergetrocknet (2.3.5.3). Nach Zugabe der internen Standards erfolgte die Extraktion und Analyse der Sphingolipide wie in 2.3.5.4, 2.3.5.5 und 0 dargestellt. Die Auswertung und Quantifizierung erfolgte wie in 3.1.3 beschrieben.

Abbildung 15 (a-e) zeigt die erhaltenen Sphingolipidkinetiken nach Infiltration mit dem avirulenten Stamm von *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* avr), welcher das Gen für das Avirulenzprotein *avrRpm1* trägt. Die Gehalte der meisten der untersuchten 26 Ceramidspezies blieben im untersuchten Zeitraum von 24 h nach Infiltration unverändert. Eine Gehaltsänderung war für die t18:x-Ceramide t18:0-c16:0, t18:1-c22:0, t18:0-c22:0, t18:1-c24:0, t18:0-c24:0, t18:1-c26:0 und t18:0-c26:0 zu beobachten (Abbildung 15 (b-e)). Bei den freien Sphingobasen in Abbildung 15 (a) war eine deutliche Veränderung des Gehaltes nur bei t18:0 zu detektieren.

Um die Gehaltsänderungen spezifischer Sphingolipide nach Pathogeninfektion näher zu charakterisieren, wurden auch Infiltrationen mit dem virulenten *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 Stamm (*Pst* vir, Abbildung 15 (f-j)) durchgeführt. Abbildung 15 (k-o) zeigt die entsprechende Kontrollbehandlung mit Puffer (10 mM MgSO₄).

Wie anhand der Infiltration mit *Pst* vir und Puffer sichtbar wird, zeigten die Ceramide keine deutlichen Gehaltsänderungen. Jedoch war in beiden Fällen spezifisch für die Sphingobase t18:0 ein Anstieg detektierbar (Abbildung 15 (f) und Abbildung 15 (k)). Die Ceramide t18:1-c22:0, t18:0-c22:0, t18:1-c24:0 und t18:1-c26:0 wiesen, verglichen mit *Pst* vir und Kontrolle, in den mit *Pst* avr behandelten Proben basal ein erhöhtes Sphingolipidniveau auf, was auf Inhomogenität des biologischen Materials während der Messung der Proben aus Abbildung 15 zurückzuführen ist. Ein Maß für die Gehaltsänderung bleibt dennoch der zeitliche Verlauf der Sphingolipidgehalte.

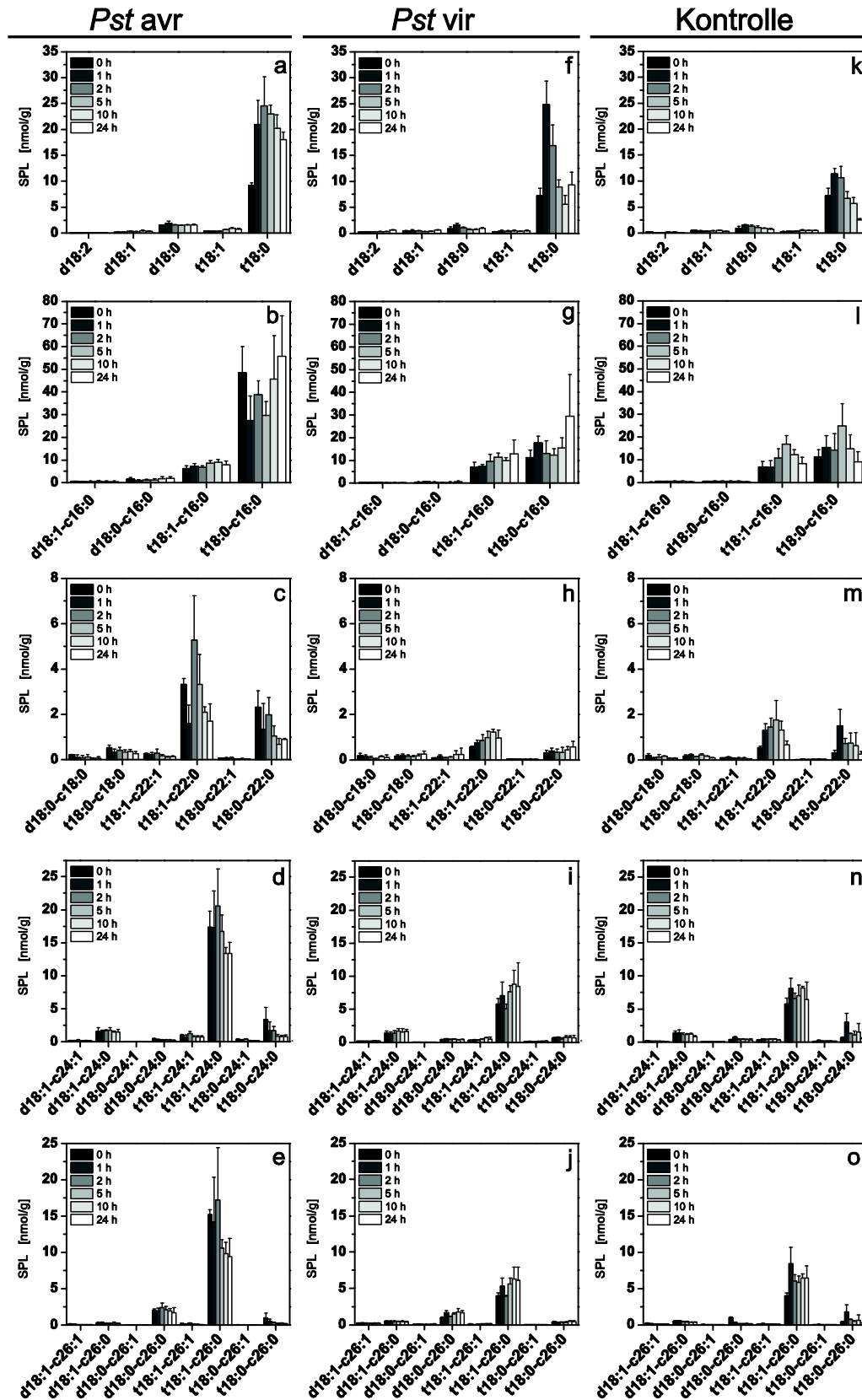


Abbildung 15: Infiltration von *A. thaliana* mit *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*). Die Pflanzen wurden mit avirulenten (*avrRpm1*) *Pst* (*Pst avr*, a-e), virulenten *Pst* (*Pst vir*, f-j) und mit Pufferlösung (Kontrolle, k-o) behandelt. Aufgetragen sind die jeweiligen Gehalte in nmol/g Trockengewicht für jeden Analyten. (a, f und k) Freie Spingobasen. (b-e, g-j und l-o) Ceramide. Die angegebenen Zeiten entsprechen der Probenahme nach Infiltration. Mittelwerte (n=3) mit Standardabweichung.

Die Analyse ergab nach Behandlung mit *Pst* avr einen schnellen (1-2 hpi), 2-3fachen und transienten Anstieg von t18:0, der auch nach 24 h das Basalniveau noch nicht wieder vollständig erreicht hatte. *Pst* vir Infiltration führte ebenfalls zu einem schnellen (1-2 hpi) und transienten Anstieg, der allerdings bereits nach ca. 5 h wieder Basalniveau erreichte. In Kontrollexperimenten (nach Infiltration der MgCl₂-Lösung ohne Bakterien) zeigte sich bei t18:0 nur ein geringer Anstieg 2 hpi, der ebenfalls 5 hpi wieder Basalniveau aufwies. Diese Kinetiken konnten auch in drei weiteren unabhängigen Wiederholungen des Experimentes reproduziert werden (Daten nicht gezeigt).

Aus der Analyse der Sphingolipidgehalte virulenter sowie avirulenter *Pst*, welche in Medium kultiviert wurden, ergab sich darüber hinaus je nach SPL ein errechneter Anteil von höchstens 0,1% in den infiltrierten Blättern, der somit vernachlässigt werden kann (Daten nicht gezeigt).

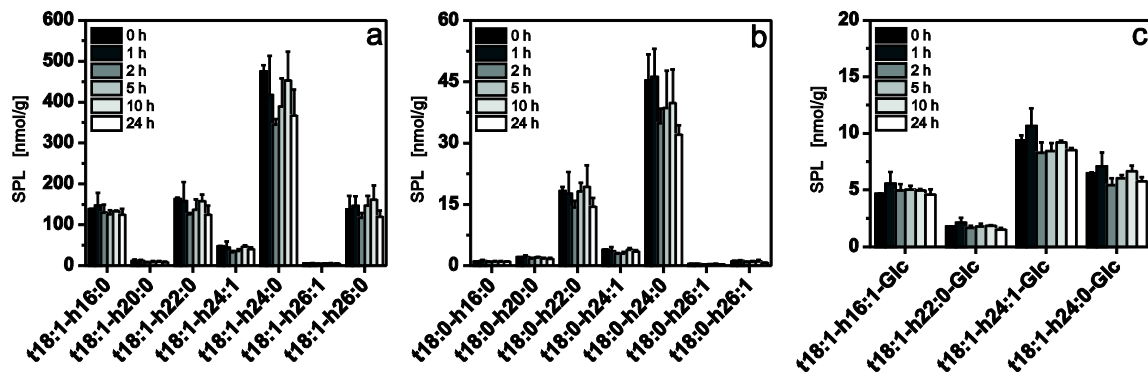


Abbildung 16: Infiltration von *A. thaliana* mit avirulenten *P. syringae* DC3000 *avrRpm1* (*Pst* avr). Aufgetragen sind die jeweiligen Gehalte in nmol/g Trockengewicht für jeden Analyten. (a-b) Hydroxyceramide. (c) Glucosylhydroxyceramide. Die angegebenen Zeiten entsprechen der Probenahme nach Infiltration. Mittelwerte (n=3) mit Standardabweichung.

Aufgrund der obigen Ergebnisse wurde überprüft, ob die beobachteten schnellen Gehaltsänderungen nach *Pst* Infiltration nicht nur die freie Sphingobase t18:0 und spezifische t18:x-Ceramide betreffen, sondern auch die Gehalte weiterer komplexer Sphingolipide beeinflusst werden. Dazu wurden die Gehalte einiger abundanter t18:x-Hydroxy- und Glucosylhydroxyceramide gemessen (Abbildung 16) und näherungsweise ihr Gehalt bestimmt (siehe hierzu auch 3.1.5). Betrachtet man die Kinetiken, ergaben sich keine deutlichen Gehaltsänderungen. Ebenso waren die Gehalte an phosphorylierten Sphingobasen unterhalb der Detektionsgrenze (Daten nicht gezeigt). Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde daher auf deren Untersuchung verzichtet.

3.2.2. Verwundung von *A. thaliana*

Zu überprüfen war, ob die geringen Gehaltsänderungen freier LCBs, wie sie auch nach Kontrollinfiltration (Abbildung 15) auftreten, durch mechanische Verwundung etwa durch das Aufsetzen der Infiltrationsspritze hervorgerufen werden. Hierzu wurden *A. thaliana* Blätter mittels Pinzette, wie in 2.3.2 beschrieben, verwundet und der Verlauf der Sphingolipidgehalte überprüft.

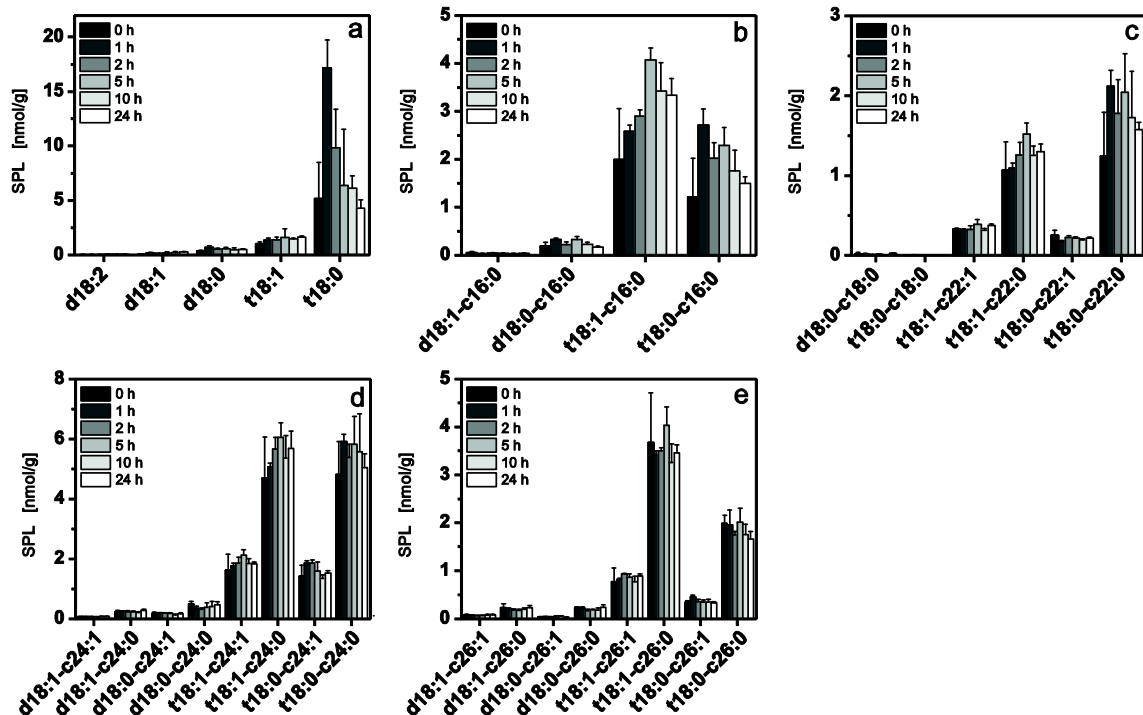


Abbildung 17: Verwundung von *A. thaliana* mittels Pinzette. Jedes behandelte Blatt wurde an beiden Seiten der Lamina je achtmal gequetscht. Die Mittelrippe wurde dabei nicht verletzt. Aufgetragen sind die jeweiligen Gehalte in nmol/g Trockengewicht für jeden Analyten. (a) Freie Sphingobasen. (b-e) Ceramide. Die angegebenen Zeiten entsprechen der Probenahme nach Verwundung. Mittelwerte ($n=3$) mit Standardabweichung.

Wie aus Abbildung 17 ersichtlich, wirkte sich eine starke mechanische Verwundung nicht auf die Gehalte der untersuchten Ceramide aus (Abbildung 17 (b-e)). Bei t18:0 war ein ca. dreifacher transienter Anstieg messbar, der 5-10 h nach Verwundung wieder das Basalniveau erreichte (Abbildung 17 (a)). Der Effekt starker Verwundung auf t18:0 entspricht etwa dem Anstieg nach Infiltration mit virulenten *Pst* (Abbildung 18). Die Infiltrationsmethodik (siehe Kontrolle, Abbildung 18) führt verglichen dazu nur zu einem schwachen t18:0-Anstieg.

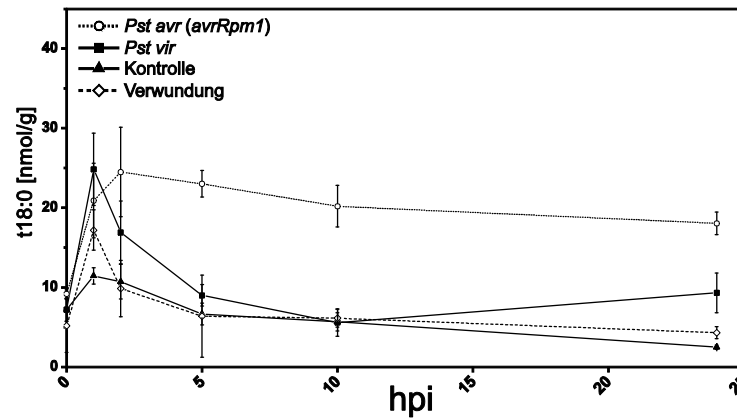


Abbildung 18: Zeitliche Veränderung der Gehalte an t18:0 in *A. thaliana* nach Pathogeninfiltration (*Pst avr* und *Pst vir*), Pufferinfiltration (Kontrolle) und starker mechanischer Verwundung mittels Pinzette (Verwundung). Aufgetragen ist der t18:0 Gehalt in nmol/g Trockengewicht für jeden Messzeitpunkt nach Behandlung. hpi: hours post infection – Zeit nach der Behandlung. Mittelwerte (n=3) mit Standardabweichung. Verändert aus (PEER *et al.* 2010).

3.2.3. Behandlung von *A. thaliana* mit weiteren Pathogenen

Wie in 3.2.1 gezeigt, führte die Behandlung von *A. thaliana* Blättern mit dem Pathogen *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 zu einer spezifischen Änderung einiger Sphingolipidspiegel, v.a. von der freien Sphingobase t18:0 und t18:x-basierter Ceramide. Diese Änderungen sind nur im geringen Maße durch eine mechanische Verwundung bei der Infiltration bedingt (3.2.2).

Um zu überprüfen, ob neben *Pst* noch weitere Pathogene einen Einfluss auf die Sphingolipidgehalte aufweisen, wurden die in 2.1.6.2 aufgeführten Pathogene, wie in 2.3.1.1 beschrieben, verwendet.

3.2.3.1. Infiltration mit *P. syringae* pv. *maculicola*

Virulente und avirulente (*avrRpm1*) Pathogene des Stammes *P. syringae* pv. *maculicola* (*Psm*) wurden wie in 2.1.6.2 kultiviert ($OD_{600} = 0,2$) und infiltriert. Die Extraktion und Analyse der SPL erfolgte analog zu 3.2.1.

Wie aus Abbildung 19 (b-e, g-j und l-o) ersichtlich, waren nur geringfügige Gehaltsveränderungen der Ceramide nach Infiltration mit *Psm* zu beobachten. Betrachtet man jedoch den kinetischen Verlauf für die Konzentrationen der freien Sphingobasen (Abbildung 19 (a, f und k)), so lässt sich spezifisch für t18:0 ein transienter Anstieg beobachten, der im Falle von avirulenten *Psm* erst nach 24 h wieder Basalniveau erreichte. Behandlung mit virulenten *Psm* sowie mit Puffer führten ebenfalls zu einem transienten Anstieg der t18:0 Gehalte, erreichten aber schon nach 5 h wieder Basalniveau. Auch t18:1, besonders nach *Psm avr*, wies einen transienten Anstieg auf.

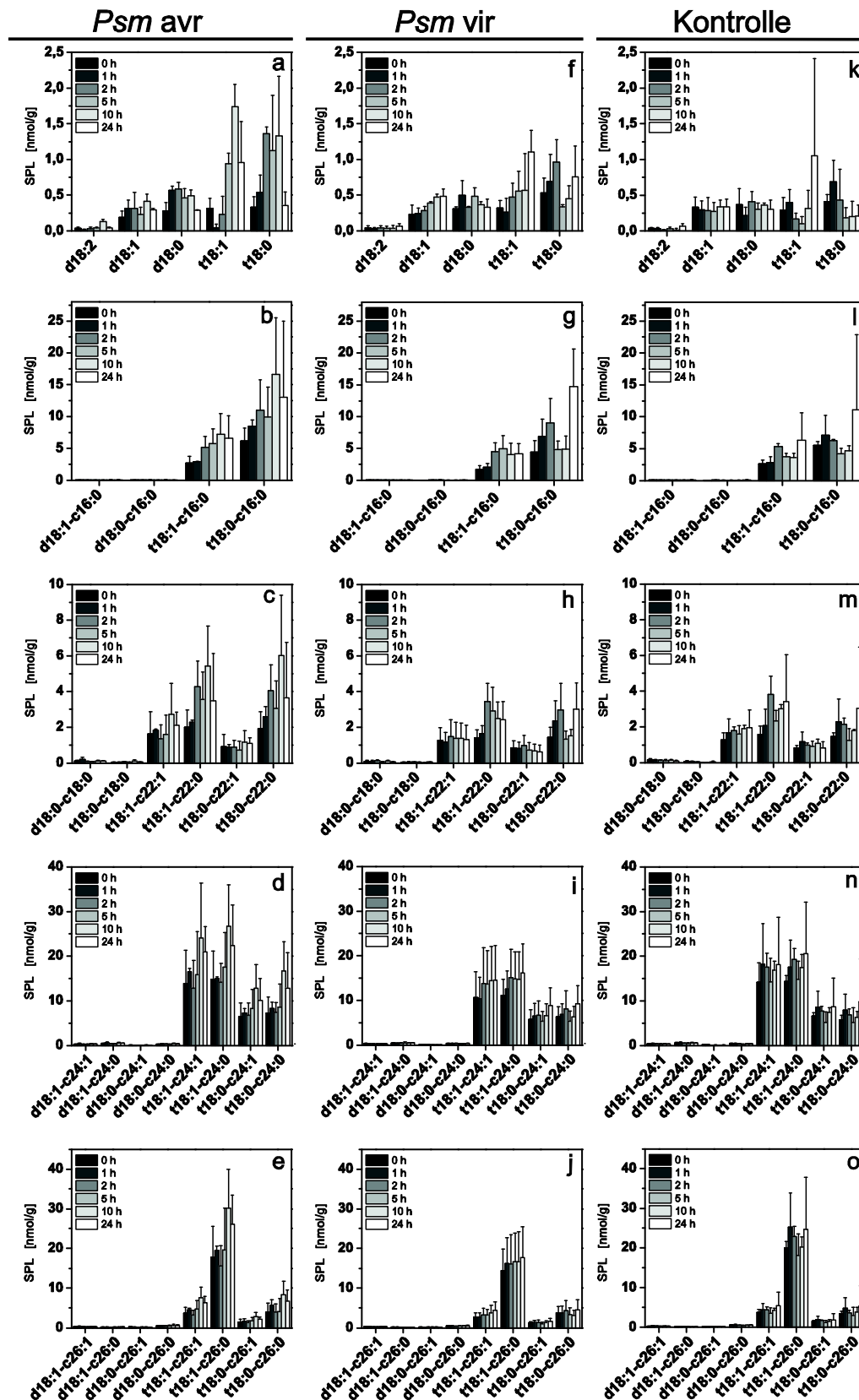


Abbildung 19: Infiltration von *A. thaliana* mit *P. syringae* pv. *maculicola* (*Psm*). Die Pflanzen wurden mit avirulenten (*avrRpm1*) *Psm* (*Psm avr*, a-e), virulenten *Psm* (*Psm vir*, f-j) und mit Pufferlösung (Kontrolle, k-o) behandelt. Aufgetragen sind die jeweiligen Gehalte in nmol/g Trockengewicht für jeden Analyten. (a, f und k) Freie Spingobasen. (b-e, g-j und l-o) Ceramide. Die angegebenen Zeiten entsprechen der Probenahme nach Infiltration. Mittelwerte (n=3) mit Standardabweichung.

Im Vergleich zu der Messreihe *Pst*-behandelter Blätter (Abbildung 15), waren die hier absolut gemessenen Sphingolipidgehalte, v.a. die der freien Sphingobasen, geringer. Dies könnte sowohl an unterschiedlichen Sphingolipidgehalten verschiedener Pflanzenproben als auch an unterschiedlichen Extraktions- und Detektionseffizienzen liegen.

3.2.3.2. Inokulation mit *Sclerotinia sclerotiorum*

Der Einfluss auf das Sphingolipidprofil wurde auch nach Infektion mit dem nekrotrophen Ascomycet *Sclerotinia sclerotiorum* untersucht. Dazu wurden *A. thaliana* Blätter, wie unter 2.3.1.1, 2.3.5.4 und 3.1.5 beschrieben, behandelt und nach drei Tagen der Sphingolipidgehalt analysiert. Aufgrund der nur lokalen Infektion und der damit verbundenen geringen und heterogenen Probenmenge ist keine kinetische Untersuchung im Zeitraum von wenigen Stunden wie nach *Pst*-Behandlung möglich. Allerdings lässt der Vergleich des Sphingolipidprofils von behandelten Blättern mit unbehandelten Blättern derselben Pflanze (systemische Blätter) 60 hpi auch auf eine Beteiligung der Sphingolipide bei der Pflanzen-Pilz-Interaktion schließen. Besonders deutlich wird das durch den Vergleich mit systemischen Blättern einer *mit S. sclerotiorum* behandelten Pflanze (Abbildung 20).

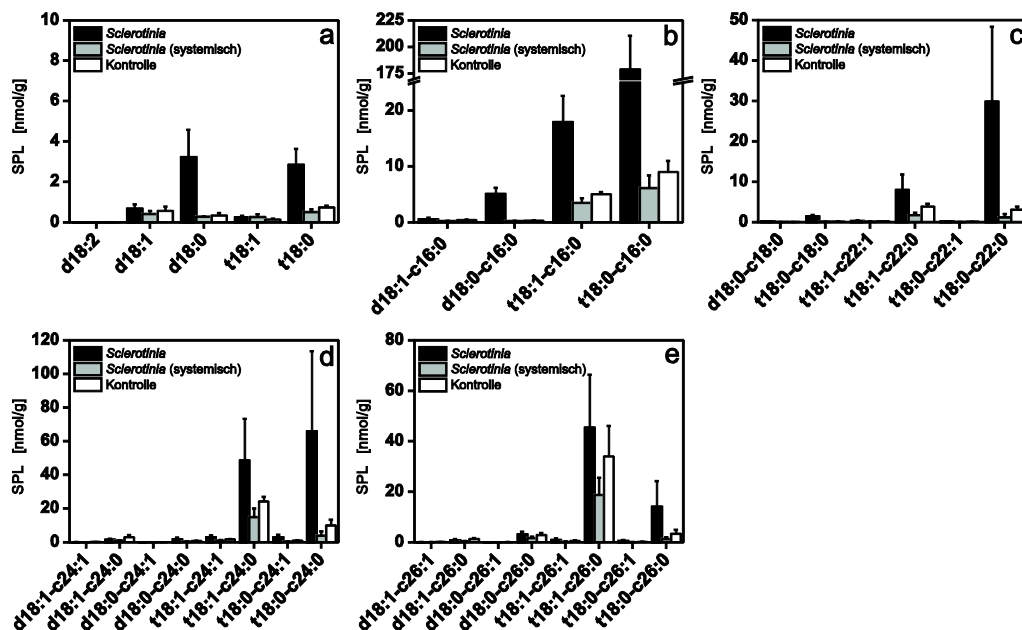


Abbildung 20: Sphingolipidprofil von *A. thaliana* Blättern, 60 hpi mit dem nekrotrophen Ascomycet *Sclerotinia sclerotiorum*. Die Blätter wurden durch *S. sclerotiorum* enthaltende Agarblöcke infiziert (*Sclerotinia*). Als Kontrolle dienten systemische unbehandelte Blätter der gleichen Pflanze (*Sclerotinia* (systemisch)) oder Blätter unbehandelter Pflanzen (Kontrolle). Aufgetragen sind die jeweiligen Gehalte in nmol/g Trockengewicht für jeden Analyten. (a) Freie Sphingobasen. (b-e) Ceramide. Mittelwerte (n=4) mit Standardabweichung.

Wie aus den Messungen deutlich wird, zeigten einige Ceramide, v.a. d18:0-c16:0, t18:1-c16:0, t18:0-c16:0, t18:1-c22:0, t18:0-c22:0, t18:1-c24:0, t18:0-c24:0, t18:1-c26:0 und t18:0-c26:0 erhöhte Gehalte nach *S. sclerotiorum* Infektion (Abbildung 20 (b-e)). Bei den freien Sphingobasen (Abbildung 20(a)) war ein starker Anstieg von d18:0 und t18:0 zu detektieren.

3.2.4. Einfluss von Effektoren, Inhibitoren und SPL

In 3.2.1 und 3.2.3 konnte gezeigt werden, dass Pathogene nach Infektion eine schnelle transiente Veränderung spezifischer Sphingolipidspiegel in *A. thaliana* Blättern hervorrufen. Ob durch PAMPs alleine auch eine solche Induktion erzielt werden kann, wurde ebenfalls untersucht.

3.2.4.1. Infiltration mit flg22

Durch Infiltration des Effektorpeptids flg22 sollte überprüft werden, ob Sphingolipide in der Signalweiterleitung bei der Flagellin-abhängigen PAMP/MAMP-vermittelten Abwehrreaktion in *A. thaliana* Col-0 beteiligt sind.

Abbildung 21 zeigt die Ergebnisse der flg22 Behandlung. Während sich im zeitlichen Verlauf die Ceramidgehalte nach flg22 Infiltration im Vergleich zur Kontrolle kaum änderten (Abbildung 21 (b-e) und (g-j)), so zeigte die LCB t18:0 tendenziell einen etwas erhöhten Gehalt zwischen 2 und 10 hpi. Dies konnte aber aufgrund fehlender repräsentativer Wiederholungen nicht näher untersucht werden.

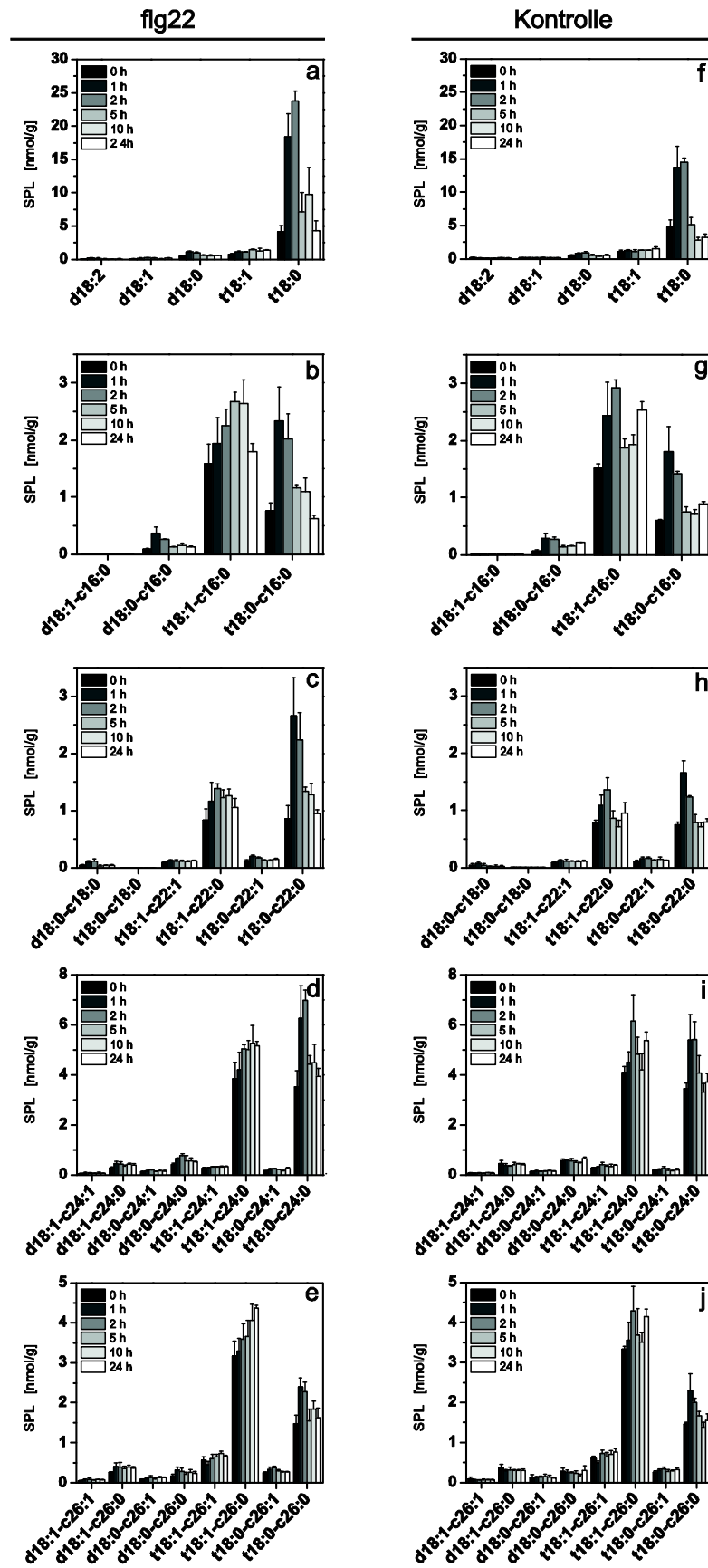


Abbildung 21: Infiltration von *A. thaliana* mit dem bakteriellen Peptid flg22. Die Blätter wurden mit Flagellin (flg22, a-e) oder mit Pufferlösung (Kontrolle, f-j) behandelt. Aufgetragen sind die jeweiligen Gehalte in nmol/g Trockengewicht für jeden Analyten. (a und f) Freie Spingobasen. (b-e und g-j) Ceramide. Die angegebenen Zeiten entsprechen der Probenahme nach Infiltration. Mittelwerte (n=3) mit Standardabweichung.

3.2.4.2. Infiltration mit Fumonisin B1

Durch den Einsatz von FB1 (10 μ M) sollte untersucht werden, ob eine blockierte *de novo*-Synthese im Zeitraum von wenigen Stunden zu einer deutlichen Akkumulation von freien Sphingobasen führt und somit die *de novo* Synthese theoretisch ausreichend für die beobachteten Anstiege nach Pathogenbehandlung sein kann.

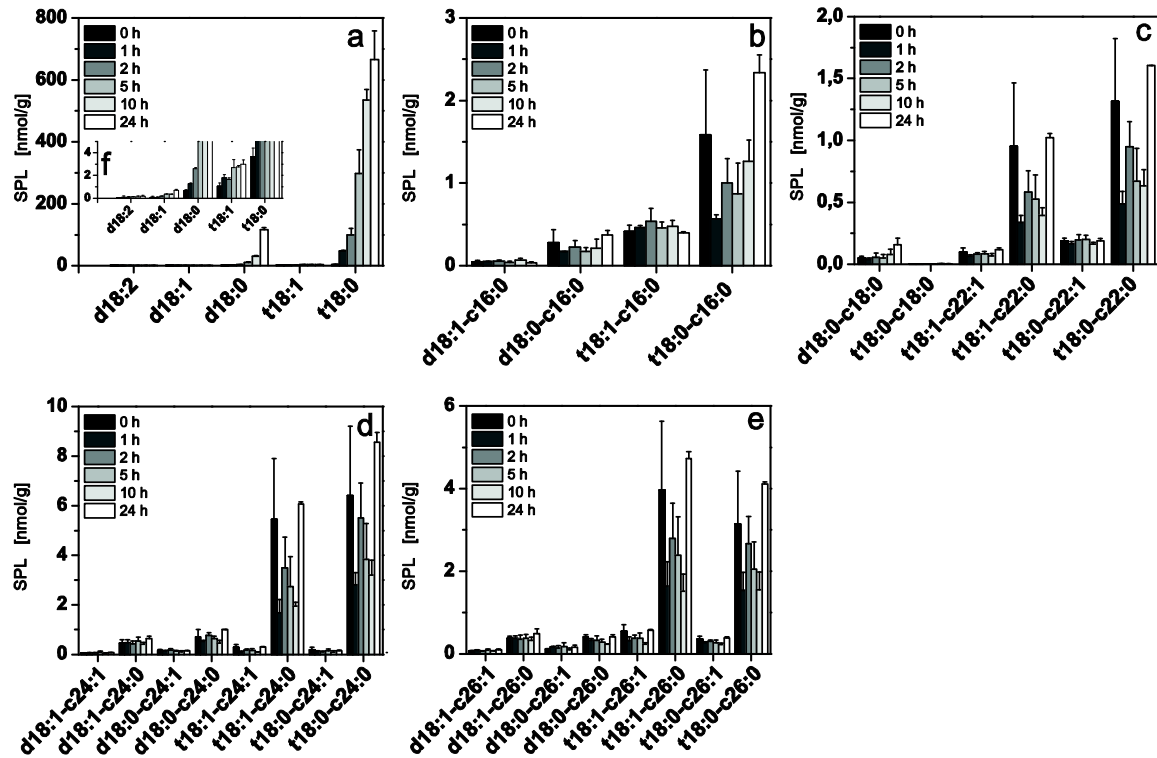


Abbildung 22: Infiltration von *A. thaliana* mit dem Toxin Fumonisin B1 (FB1; 10 μ M). Aufgetragen sind die jeweiligen Gehalte in nmol/g Trockengewicht für jeden Analyten. (a) Freie Sphingobasen. (b-e) Ceramide. (f) Vergrößerung aus (a). Die angegebenen Zeiten entsprechen der Probenahme nach Infiltration. Mittelwerte (n=3) mit Standardabweichung.

Abbildung 22 zeigt das Ergebnis der FB1 Infiltration. Während die Gehalte an Ceramiden unverändert blieben (Abbildung 22 (b-e)), stiegen die Gehalte der freien Sphingobasen d18:0 und t18:0 (Abbildung 22 (a und f)) bereits nach 2 bzw. 1 hpi stark an. Dieser Gehaltsanstieg blieb über den beobachteten Zeitraum von 24 h bestehen, so dass es zu einer konstanten Akkumulation von d18:0 und t18:0 kam. Inhibition der Ceramid-Synthese durch FB1 kann also auch zu sehr schnellen Gehaltsänderungen der freien Sphingobasen führen. Dieser Anstieg basiert offenbar auf *de novo* Synthese. In einem weiteren Versuch erfolgte 2 h nach FB1 Infiltration die Infektion mit virulenten bzw. avirulenten *Pst* (Daten nicht gezeigt). Aufgrund des starken FB1-Effekts auf die Sphingobasengehalte war hier jedoch kein zusätzlicher Anstieg bzw. eine transiente Regulation zu beobachten.

3.2.4.3. *Infiltration mit SPL*

Die Gehalte spezifischer Sphingolipide, besonders von t18:0, steigen nach Pathogenkontakt (3.2.1 und 3.2.3) und die *de novo* Synthese ist ausreichend, um die schnellen (1-2 hpi) Änderungen zu erhalten (3.2.4.2). Desweiteren ist nach Pathogeninfektion mit der Abnahme der Sphingobasengehalte 5-24 hpi auch eine Zunahme einiger Ceramide, besonders der t18:x-Ceramide, zu beobachten (vgl. Abbildung 15). Dies legt den Schluss nahe, dass die Konzentration freier Sphingobasen streng reguliert wird und dass es sich bei den transient veränderten Ceramidgehalten um Metabolismusintermediate einer solchen Regulation handeln könnte.

Um den Metabolismus freier Sphingobasen *in vivo* zu untersuchen, wurden daher die Sphingobasen d18:0 und t18:0 infiltriert.

Wie aus Abbildung 23 ersichtlich, wurden durch Infiltration mit SPL-Lösungen (2.3.1.2) endogen hohe Konzentrationen der entsprechenden LCBs in den Blättern erreicht, während die Kontrollinfiltration mit Puffer lediglich zu der durch Verwundung ausgelösten Erhöhung der SPL-Gehalte führte. Proben für den Zeitpunkt t=0 wurden (wie in allen Experimenten dieser Arbeit) direkt nach Infiltration erhalten, beinhalten also schon das Infiltrat. Die Gehalte an den freien Basen t18:0 und d18:0 wurden stark reguliert. Bereits 5 h nach der Infiltration war der Gehalt an freiem t18:0 um 78% reduziert (14,3 nmol/g DW gegenüber 63,9 nmol/g DW) (Abbildung 23 (a)), während der Gehalt an d18:0 um 53% sank (236,2 nmol/g DW gegenüber 457,9 nmol/g DW) (Abbildung 23 (f)). Danach war keine schnelle Abnahme der LCB Gehalte mehr detektierbar.

Infiltration von t18:0 führte bereits 2 h nach Infiltration zu Anstiegen einiger einfacher Ceramide (t18:1-c16:0, t18:0-c16:0, t18:1-c22:0, t18:0-c22:0, t18:0-c24:0 und t18:0-c26:0) (Abbildung 23 (b-e)), welche aber bereits ca. 5 h nach Infiltration wieder Basalniveau erlangten (t18:1-c22:0 und t18:1-c24:0 je 24 h nach Infiltration). Der Metabolismus von d18:0 führte ebenfalls zu Änderungen in den Ceramidgehalten. Neben den bereits oben genannten Ceramiden (t18:1-c16:0, t18:0-c16:0, t18:1-c22:0, t18:0-c22:0, t18:0-c24:0 und t18:0-c26:0) war außerdem bei dem Ceramid d18:0-c18:0 eine Gehaltsänderung zu verzeichnen (Abbildung 23 (g-j)).

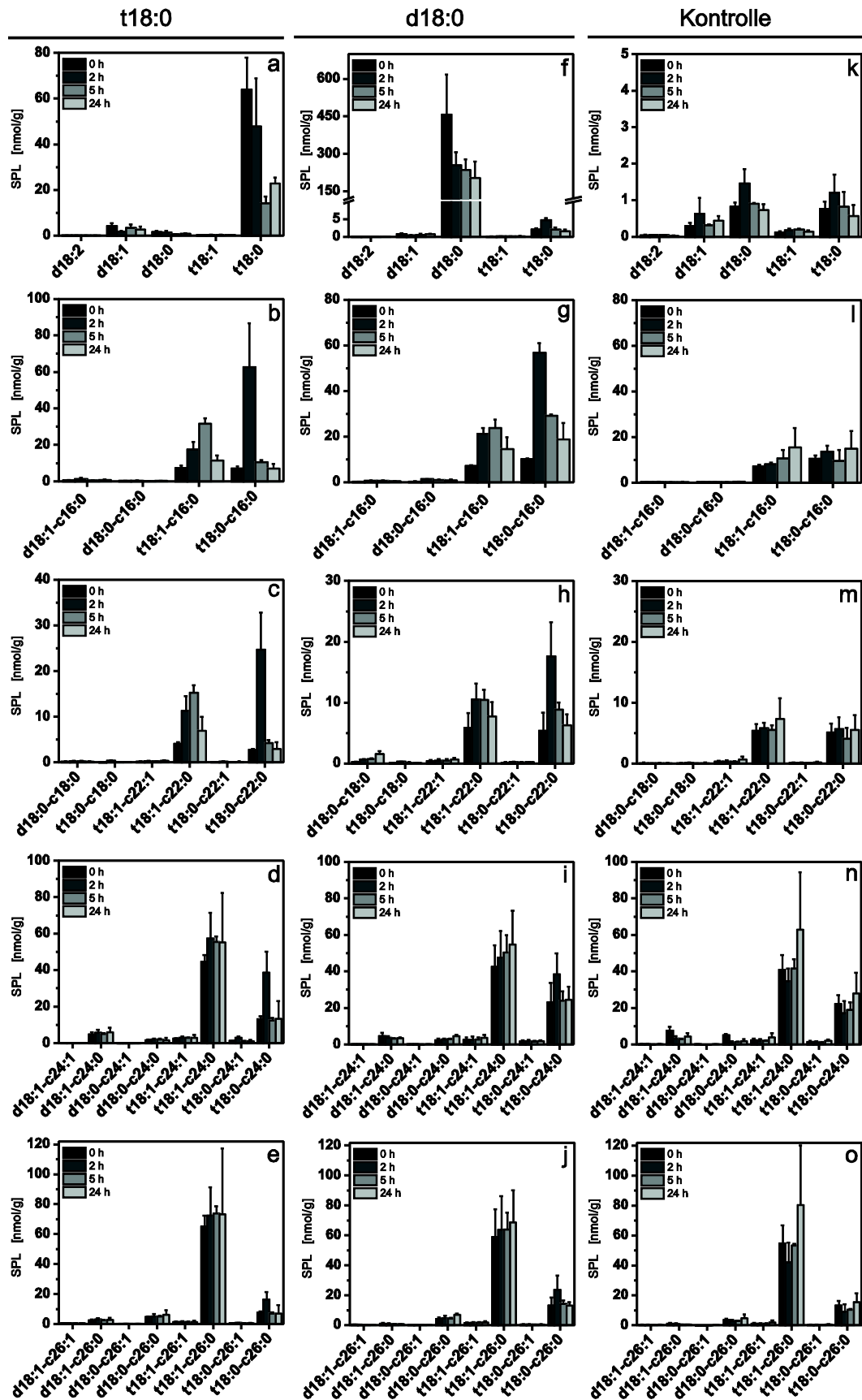


Abbildung 23: Infiltration von je 50 μM t18:0 (a-e) und d18:0 (f-j) bzw. Kontrolle (10 mM MgSO_4 ; k-o) in Blätter von *A. thaliana*. Aufgetragen sind die jeweiligen Gehalte in nmol/g Trockengewicht für jeden Analyten. (a, f und k) Freie Sphingobasen. (b-e, g-j und l-o) Ceramide. Die angegebenen Zeiten entsprechen der Probennahme nach Infiltration. Mittelwerte ($n=3$) mit Standardabweichung.

3.3. Selektion homozygoter T-DNA Mutanten

In Fokus dieser Arbeit stand die Bedeutung von Sphingolipiden in der Interaktion zwischen *A. thaliana* und Pathogenen. Obwohl bereits verschiedene Funktionen den SPL zugeschrieben werden konnten, ist eine abschließende funktionelle Charakterisierung, besonders in Pflanzen, nicht erreicht. Ein wichtiges Werkzeug um diesem Ziel näher zu kommen ist die Verwendung von *A. thaliana* Mutanten, welche in spezifischen Biosynthese- und Metabolismusgenen defekt sind. Problematisch dabei sind die nur sehr lückenhafte Kenntnis vieler beteiligter Enzyme, vornehmlich aus Sequenzvergleichen mit tierischen Systemen und Hefen, sowie die Redundanz wichtiger Enzyme in Organismen.

Durch Auswertung von Publikationen (DICKSON 1998; DUNN *et al.* 2004; LYNCH and DUNN 2004) und Online-Datenbanken (z.B. www.lipidmaps.org; www.lipidomicNet.org) war es möglich, eine, wenn auch vermutlich unvollständige, Liste der wichtigsten Enzyme zu erstellen, welche besonders für die Biosynthese und den Metabolismus der freien Sphingobasen verantwortlich zeichnen (Tabelle 10).

Sofern erhältlich, wurden zu den ausgewählten Enzymen je zwei unterschiedliche SALK-T-DNA-Linien bezogen und auf ihre Insertion hin überprüft. Nur Homozygote Mutanten sollten anschließend einer phänotypischen und funktionellen Überprüfung unterzogen.

Die *A. thaliana*-Linien wurden wie in 2.1.6.1 kultiviert und wie in 2.2.5, 2.2.6 und 2.2.7.1 beschrieben mittels PCR auf das Vorhandensein von T-DNA hin überprüft.

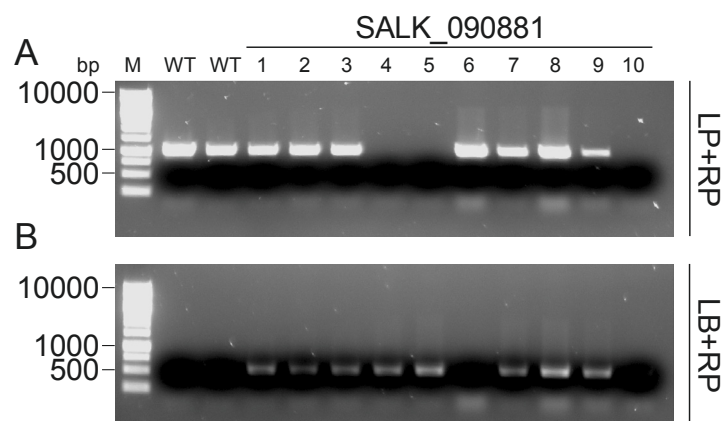


Abbildung 24: Gelbild des PCR-Ergebnisses eines T-DNA-Screenings. Überprüft wurde die SALK-Linie 090881. Als Kontrolle dienten zwei unabhängige WT DNA Proben. (A) LP+RP-Primerpaar zum Nachweis des WT-Gens. (B) LB+RP-Primerpaar zum Nachweis der Insertion. M: Marker; WT: Wildtyp; 1-9: Nachkommen der SALK-Linie 090881; LP: linker Primer; LB: left-border Primer; RP: rechter Primer.

Abbildung 24 zeigt exemplarisch das Ergebnis solch einer Überprüfung Anhand der *A. thaliana* Linie SALK_090881 (*sbh1-1*) mit den dafür spezifischen Primerpaaren aus 2.1.3. Eine Bande, wie sie im WT bei ca. 1000 bp erwartet wird, ist neben den zwei tatsächlichen WT-Proben auch in

den *sbh1-1*-Nachkommen 1-3 und 6-9 erkennbar. Eine Bande, wie sie nach T-DNA Insertion bei ca. 500-700 bp zu erwarten ist, findet sich nicht in den beiden WT Linien, dafür in den *sbh1-1*-Nachkommen 1-5 und 7-9. Der *sbh1-1-10* zeigte keine Bande. Aufgrund der Primerspezifität lässt sich somit sagen, dass die *sbh1-1*-Nachkommen 1-3 und 7-9 heterozygot für die Insertion sind. Die *sbh1-1*-Nachkommen 4 sowie 5 sind homozygot, während *sbh1-1-6* keine Insertion im untersuchten Gen trägt (entspricht WT). Bei *sbh1-1-10* scheint die DNA-Extraktion fehlerhaft gewesen zu sein. Von beiden positiv-homozygoten *sbh1-1*-Nachkommen 4 und 5 wurden Samen erhalten und erneut angezogen. Diese F1-Generation wurde ebenfalls wieder mit den entsprechenden Primern auf Homozygotie überprüft. Das Ergebnis für *sbh1-1-4* ist in Abbildung 25 gezeigt. Während die WT-Kontrolle eine Bande bei ca. 1000 bp aufweist, konnte in den Nachkommen der Linie *sbh1-1-4* 1-4 und 6-11 nur die T-DNA-Insertion nachgewiesen werden. *sbh1-1-4* Nachkomme 5 wies keine Bande auf, was auf einen Fehler bei der DNA-Extraktion zurückzuführen ist. *sbh1-1-4* wurde somit als homozygote Mutante angesehen.

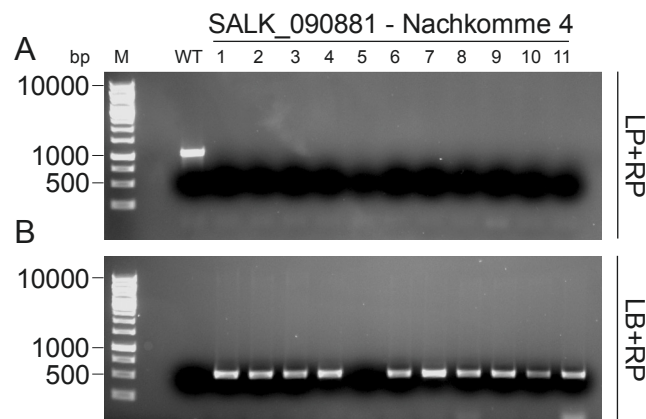


Abbildung 25: Gelbild des PCR-Ergebnisses eines T-DNA-Screenings. Überprüft wurde der Nachkomme 4 der SALK-Linie 090881 (*sbh1-1*). Als Kontrolle diente eine WT DNA Probe. (A) LP+RP-Primerpaar zum Nachweis des WT-Gens. (B) LB+RP-Primerpaar zum Nachweis der Insertion. M: Marker; WT: Wildtyp; 1-9: F1-Linien der Linie *sbh1-1-4*; LP: linker Primer; LB: left-border Primer; RP: rechter Primer

Wie im obigen Beispiel wurde mit allen vorhandenen SALK-Linien verfahren. Nur Linien, welche in den Folgegenerationen homozygot für die entsprechende Insertion waren, wurden erhalten und für weitere Untersuchungen verwendet. Soweit möglich wurden zwei homozygote Mutantenlinien generiert. Bei einigen Linien war es nötig, dieses Screeningverfahren über mehrere Generationen hinweg anzuwenden, um homozygote Mutantenlinien zu erhalten. Dies ist durch die Nomenklatur ersichtlich (z.B. 11-3C2). Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: Liste der durch PCR-Untersuchung bestätigten homozygoten T-DNA Insertionslinien mit in dieser Arbeit verwendeten Zuordnungsnummern und Abkürzungen. Soweit möglich wurden pro Enzym jeweils zwei homozygote Insertionslinien ausgewählt.

Nr.	Mutante (Abkürzung)	Funktion	Gen	SALK	Homozygote Linien
<i>sbh2-1</i>	<i>sbh2-1</i>	C4-Hydroxylase	At1g14290	SALK_047916C	Verifizierte Linie von CHEN <i>et al</i> (2008)
1	<i>ck1a</i>	Ceramid Kinase	At5g51290	SALK_017173	1-4; 1-6
2	<i>sbh2-2</i>	C4-Hydroxylase	At1g14290	SALK_032139	2-5C-1; 2-7C-2
4	<i>da1a</i>	4E-Desaturase	At4g04930	SALK_107761	4-7C; 4-7J
5	<i>sk3a</i>	S1P-Kinase	At2g46090	SALK_129175	5-2B; 5-2E
6	<i>sk1a</i>	S1P-Kinase	At4g21540	SALK_009027	6-1A; 6-2A
7	<i>sp1a</i>	S1P-Phosphatase	At3g58490	SALK_035202	7-2A; 7-6A
8	<i>sl1a</i>	S1P-Lyase	At1g27980	SALK_093662	8-6F; 8-6M
9/ <i>sbh1-1</i>	<i>sbh1-1</i>	C4-Hydroxylase	At1g69640	SALK_090881	9-4A; 9-5A; auch: verifizierte Linie von CHEN <i>et al</i> (2008).
10	<i>sk1b</i>	S1P-Kinase	At4g21540	SALK_000250	10-1; 10-5
11	<i>da2a</i>	8E/Z-Desaturase	At2g46210	SALK_013243	11-1B
13	<i>sp2a</i>	S1P-Phosphatase	At5g03080	SALK_055510	13-1A; 13-3A
14	<i>sk1c</i>	S1P-Kinase	At4g21540	SALK_022916	14-4A; 14-6A
16	<i>sk2b</i>	S1P-Kinase	At5g23450	SALK_152371	16-2B; 16-3A
17	<i>da3a</i>	8E/Z-Desaturase	At3g61580	SALK_131851	17-1A; 17-8E
19	<i>ca2a</i>	Ceramid- Glucosyltransferase	At2g19880	SALK_005521	19-5
20	<i>sl1b</i>	S1P-Lyase	At1g27980	SALK_093662c	20-1F; 20-2B
21	<i>sk2c</i>	S1P-Kinase	At5g23450	SALK_152371c	21-2; 21-3
22	<i>da2b</i>	8E/Z-Desaturase	At2g46210	SALK_013243c	22-1; 22-2
23	<i>sk1d</i>	S1P-Kinase	At4g21540	SALK_000250c	23-4; 23-6
24	<i>cs2a</i>	Ceramid-Synthase	At3g19260	SALK_018608c	24-1; 24-2
25	<i>sk3b</i>	S1P-Kinase	At2g46090	SALK_053022c	25-1; 25-2
27	<i>da3b</i>	8E/Z-Desaturase	At3g61580	SALK_046300	27-1; 27-2
28	<i>ch1a</i>	Ceramid- α - Hydroxylase	At2g34770	SALK_025578c	28-3; 28-5
31	<i>sl1c</i>	S1P-Lyase	At1g27980	SALK_078119	31-7
33	<i>cs1a</i>	Ceramid-Synthase	At1g13580	SALK_150849	33-1A; 33-1B

3.4. Untersuchungen an *A. thaliana* T-DNA Insertionsmutanten

Wie anhand der Interaktion von *A. thaliana* mit Pathogenen gezeigt werden konnte, sind Sphingolipide bei spezifischen Erkennungs- oder Abwehrreaktionen beteiligt (3.2). Die Gehalte dieser putativ bioaktiven Substanzen müssen für eine Signalwirkung *in vivo* streng reguliert werden. Um Biosynthese- bzw. Metabolismuswege der Sphingolipide näher betrachten zu

können, sollten die in 3.3 selektierten homozygoten Mutanten auf Sphingolipidmuster und Metabolismus hin untersucht werden.

Es konnten eine Reihe von T-DNA Mutanten selektiert werden, welche einen homozygoten Knock-out wichtiger SPL-Biosynthese- und Metabolismusenzymer aufweisen (vgl. 3.3, Tabelle 10). Im Rahmen dieser Arbeit war es jedoch nicht möglich, alle generierten Mutanten ausreichend auf ihr Verhalten bezüglich Pathogeninteraktionen zu überprüfen. In dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass nach Pathogeninfektion die Gehalte an freiem t18:0 in *A. thaliana* transient erhöht wurden. Die Verwendung von Hydroxylasemutanten, welche in Enzymen für den Metabolismus von freiem d18:0 zu freiem t18:0 defizient waren, hatte daher Vorrang.

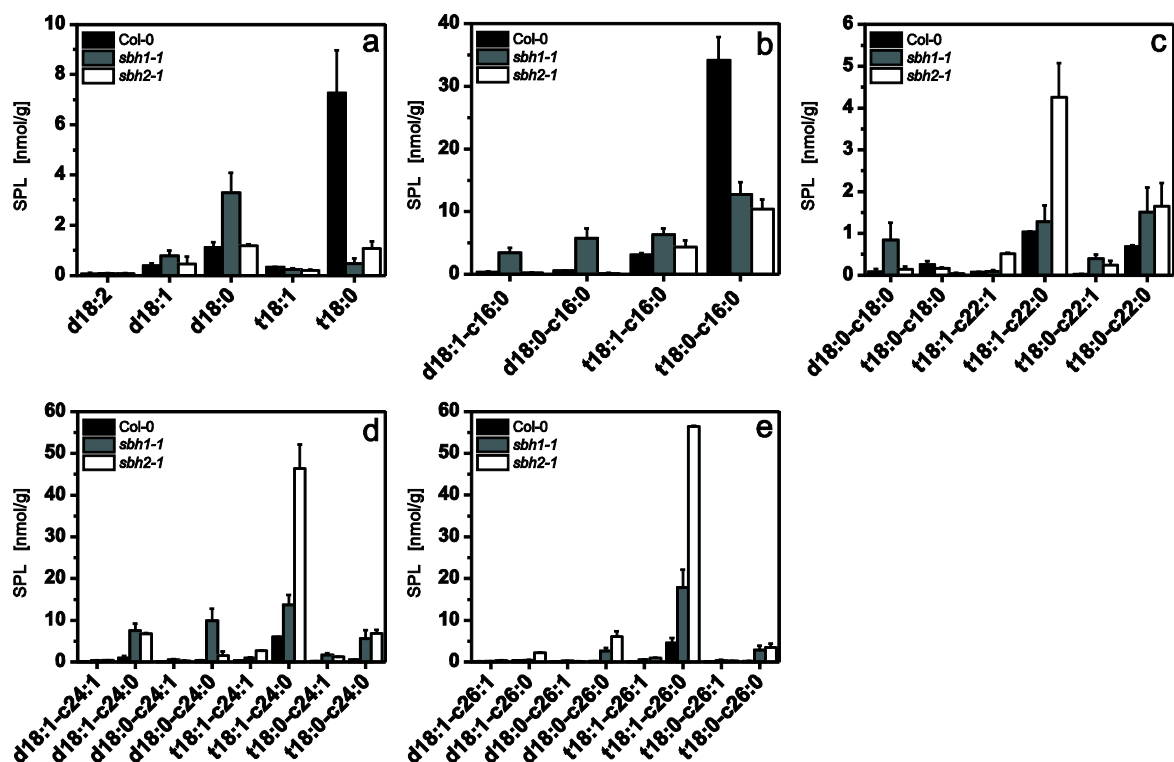


Abbildung 26: Basalniveau untersuchter Sphingolipide in *A. thaliana*. Vergleich von Col-0 sowie der Sphingobasen Hydroxylasemutanten *sbh1-1* und *sbh2-1*. Aufgetragen sind die jeweiligen Gehalte in nmol/g Trockengewicht für jeden Analyten. (a) Freie Sphingobasen. (b-e) Ceramide. SPL: Sphingolipide. Mittelwerte (n=3) mit Standardabweichung.

Abbildung 26 zeigt die basale Sphingolipidzusammensetzung der Hydroxylasemutanten *sbh1-1* und *sbh2-1* im Vergleich zu *A. thaliana* Wildtyp nach Extraktion und Messung der SPL mittels UPLC-MS/MS.

Im Vergleich zum Wildtyp wird deutlich sichtbar, dass es durch T-DNA-Knock-out von SBH1 bereits basal zu deutlich veränderten Sphingolipidgehalten kommt. So waren in der *sbh1-1* Mutante die basalen Gehalte der freien Sphingobase t18:0 stark reduziert (0,1-0,5 nmol/g gegenüber 7-9 nmol/g im Wildtyp), während hohe Gehalte an d18:0 (2,5-3,5 nmol/g gegenüber

0,9-1,5 nmol/g im Wildtyp) nachzuweisen waren (Abbildung 26 (a)). Auch waren mit 0,6-0,7 nmol/g die d18:1 Gehalte in der Mutante basal etwas höher als im Wildtyp (0,2-0,4 nmol/g). Die untersuchten Ceramidspiegel in der Mutante waren im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls unterschiedlich, wobei bei *sbh1-1* besonders die Gehalte der d18:x-Ceramide (v.a. d18:1-c16:0, d18:0-c16:0, d18:0-c18:0, d18:1-c24:0, d18:0-c24:0 und d18:0-c26:0) neben einigen t18:x-Ceramiden (t18:0-c16:0, t18:0-c22:0, t18:1-c24:0, t18:0-c24:0, t18:1-c26:0 und t18:0-c26:0) verändert waren (Abbildung 26 (b-e)).

Dies resultiert aus der fehlenden SBH1 Funktion und steht im Einklang mit bereits publizierten Daten (CHEN *et al.* 2008).

Der Knock-out von SBH2 hingegen führte im Vergleich zum Wildtyp basal zu kaum veränderten Gehalten an freien Sphingobasen. Lediglich der Gehalt an t18:0 war reduziert (Abbildung 26 (a)). Die Ceramide zeigten schwankende Werte, je nach Analyt zwischen den Gehalten von Wildtyp und *sbh1-1*. Die d18:x-Ceramide d18:1-c24:0, d18:1-c26:0 und d18:0-c26:0 wiesen im Vergleich zum Wildtyp basal erhöhte Werte auf (Abbildung 26 (b-e)).

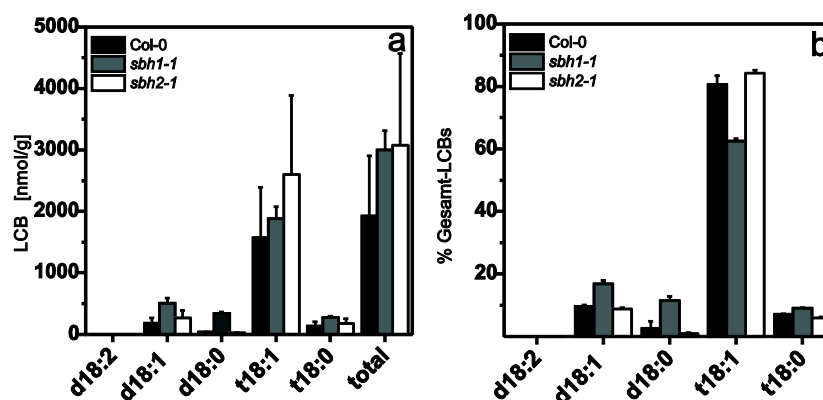


Abbildung 27: Sphingolipidzusammensetzung in *A. thaliana* nach Totalhydrolyse. Sphingobasen aus Ceramiden und komplexen Sphingolipiden von Wildtyp, *sbh1-1* oder *sbh2-1* wurden durch starke alkalische Hydrolyse freigesetzt und deren Gehalte nach OPA-Derivatisierung mittels HPLC-Fluoreszenzdetektion bestimmt. (a) Gesamtmenge. Aufgetragen sind die jeweiligen Gehalte in nmol/g Trockengewicht für jeden Analyten. Die Summe der jeweiligen LCB-Mengen der fünf Analyten ist als „total“ dargestellt. (b) Prozentualer Anteil der jeweiligen Sphingobasen am Gesamtgehalt. Mittelwerte (n=3) mit Standardabweichung.

Um zu überprüfen, ob sich nicht nur die untersuchten freien Sphingolipide in ihren Gehalten unterscheiden, sondern ob generell auch die Zusammensetzung der komplexen Sphingolipide verändert ist, sollten die Sphingobasenrückgrate der SPL untersucht werden.

Abbildung 27 zeigt die Zusammensetzung der Sphingolipide in Wildtyp, *sbh1-1* und *sbh2-1* nach Totalhydrolyse und OPA-Derivatisierung (siehe hierzu 2.3.5.7 und 2.3.5.8). Während *sbh2-1* ein dem Wildtyp sehr ähnliches Profil der Sphingobasenrückgrate aufwies, zeigte sich in *sbh1-1* ein

deutlich erhöhter Gehalt an d18:1 und d18:0 (Abbildung 27 (a)). Dies spiegelt sich auch in der relativen Zusammensetzung der Sphingolipide wider (Abbildung 27 (b)).

3.4.1. Analyse der Sphingolipidgehalte in den T-DNA Hydroxylasemutanten *sbh1-1* und *sbh2-1*

Wie in 3.2.1 bereits für den *A. thaliana* Wildtyp Col-0 beschrieben, wurden auch Rosettenblätter der Hydroxylasemutanten *sbh1-1* und *sbh2-1* mit *P. syringae* (avirulent und virulent) oder Puffer infiltriert und die Sphingolipidgehalte 0, 1, 2, 5, 10 und 24 h nach Infektion bestimmt (Abbildung 28; Abbildung 29; Abbildung 30).

Abbildung 28 (a) zeigt die erhaltenen Sphingolipidkinetiken nach Infiltration mit avirulenten *Pst*. Zwar erhöhten sich die Gehalte an t18:0 nach Behandlung wie beim Wildtyp (vgl. Abbildung 15) transient (2- 3fach 2 hpi; 24 hpi noch nicht Basalniveau), allerdings war ebenfalls ein starker transienter Anstieg der Sphingobase d18:0 zu verzeichnen. d18:0 (basal 3,3 nmol/g) zeigte 2 hpi ein Maximum (10,8 nmol/g), welches auch nach 24 h das Basalniveau nicht wieder erreicht hatte. Innerhalb der untersuchten Kinetik änderten sich auch die Ceramidspiegel (Abbildung 28 (b-e)), wobei sowohl die Gehalte einiger d18:x-Ceramide (d18:1-c16:0, d18:0-c16:0, d18:0-c24:0 und d18:0-c26:0) also auch einiger t18:x-Ceramide (t18:1-c16:0, t18:0-c16:0, t18:1-c22:0, t18:0-c22:0, t18:1-c24:0, t18:0-c24:0, t18:1-c26:0 und t18:0-c26:0) bereits 5 hpi stark erhöht waren.

Betrachtet man die Infiltration von *sbh1-1* mit virulenten *Pst* (Abbildung 28 (f-j)), so zeigten die freien Sphingobasen ein dem Wildtyp sehr ähnliches Muster (vgl. Abbildung 15 (f-j)). Die basal niedrigen Gehalte an t18:0 stiegen 2 hpi an und erreichten bereits 5 hpi wieder Basalniveau. Wie nach Infiltration mit avirulenten *Pst* (Abbildung 28 (a-e)), erhöhte sich aber v.a. der Gehalt an d18:0 stark 2 hpi. Bereits 5 hpi war wieder eine deutliche Reduktion des d18:0 Gehaltes messbar, welcher 24 hpi wieder auf Basalniveau abfiel. Die Gehalte der meisten Ceramide waren nach Behandlung mit virulenten *Pst* nicht stark verändert (Abbildung 28 (g-j)), wobei allerdings die Ceramide d18:1-c16:0, t18:1-c16:0 und t18:1-c22:0 einen ca. 1,5-2fachen transienten Anstieg 5-10 hpi aufwiesen. Kontrollbehandlung mit 10 mM MgSO₄-Puffer führte, wie beim Wildtyp (vgl. Abbildung 15), nur zu geringen Gehaltsveränderungen der untersuchten Sphingolipide, wobei für d18:0 dennoch ein transienter 1,5facher Anstieg 1-2 hpi detektierbar war. Abbildung 29 zeigt die Infiltration der Hydroxylasemutante *sbh2-1* mit avirulenten *Pst* (Abbildung 29 (a-e)), virulenten *Pst* (Abbildung 29 (f-j)) oder Puffer (Abbildung 29 (k-o)). Die untersuchten Kinetiken zeigten dabei einen ähnlichen Verlauf wie der Wildtyp (Abbildung 15). Während die Infiltration avirulenter *Pst* zu 1,5-5fachen transienten Anstiegen von t18:0, t18:0-c16:0, t18:1-c22:0, t18:0-c22:0, t18:1-c24:0, t18:0-c24:0, t18:1-c26:0 und t18:0-c26:0 führte,

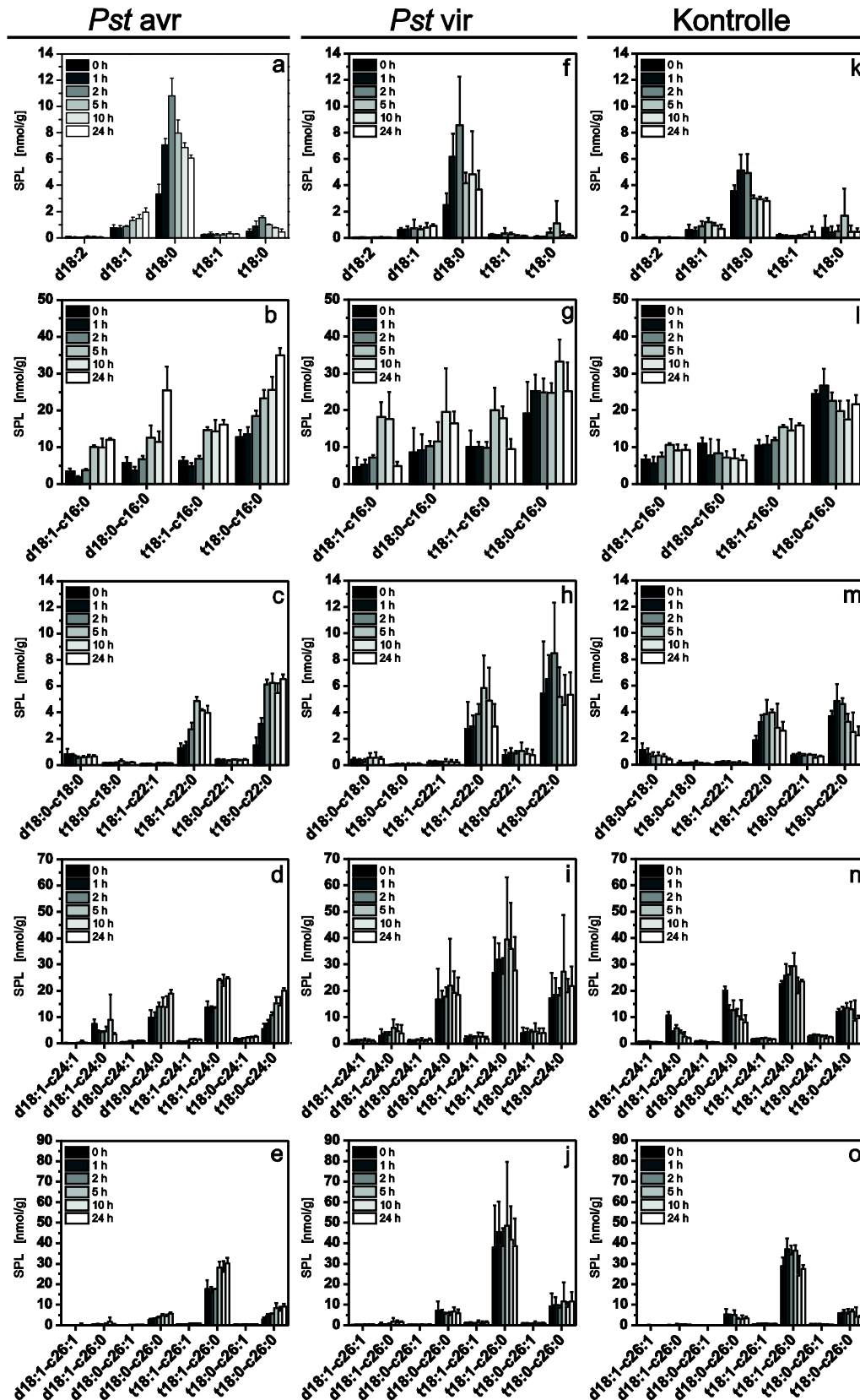


Abbildung 28: Infiltration der *A. thaliana* T-DNA-Mutante *sbh1-1* mit *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*). Die Pflanzen wurden mit avirulenten (*avrRpm1*) *Pst* (*Pst avr*, a-e), virulenten *Pst* (*Pst vir*, f-j) und mit Pufferlösung (Kontrolle, k-o) behandelt. Aufgetragen sind die jeweiligen Gehalte in nmol/g Trockengewicht für jeden Analyten. (a, f und k) Freie Sphingobasen. (b-e, g-j und l-o) Ceramide. Die angegebenen Zeiten entsprechen der Probenahme nach Infiltration. Mittelwerte (n=3) mit Standardabweichung.

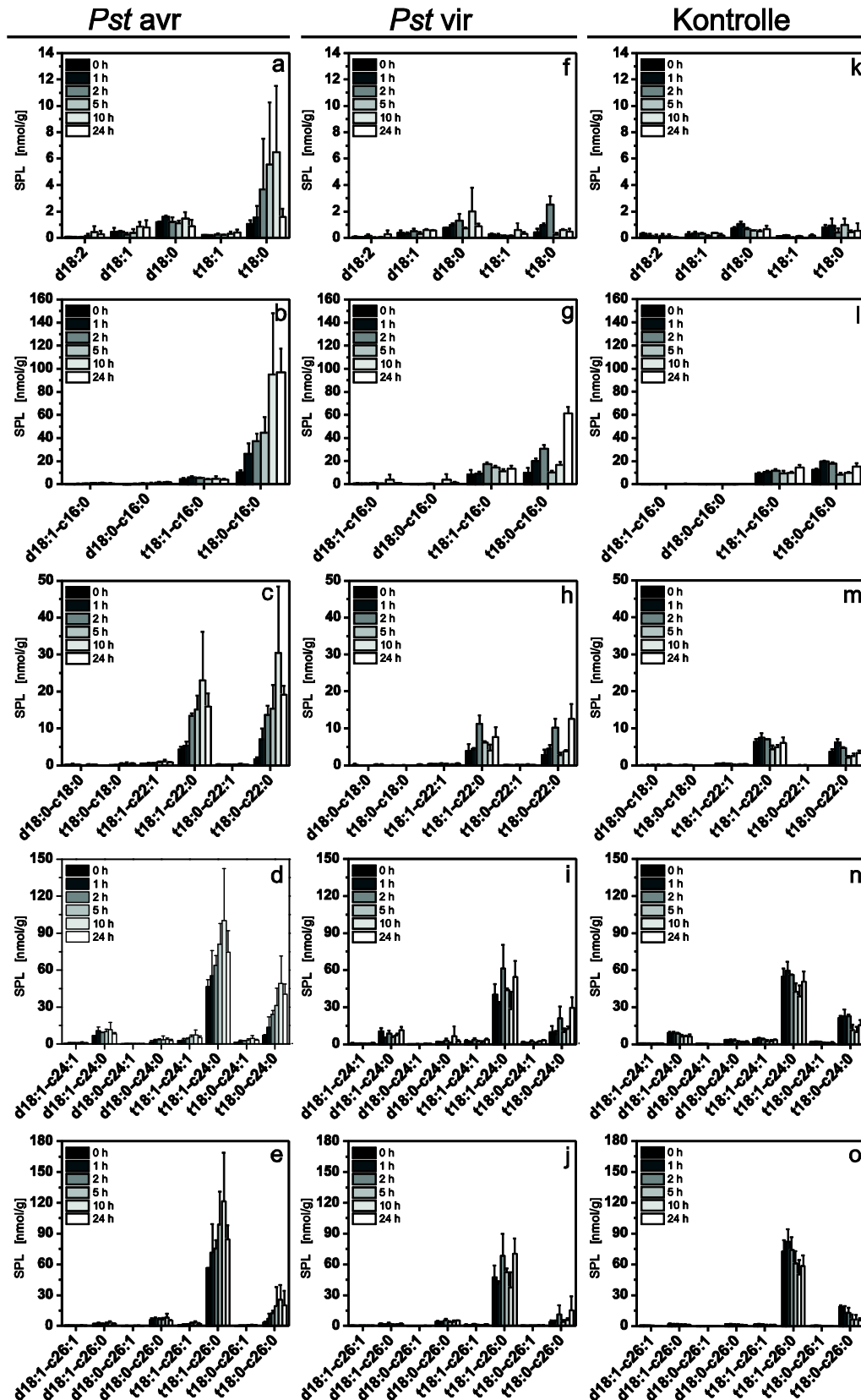


Abbildung 29: Infiltration der *A. thaliana* T-DNA-Mutante *sbh2-1* mit *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*). Die Pflanzen wurden mit avirulenten (*avrRpm1*) *Pst* (*Pst avr*, a-e), virulenten *Pst* (*Pst vir*, f-j) und mit Pufferlösung (Kontrolle, k-o) behandelt. Aufgetragen sind die jeweiligen Gehalte in nmol/g Trockengewicht für jeden Analyten. (a, f und k) Freie Sphingobasen. (b-e, g-j und l-o) Ceramide. Die angegebenen Zeiten entsprechen der Probenahme nach Infiltration. Mittelwerte (n=3) mit Standardabweichung.

kam es nach Infiltration virulenter *Pst* nur zu geringen Gehaltsveränderungen der untersuchten SPL. Lediglich t18:0 stieg 2 hpi 4,5fach an, erreichte aber bereits 5 hpi wieder Basalniveau. Pufferbehandlung ergab keine deutlichen Veränderungen der Sphingolipidgehalte.

In Abbildung 30 sind die d18:0 und t18:0 Kinetiken für *A. thaliana* Wildtyp und *sbh1-1* nach Pathogen- oder Pufferinfiltration zusammengefasst. Hierbei wird deutlich, dass die d18:0-Kinetik in der Mutante der t18:0-Kinetik im Wildtyp ähnelt.

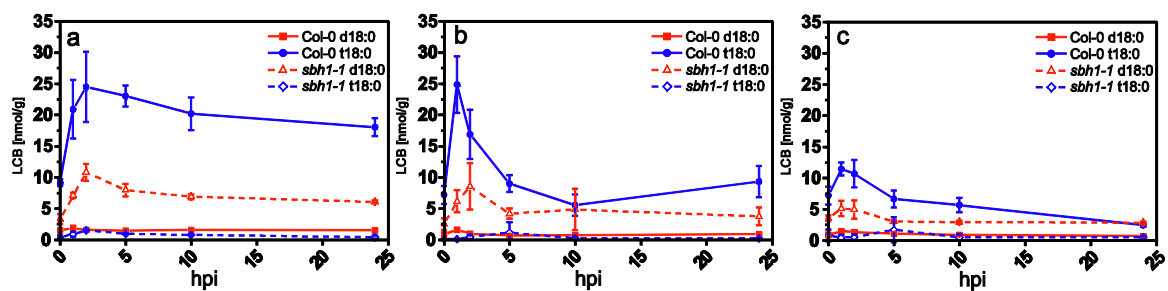


Abbildung 30: Zeitliche Veränderung der Sphingobasenspiegel in *A. thaliana* Blättern nach Infiltration. Vergleich von Col-0 (durchgezogene Linie) und der Hydroxylasemutante *sbh1-1* (gestrichelte Linie). Gezeigt ist die zeitabhängige Änderung der Gehalte an freiem d18:0 (rot) und freiem t18:0 (blau) nach Infiltration mit avirulenten *Pst* (a), virulenten *Pst* (b) oder nach Kontrollbehandlung mit 10 mM MgSO₄ (c). Aufgetragen ist der LCB-Gehalt in nmol/g Trockengewicht für jeden Messzeitpunkt nach Behandlung. hpi: hours post incubation – Stunden nach der Behandlung. Mittelwerte (n=3) mit Standardabweichung. Aus (PEER *et al.* 2010).

3.4.2. Analyse der SPL-Gesamtgehalte in *A. thaliana* nach Totalhydrolyse

Wie in 3.4.1 gezeigt wurde, führt der Knock-out von SBH1, nicht aber von SBH2, zu veränderten d18:0-Kinetiken nach *Pst*-Infiltration in *A. thaliana*. Dabei ähnelt die Kinetik von d18:0 in *sbh1-1* der t18:0-Kinetik im Wildtyp. Wie in Abbildung 3 dargestellt, kann t18:0 durch *de novo* Synthese aus d18:0 oder durch Freisetzung aus Ceramiden und komplexen SPL gebildet werden.

Um zu überprüfen, ob die unterschiedlichen Kinetiken der untersuchten freien Sphingobasen und Ceramide bei Wildtyp und Mutante auf veränderte *de novo* Synthese oder unterschiedliche Gehalte an komplexen Sphingolipiden zurückzuführen sind, wurden Totalhydrolysen des Probenmaterials nach Infiltration durchgeführt. Damit konnte der Gesamtpool der Sphingobasen, einschließlich der in komplexen Sphingolipiden und Ceramiden enthaltenen, untersucht werden.

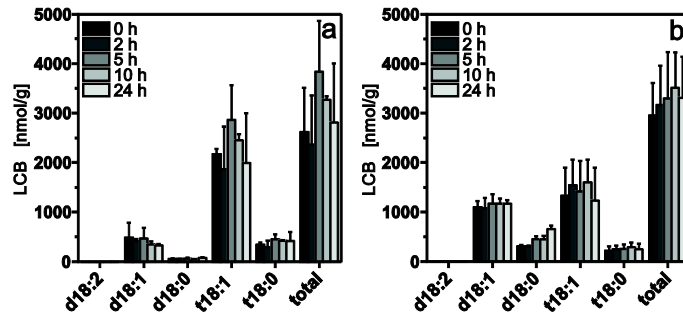


Abbildung 31: Kinetischer Verlauf der Sphingolipidzusammensetzung in *A. thaliana* nach Infiltration. Blätter von Wildtyp (a) oder *sbh1-1* (b) Pflanzen wurden mit avirulenten *P. syringae* infiltriert. Sphingobasen aus Ceramiden und komplexen Sphingolipiden wurden durch starke alkalische Hydrolyse freigesetzt und deren Gehalte nach OPA-Derivatisierung mittels HPLC-Fluoreszenzdetektion bestimmt. Aufgetragen sind die jeweiligen Gehalte in nmol/g Trockengewicht für jeden Analyten. Die Summe der jeweiligen LCB-Mengen der fünf Analyten ist als „total“ dargestellt. Mittelwerte (n=3) mit Standardabweichung. Aus (PEER *et al.* 2010).

Abbildung 31 zeigt das Ergebnis der Totalhydrolyse mit anschließender OPA-Derivatisierung und Fluoreszenzdetektion der freigesetzten Sphingobasen (siehe 2.3.5.8). Wie deutlich zu erkennen ist, ändert sich der Gesamtpool an Sphingobasen der Blattproben nicht relevant. Jedoch sind aufgrund der großen Gesamtmengen von z.T. >3000 nmol/g geringe Veränderungen, wie sie für Signalmoleküle typisch sind, mit der verwendeten Methodik nicht detektierbar. Anhand Abbildung 31 zeigt sich, dass die Mutante *sbh1-1* im Vergleich zum Wildtyp zwar höhere d18:1 und d18:0 Gehalte aufweist, dass aber die Gesamtgehalte an t18:1 und besonders t18:0 praktisch nicht durch den Knock-out von SBH1 beeinflusst werden. Die Gehalte komplexer SPL sind also in der Mutante *sbh1-1* dem Wildtyp sehr ähnlich. Wenn aus diesen t18:0 freigesetzt würde, wäre kein Unterschied in den freien Basen detektierbar. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die *de novo* Synthese von t18:0 nach Pathogeninfektion.

3.5. Sphingolipide als Signalmoleküle

In den Abschnitten 3.2 und 3.4 wurde gezeigt, dass sich die Interaktion von Pathogenen und *A. thaliana* auf die Gehalte der Sphingolipide auswirkt. Besonders freie Sphingobasen, v.a. t18:0, sind betroffen. Die Sphingolipidkinetiken verhalten sich dabei nach virulenter oder avirulenter Infektion unterschiedlich. Wie die Ergebnisse zeigen, wird t18:0 *de novo* vermutlich aus d18:0 durch Hydroxylierung gebildet. Der Metabolismus wird streng reguliert und ist bereits in einer sehr frühen Phase der Infektion (1-2 hpi) aktiv.

In tierischen Zellen konnte gezeigt werden, dass Sphingolipide auch an Zelltodprozessen beteiligt sind (siehe Einleitung). Auch in Pflanzen gibt es einige Hinweise auf Signalfunktionen der Sphingolipide bei Zelltodprozessen.

Im Folgenden wurde untersucht, welche funktionelle Rolle Sphingolipide in der in dieser Arbeit untersuchten Pflanzen-Pathogen Interaktion spielen.

3.5.1. SPL, ROS und HR

Pathogene können programmierten Zelltod („programmed cell death“; PCD) in Pflanzen auslösen. Auch das Toxin Fumonisin B1 und Mutationen in Enzymen des SPL-Stoffwechsels verursachen in Pflanzenzellen Zelltod, welcher dem Pathogen-vermittelten Zelltod sehr ähnlich ist (siehe Einleitung).

Die HR (Hypersensitive Response) ist eine besondere Form des Zelltodes in Pflanzen, welche meist mit der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“; ROS) einhergeht. Ob und in welcher Form Sphingobasen daran beteiligt sind, sollte in dieser Arbeit untersucht werden.

3.5.1.1. Nachweis von ROS mittels DAB-Färbung

Mittels der in 2.3.3.1 dargestellten Färbemethode sollte eine mögliche ROS-Produktion (hier speziell H_2O_2) in Blättern, hervorgerufen durch SPL, nachgewiesen werden.

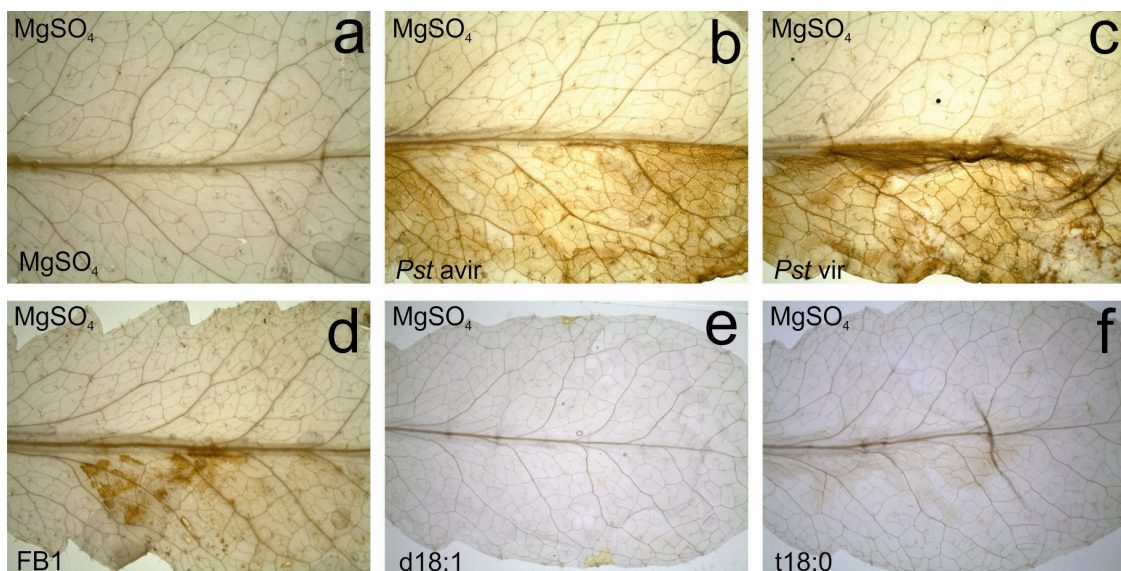


Abbildung 32: *A. thaliana* Blätter nach Infiltration und DAB (3,3'-Diaminobenzidin)-Färbung. Je eine Blatthälfte wurde wie angegeben behandelt (zweite Blatthälfte zur Kontrolle jeweils mit 10 mM $MgSO_4$ infiltriert) und 48 hpi mittels DAB auf H_2O_2 -Akkumulation getestet. (a) Kontrollbehandlung mit 10 mM $MgSO_4$. (b) Infiltration von *Pst avir* (OD=0,02) (c) Infiltration von *Pst vir* (OD=0,02). (d) Infiltration von Fumonisin B1 (100 μM). (e) Infiltration mit d18:1 (500 nM). (f) Infiltration mit t18:0 (500 nM).

Abbildung 32 zeigt DAB-gefärbte Blätter je 48 h nach Behandlung. Wie anhand Abbildung 32 (b-d) gut zu erkennen ist, akkumulierte H_2O_2 nach Infiltration mit virulenten und avirulenten *P*.

syringae, aber auch nach Infiltration mit 100 μM FB1. Infiltration der Sphingobasen d18:1 und t18:0 (je 500 nM) führte zu keiner sichtbaren H_2O_2 Produktion 48 hpi (Abbildung 32 (e und f)). Auch höhere LCB Konzentrationen (bis 10 μM) führten nicht zu messbaren H_2O_2 Konzentrationen in den Blättern (Daten nicht gezeigt).

3.5.1.2. Nachweis von Zelltod mittels PAM

Eine nichtinvasive Methode, Zelltod in Pflanzen nachzuweisen, stellt die PAM-Messung nach 2.3.3.3 dar. Dabei wird die Aktivität intakter Photosysteme gemessen, angegeben als effektive Quantenausbeute $Y(\text{II})$.

Während die Infiltration von jeweils 20 μM d18:1, d18:0, t18:0 und t18:0-P ebenso wenig wie 1 μM flg22 die PSII-Aktivität nach bis zu 96 hpi beeinflusste (Daten nicht gezeigt), war nach Pathogeninfiltration (Abbildung 33 (a und b)) deutlich eine zeitabhängige Reduzierung von $Y(\text{II})$ nachzuweisen. Auch höhere SPL-Konzentrationen (250 μM) führten zu keiner spezifischen Abnahme der PSII-Aktivität gemessen als $Y(\text{II})$ (Daten nicht gezeigt).

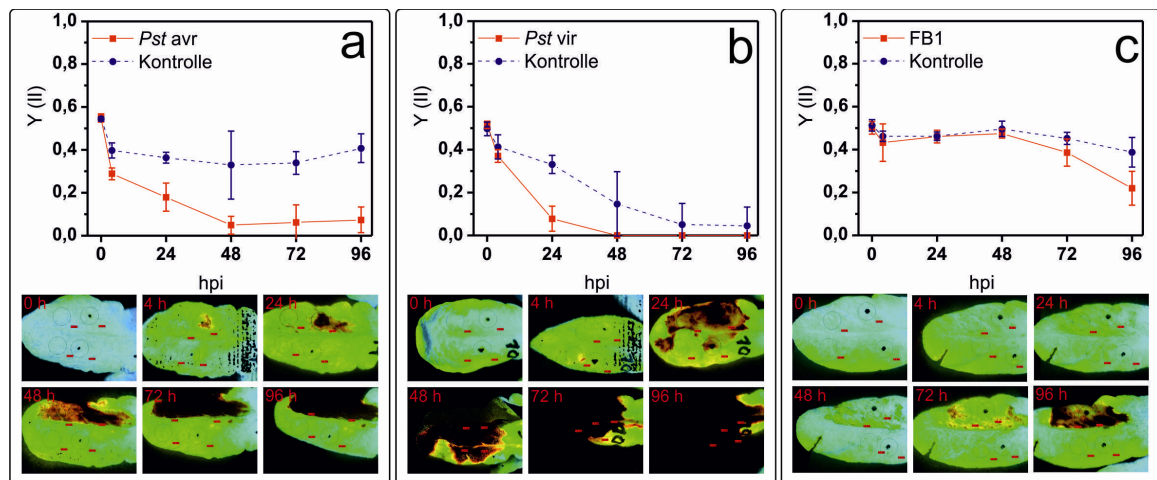


Abbildung 33: Quantitative PAM Messungen an *A. thaliana* nach Infiltration. Die obere Blatthälfte von intakten Rosettenblättern wurde mit FB1 oder Pathogenen infiltriert, die untere Blatthälfte wurde jeweils mit MgSO_4 -Puffer (10 mM; Ctrl) behandelt. Nach 0, 4, 24, 48, 72 und 96 h wurde nichtinvasiv mittels PAM auf Photosystem II-Integrität hin überprüft. (a) avirulente *Pst*, OD=0,2. (b) virulente *Pst*, OD=0,2. (c) FB1 10 μM . Mittelwerte der PAM-Messung (n=4) mit Standardabweichung. (a-c) Detailfotos: gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Blatt zu den angegebenen Messzeitpunkten. $Y(\text{II})$: Yield – Ausbeute (PSII). hpi: hours post incubation – Stunden nach der Behandlung

Dabei wird deutlich, dass sich avirulente *Pst* nach Infiltration nicht ungehindert in *A. thaliana* Blättern ausbreiten können und in ihrem Wachstum beschränkt werden, während virulente *Pst* innerhalb von 96 h das ganze Blatt befallen. Die Applikation von 10 μM FB1 führt ebenfalls zu einer Abnahme von $Y(\text{II})$ innerhalb von 96 h in der infiltrierten Blatthälfte (Abbildung 33 (i)). Die

Methode erwies sich als ungeeignet, sphingolipidabhängige Zelltodprozesse darstellen und quantifizieren zu können.

3.5.1.3. Nachweis von ROS mittels Lumineszenzdetektion

Die Lumineszenzdetektion erfolgte nach 2.3.3.2. Diese sehr sensitive Methode hat sich bereits für die Analyse der pathogen- oder sphingolipidabhängigen H_2O_2 -Produktion als geeignet erwiesen (BACH 2010). Die ROS-induzierende Wirkung war dabei auf Pathogene, einige freie Sphingobasen sowie FB1 beschränkt, während LCB-Ps, Ceramide, Ceramid-Ps und GlcCer keine vermehrte H_2O_2 -Produktion in den Blattscheiben auslösten. Dabei ist das Ausmaß der H_2O_2 -Produktion z.T. konzentrationsabhängig, wobei ab $50 \mu M$ eine detektierbare Lumineszenz der aktiven LCBs und FB1 nachgewiesen werden konnte, wobei es für d18:1 erst bei $100 \mu M$ zu starken Effekten kam. Alle folgenden Versuche wurden daher mit je $100 \mu M$ SPL durchgeführt. Abbildung 34 zeigt zusammenfassend einige repräsentative Daten aus (BACH 2010). Flagellin (flg22; $50 \mu M$) diente als Positivkontrolle, um die allgemeine Funktionalität des Luminolsystems zur ROS-Detektion zu überprüfen (CHAKRAVARTHY *et al.* 2010). Wie in Abbildung 34 (a) zu erkennen, führt die Inkubation von Blattscheiben mit den freien Basen d17:1, d18:1, d18:0 und t18:0 (je $100 \mu M$) zu einem deutlichen Lumineszenzanstieg bereits nach 30-150 min, wobei besonders bei d18:1 auch ein transients Anstieg der emittierten Photonen bereits nach ca. 30 min zu detektieren war.

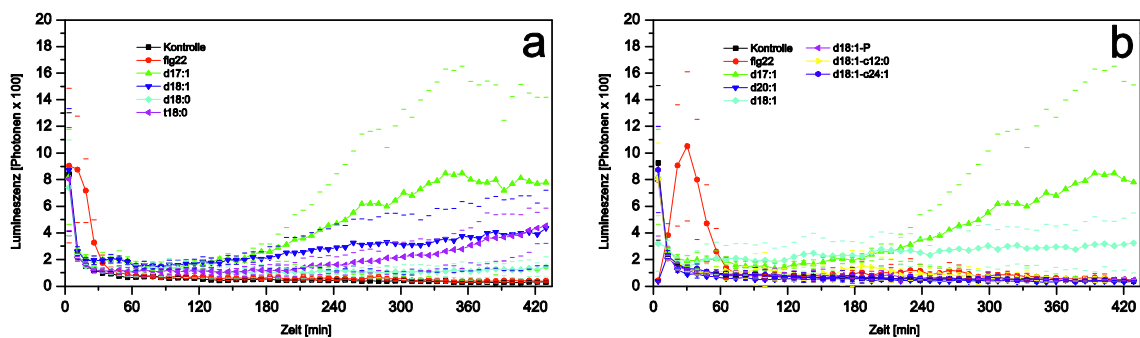


Abbildung 34: Zeitliche Entwicklung der H_2O_2 -Produktion in *A. thaliana* nach Sphingolipidinkubation. Blattscheiben (\varnothing 5 mm) wurden mit Elicitoren behandelt und die resultierende endogene H_2O_2 -Produktion durch dessen chemische Reaktion (Freisetzung von Photonen) mit einer Peroxidase und Luminol photometrisch analysiert. (a) Kinetik der H_2O_2 -Produktion verschiedener LCBs (d17:1, d18:1, d18:0 und t18:0, je $100 \mu M$), Kontrolle und flg22 ($50 \mu M$). (b) Kinetik der H_2O_2 -Produktion freier LCBs (d17:1, d20:1 und d18:1; je $100 \mu M$), d18:1-P ($100 \mu M$), Ceramide (d18:1-c12:0 und d18:1-c24:1; je $100 \mu M$), Kontrolle oder flg22 ($50 \mu M$). flg22 diente als Positivkontrolle. Als Negativkontrolle (Kontrolle) wurde eine Inkubationslösung ohne Elicitor/Effektor angesetzt. Pro Messzeitpunkt (in Minuten nach Inkubationsbeginn) sind die Mittelwerte ($n=8$) der detektierten Lumineszenz in Photonen/s mit Standardabweichung angegeben.

Flg22 führte stets zu einem transienten Anstieg der emittierten Photonen 1-60 min nach Elicitorgabe, was im Einklang mit publizierten Daten steht (SOHN *et al.* 2009). d17:1 löste jeweils die höchste H₂O₂-Produktion in *A. thaliana* Blattscheiben aus (ca. vierfach 7 h nach LCB-Zugabe), während d18:1 und t18:0 relativ gesehen eine geringere Aktivität aufwiesen (ca. zweifach 7 h nach LCB Zugabe). d18:0 zeigte eine nur geringe Aktivität. Behandlung mit Fumonisin B1 führte ebenfalls zu einer verstärkten H₂O₂-Produktion, die aber erst spät (ca. 2-3 h nach Behandlung) zu detektieren war und relativ gering (zweifach 11,5 h nach Behandlung mit 100 µM) ausfiel (Daten nicht gezeigt).

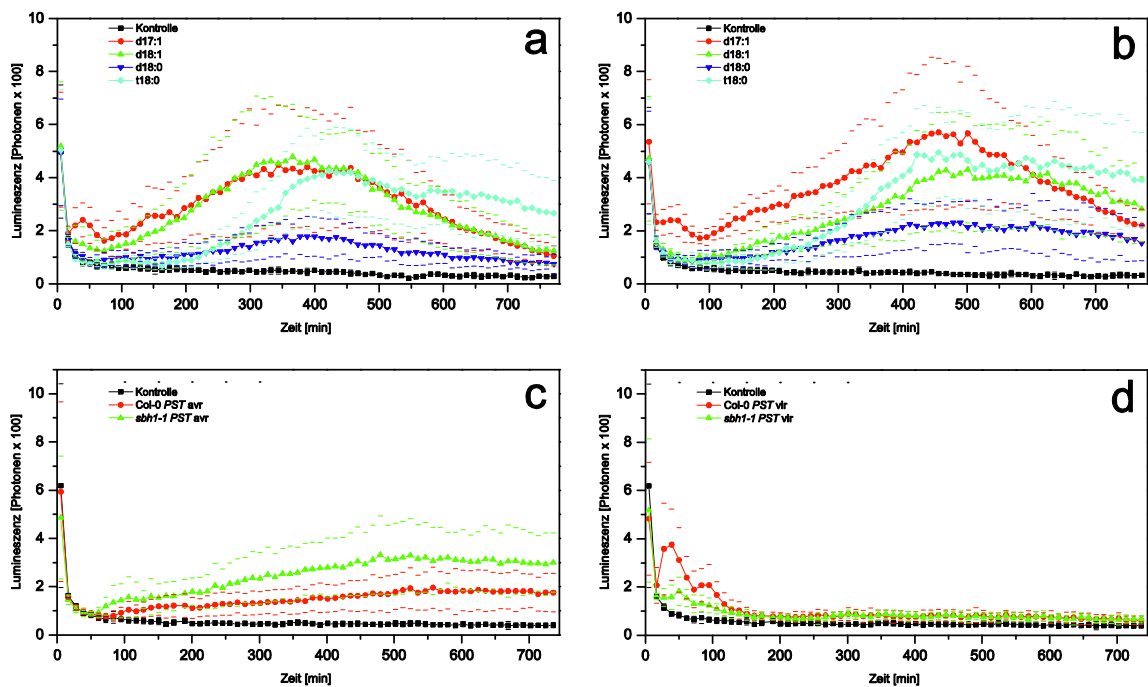


Abbildung 35 Zeitliche Entwicklung der H₂O₂-Produktion nach Sphingolipidinkubation oder Pathogenstress in *A. thaliana* Col-0 oder der Hydroxylasemutante *sbh1-1* in den ersten 11,5 h nach Behandlung. Blattscheiben (Ø 5 mm) wurden mit Elicitoren (a und B) oder Pathogenen (c und d) behandelt und die resultierende endogene H₂O₂-Produktion durch dessen chemische Reaktion (Freisetzung von Photonen) mit einer Peroxidase und Luminol luminometrisch analysiert. (a) H₂O₂-Produktion freier LCBs (d17:1, d18:1, d18:0 und t18:0, je 100 µM) in Col-0. (b) H₂O₂-Produktion freier LCBs (d17:1, d18:1, d18:0 und t18:0, je 100 µM) in *sbh1-1*. (c) H₂O₂-Produktion nach Behandlung mit avirulenten *P. syringae* (*Pst avr*; OD=0,04) in Col-0 (rot) oder *sbh1-1* (grün). (d) H₂O₂-Produktion nach Behandlung mit virulenten *P. syringae* (*Pst vir*; OD=0,04) in Col-0 (rot) oder *sbh1-1* (grün). Als Negativkontrolle (Kontrolle) wurde eine Inkubationslösung ohne Elicitor angesetzt. Zur besseren Übersicht ist die Positivkontrolle (flg22; 50 µM) nicht eingezeichnet. Pro Messzeitpunkt (in Minuten nach Inkubationsbeginn) sind die Mittelwerte (n=8) der detektierten Lumineszenz in Photonen/s mit Standardabweichung angegeben.

Abbildung 34 (b) zeigt repräsentativ weitere Ergebnisse aus (BACH 2010), etwa den Einfluss langkettiger LCBs, SPL-Ps und Ceramide auf die H₂O₂-Produktion in *A. thaliana* Blattscheiben. Im Gegensatz zu den LCBs d17:1, d18:1, t18:0 und auch d18:0 (siehe auch Abbildung 34 (a)) führen

sowohl die langkettige LCB d20:1 (auch: d20:0; nicht gezeigt), SPL-Ps (etwa d18:1-P; auch: d17:1-P, d18:0-P, t18:0-P, d20:1-P und d20:0-P; Ceramid-Ps; nicht gezeigt), Ceramide (d18:1-c12:0, d18:1-c24:1; auch: t18:0-c8:0, d18:0-c10:0, d18:0-c18:0, t18:0-c18:0, d18:0-c24:0, d18:0-c24:1, d18:1-c24:0 und d18:1-c24:1; nicht gezeigt) und komplexe SPL (d18:1-c12:0-Glc; nicht gezeigt) zu keiner mit dieser Methodik nachweisbaren H₂O₂-Produktion.

Um die Bedeutung der offenbar exklusiven H₂O₂-Elicitoraktivität der Sphingobasen d17:1, d18:1, d18:0 und t18:0 näher zu untersuchen, wurde der ROS-Nachweis mittels Lumineszenzmethode parallel zu Col-0 auch bei der Hydroxylasemutante *sbh1-1* durchgeführt (Abbildung 35).

Wie bei Col-0 sind auch in *sbh1-1* die langkettigen LCBs d20:0 und d20:1, die Phosphate der SPL, Ceramide und weitere getestete komplexe SPL nicht in der Lage, die H₂O₂-Produktion in *A. thaliana* Blattscheiben auszulösen (Daten nicht gezeigt; siehe auch (BACH 2010)). Aus Abbildung 35 (a und b) wird deutlich, dass, im Vergleich zum Wildtyp, durch je 100 µM d17:1, d18:0 und besonders t18:0 in der Mutante *sbh1-1* eine starke Lumineszenz induziert wird, während d18:1 eine etwas geringere H₂O₂-Produktion auslöst. Die erhöhte Lumineszenz nach t18:0 Inkubation und die grundsätzlich höhere Sensitivität der Mutante im Vergleich zum Wildtyp hat sich auch in mehreren Wiederholungen bestätigt (Daten nicht gezeigt). Die hohe d18:1-abhängige H₂O₂-Produktion in Col-0 ist allerdings untypisch und sollte unterhalb der d17:1 abhängigen liegen, wie weitere Versuche ergeben haben (vgl. auch Abbildung 34 (a)). Im Rahmen dieser Arbeit konnten aber keine weiteren Parallelmessungen mehr zwischen Wildtyp und Mutante durchgeführt werden.

Der Lumineszenzanstieg ist in den Blattscheiben bei Col-0 und *sbh1-1* transient (kein Substratmangeleffekt; Daten nicht gezeigt) und zeigt mit 6-9 h in der Mutante ein verschobenes Maximum gegenüber dem Wildtyp (5-8 h).

Eine geringere ROS (H₂O₂)-Produktion des Wildtyps zeigt sich auch nach Pathogenbehandlung (*Pst*; OD=0,04; Abbildung 35 (c und d)). Während avirulente *Pst* zu einer konstanten Akkumulation von H₂O₂ sowohl in *sbh1-1* (dreifach) als auch in Col-0 (zweifach) auslösen (Abbildung 35 (c)), führt die Inkubation mit virulenten *Pst* weder bei *sbh1-1* noch bei Col-0 zu einer anhaltenden und detektierbaren ROS-Produktion innerhalb von 11,5 h. Lediglich in den ersten 10-120 Minuten nach Behandlung kommt es zu einem starken ROS-Burst, der allerdings in Col-0 (vierfach) stärker ausfällt als bei Blattscheiben der Mutante *sbh1-1*.

3.5.1.4. Nachweis von Zelltod mittels Leitfähigkeitsmessung

Dass spezifische Sphingolipide die Bildung von ROS in *A. thaliana* Blättern auslösen, konnte bereits in 3.5.1.3 gezeigt werden. ROS sind an Zelltodprozessen beteiligt. Der direkte Einfluss exogen applizierter SPL auf Zelltodprozesse konnte in 3.5.1.2, dort bezogen auf die

Membranintegrität in Chloroplasten, nichtinvasiv jedoch nicht direkt nachgewiesen werden. Zelltod sollte daher auch mittels Leitfähigkeitsmessung an isolierten Blattscheiben untersucht werden (2.3.3.4). Blattscheiben von Col-0 und der T-DNA-Mutante *sbh1-1* wurden in je 2 ml Elicitorlösung inkubiert (10 mM MgSO₄; je 100 µM t18:0 bzw. d18:0; 2% DMSO), die Leitfähigkeit 0, 2, 4 und 20 h nach Inkubationsbeginn gemessen und anschließend die maximale Leitfähigkeit bestimmt. Daraus lässt sich ein zeitabhängiges relatives Leitfähigkeitsprofil erstellen (Abbildung 36). Als Kontrolle diente Puffer ohne SPL.

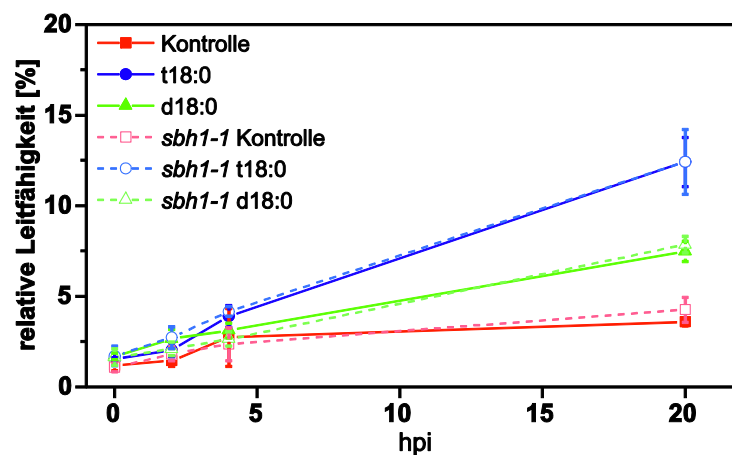


Abbildung 36: Leitfähigkeitsmessung des Inkubationsmediums isolierter *A. thaliana* Blattscheiben. Pro Behandlung wurden je 20 Blattscheiben von Col-0 (durchgezogene Linie) oder *sbh1-1* (gestrichelte Linie) in 2 ml Puffer (10 mM MgSO₄; 2% DMSO) inkubiert, je mit 100 µM t18:0, d18:0 oder ohne LCB (Kontrolle). Die Leitfähigkeit des Mediums wurde nach 0, 2, 4 und 20 h gemessen. Anschließend wurde die maximale Leitfähigkeit jedes Ansatzes durch Hitzeinkubation (2 h; 120 °C) bestimmt und die relative Leitfähigkeit in % der maximalen Leitfähigkeit errechnet. Mittelwerte (n=4) mit Standardabweichung. hpi: hours post incubation – Stunden nach der Behandlung.

Wie bereits gezeigt werden konnte, lösen je 100 µM d17:1 und t18:0, nicht aber d20:1, Zelltodreaktionen in Blattscheiben aus (BACH 2010). Dies steht ebenfalls in Einklang mit den Ergebnissen aus 3.5.1.3. Wie außerdem anhand Abbildung 36 zu erkennen ist, war der zelltodauslösende Effekt von t18:0 in Col-0 mit 12,4% der maximalen Leitfähigkeit 20 hpi etwa doppelt so stark wie der von d18:0 (7,5 %; 20 hpi). Die Mutante *sbh1-1* unterschied sich dabei allerdings nicht deutlich vom Wildtyp.

3.5.2. Einfluss von Sphingolipiden auf das Bakterienwachstum und Suszeptibilitätsuntersuchungen in *A. thaliana*

In 3.5.1 konnte gezeigt werden, dass spezifische LCBs, darunter auch t18:0, Zelltod in Blättern der Pflanze *A. thaliana* auslösen. Dieser ähnelt PCD-Prozessen, wie sie auch von *P. syringae* verursacht werden. In den Mutanten *sbh1-1* und *sbh2-1* fehlt jeweils eine der zwei endogenen

LCB-Hydroxylasen, wodurch die t18:0-Biosynthese gestört wird und sich somit die Verhältnisse der einzelnen SPL untereinander unterscheiden (siehe Abbildung 26).

Der direkte Einfluss von Sphingolipiden auf das Bakterienwachstum wurde wie unter 2.3.4.1 beschrieben überprüft. Unter den Versuchsbedingungen konnte jedoch kein direkter Einfluss von Sphingolipiden auf die Wachstumsrate bzw. den Zelltod der Bakterien nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Ob dies an den Versuchsbedingungen oder tatsächlich an einer fehlenden Suszeptibilität der Bakterien für die untersuchten freien Sphingobasen lag, konnte innerhalb dieser Arbeit nicht geklärt werden. Eventuell waren die verwendeten SPL-Konzentrationen zu gering, so dass eine Aufnahme durch die Bakterien oder eine wirksame inhibierende oder letale Konzentration am jeweiligen Wirkort nicht erreicht wurde.

Ferner sollte überprüft werden, ob die freie Base t18:0 durch eine putative Signalfunktion einen direkten Einfluss auf die Abwehrreaktion während der ETI gegen *Pst* in *A. thaliana* aufweist. Dazu wurde ein Suszeptibilitätsversuch, wie unter 2.3.4.2 beschrieben, durchgeführt. Abbildung 37 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung.

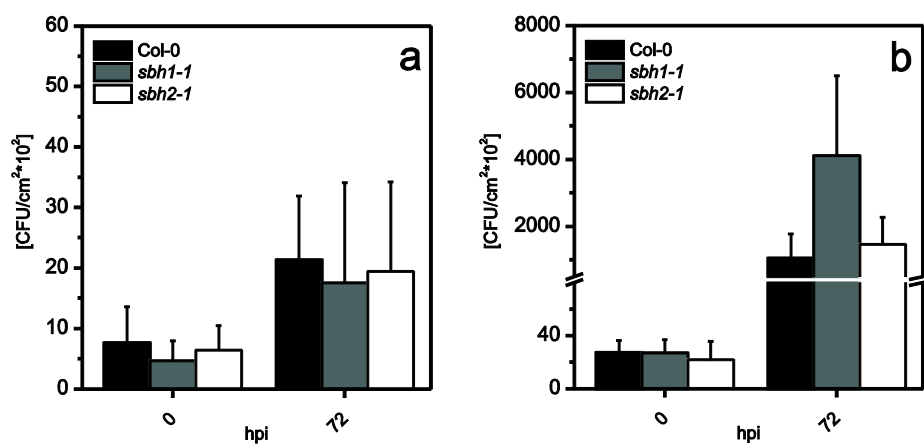


Abbildung 37: Suszeptibilitätsuntersuchungen an *A. thaliana*. Blätter von *A. thaliana* Col-0, *sbh1-1* und *sbh2-1* wurden (a) mit avirulenten *PST*, (b) mit virulenten *PST* infiltriert und das Bakterienwachstum innerhalb von 72 h bestimmt. Blattscheiben infiltrierter Blätter wurden nach 0 und 72 hpi ausgestanzt, homogenisiert und Verdünnungsreihen der Homogenisate auf KB-Medium ausplattiert. Bakterienkolonien wurden 2-3 d danach ausgezählt. Angabe der gewachsenen Bakterienkolonien (CFU; colony forming units) pro cm² Blattfläche. hpi: hours post inoculation – Stunden nach der Behandlung.

In sehr niedrigen Konzentrationen weisen avirulente *P. syringae* sowohl im Wildtyp als auch in beiden Hydroxylasemutanten ein sehr eingeschränktes Wachstum auf (Abbildung 37 (a)). Innerhalb von 72 h verdoppelt sich ihre Zahl lediglich und es kommt zu PCD als Abwehrreaktion. Phänotypisch ist kein Effekt (welche Blätter etc.) zu erkennen. Virulente *P. syringae* hingegen können sich in *A. thaliana* Wildtyp und Mutanten ausbreiten und weisen 72 hpi deutliche Infektionsmerkmale auf. Wie in Abbildung 37 (b) zu sehen ist, erfolgt die Infektion in *sbh2-1*

analog zu Col-0. Allerdings vermehren sich *Pst* vir in der Mutante *sbh1-1* etwa doppelt so stark innerhalb von 72 h. In dieser Mutante ist die Abwehrreaktion gestört, was zu einer tendenziell erhöhten Suszeptibilität gegenüber *Pst* vir führte. Aufgrund von diversen Schwierigkeiten bei der Pflanzenkultivierung konnte dieser Versuch allerdings nicht eindeutig bestätigt werden. Weitere Untersuchungen sind daher nötig, um den Einfluss von t18:0 auf die Suszeptibilität von *A. thaliana* gegenüber Pathogenen zu klären.

3.5.3. Genexpressionsanalysen

Wie unter 2.2.8 beschrieben, wurden zur quantitativen Messung exprimierter mRNA qRT-PCR-Analysen durchgeführt. Die Etablierung und Qualifizierung spezifischer Standards erfolgte ebenfalls wie in 2.2.8 dargestellt. Wildtyppflanzen und die in Tabelle 10 aufgeführten *A. thaliana*-Mutanten sollten, nach Behandlung mit verschiedenen Stressestimuli, auf veränderte Genexpressionsmuster hin überprüft werden. Dazu wurde die Expression spezifischer SPL-relevanter Gene sowie typischer Zelltodmarkergene untersucht (Tabelle 2). Zwar konnten im Rahmen dieser Arbeit Standards für die in Tabelle 2 aufgeführten Gene angefertigt werden, aufgrund des beschränkten zeitlichen Rahmens und aufgrund von Problemen bei der Pflanzenanzucht konnten jedoch keine verlässlichen Quantifizierungen für die einzelnen Mutanten erhalten werden.

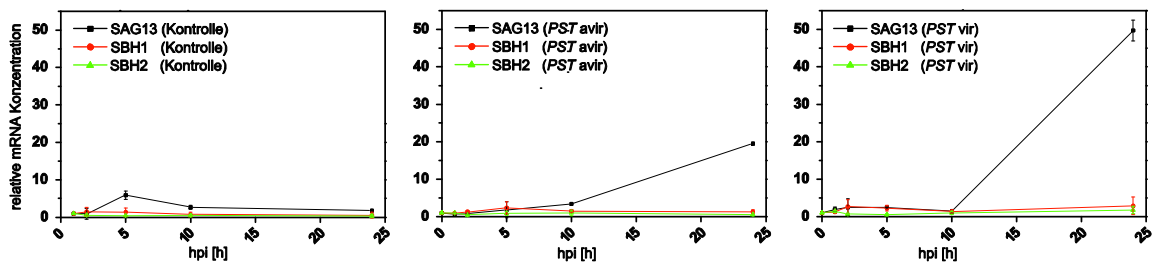


Abbildung 38: Genexpressionsanalyse nach Pathogenbehandlung in Blättern von *A. thaliana* Col-0. Mittels qRT-PCR wurden die mRNA-Gehalte von SAG13, einem Zelltod- und Seneszenzmarkergens, sowie der LCB-Hydroxylasegene SBH1 und SBH2 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infiltration von MgSO_4 (10 μM ; Kontrolle), *Pst* avir und *Pst* vir untersucht. Gezeigt sind die Mittelwerte ($n=3$) der relativen Expression der spezifischen mRNAs bezogen auf Aktin2/8, wobei sämtliche Werte als xfache Veränderung relativ zum Zeitpunkt 0 h (=1) angegeben sind. Hpi = hours post inoculation – Stunden nach der Behandlung.

Die Genexpression der zwei LCB-Hydroxylasen nach Pathogenstress konnte allerdings an Col-0 untersucht werden (Abbildung 38). Während sowohl virulente als auch avirulente Pathogene 10 hpi die Expression des Zelltod- und Seneszenzmarkergens SAG13 auslösen, lässt sich für SBH1 und SBH2 keine veränderte Genexpression innerhalb von 24 h nachweisen.

4. Diskussion

Sphingolipide (SPL) nehmen in allen Eukaryoten eine essentielle Rolle ein (SPERLING and HEINZ 2003). Sie weisen ein breites Spektrum an strukturellen Funktionen auf, sind aber auch an wichtigen Signalprozessen beteiligt (WORRALL 2003; HAYNES *et al.* 2009; SHANER *et al.* 2009). Obwohl die Naturwissenschaften schon im 19. Jahrhundert Kenntnis dieser Lipidklasse hatten, wurden erst in den letzten Jahrzehnten durch neue technische Möglichkeiten Fortschritte bei der Charakterisierung dieser Lipide gemacht. Aufgrund ihrer Komplexität und großen Vielfalt stellt die qualitative und quantitative Analyse von Sphingolipiden bis heute eine Herausforderung im Labor dar.

Ausgehend von einem einheitlichen Rückgrat, einer Sphingobase (long chain base; LCB), existieren viele Modifikationen, welche zu enorm diversen strukturellen und physikochemischen Eigenschaften führen können.

Eukaryotische Zellen weisen ein sensibel reguliertes Sphingolipidprofil auf, sind an diversen Signalprozessen beteiligt und schon geringe Änderungen der Sphingolipid-Homöostase können die Funktion oder das Schicksal der Zelle bzw. des umgebenden Gewebes verändern (HAYNES *et al.* 2009).

Pathogene können als Abwehrreaktion programmiertem Zelltod (PCD) in Pflanzen auslösen. Auch Sphingolipide sind an Zelltodprozessen in pflanzlichem Gewebe beteiligt. Die Etablierung lipidomischer Analysemethoden, etwa eines „targeted metabolite profiling approaches“, unter Einsatz geeigneter interner Standards zur Charakterisierung der Pflanzen-Pathogen Interaktion stand im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit.

Die Beteiligung von Sphingolipiden (SPL) an sowie die Mechanismen und zellulären Grundlagen von pflanzlichen Abwehrreaktionen sollten mit den dafür etablierten Analysemethoden untersucht werden. Die komplexe Regulation der Homöostase verschiedener SPL war dabei ebenso von Bedeutung wie die direkte Signalwirkung sowie die spezifischen Biosynthese- und Metabolismuswege der SPL selbst.

In der folgenden, thematisch gegliederten, Diskussion wird zuerst die Etablierung der nötigen Analytik beschrieben. Anschließend folgt die Betrachtung und Bewertung der Pflanzen-Pathogen Interaktion unter Verwendung dieser Methodik. Abschließend werden Erkenntnisse über mögliche Sphingolipid-Metabolismuswege diskutiert.

4.1. Entwicklung und Etablierung der Sphingolipidanalytik

Studien, in denen Sphingolipide (SPL) quantifiziert werden, benötigen aufgrund der hohen strukturellen Ähnlichkeit der verschiedenen SPL-Spezies ein hohes Maß an Spezifität (HAYNES *et al.* 2009). Die analytische Diskrimination ist daher entscheidend, um eine Aussage über spezifischen Gehalte der SPL in Geweben treffen zu können. Allerdings weisen SPL endogen ganz unterschiedliche Gehalte auf, was zu Konzentrationsunterschieden einzelner SPL von mehreren Dekaden führen kann. SPL besitzen oft sehr verschiedene Löslichkeiten und weitere physikochemische Eigenschaften und akkumulieren teilweise in unterschiedlichen Zellen und Kompartimenten. Daher sind nicht nur die Sensitivität der eingesetzten Analytik, sondern auch die Methodik der Lipidextraktion wichtige Faktoren (MARKHAM *et al.* 2006).

Klassische Methoden, wie etwa die Dünnschichtchromatographie (TLC) (YU and ARIGA 2000; UEMURA *et al.* 2006; STIBAN *et al.* 2008) oder die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) gekoppelt mit UV/Vis oder Fluoreszenzdetektoren (CALIGAN *et al.* 2000; LESTER 2001; MARKHAM *et al.* 2006), bildeten lange Zeit die Grundlage der Sphingolipidanalytik. Jedoch haben diese Methoden den Nachteil, dass sie nicht immer ausreichend spezifisch, sensitiv oder quantitativ sind und z.T. komplizierte und zeitaufwendige Derivatisierungen nötig sind. Erst die Verwendung moderner massenspektrometrischer Detektionsverfahren, durch Elektrospray-Ionisation (ESI) auch gekoppelt an UPLC/HPLC, ermöglichte eine spezifische und sensitive Analytik intakter Sphingolipide (LIEBISCH *et al.* 1999; BIELAWSKI *et al.* 2006; MARKHAM and JAWORSKI 2007). Basierend auf verfügbaren Protokollen wurde daher eine Sphingolipidanalytik etabliert, die den Anforderungen der biologischen Fragestellung dieser Arbeit gerecht werden konnte.

Die Verwendung spezifischer Säulen ermöglicht prinzipiell auch die Trennung isomerer oder chiraler Analyten (LEE *et al.* 2005; MERRILL *et al.* 2005). Die Kopplung von ESI-MS/MS Verfahren mit verschiedensten Normal- und Umkehrphasen UPLC/HPLC-Methoden wurde dabei schon erfolgreich für die Analyse von LCB, LCB-1P, Cer, Cer-1P, GlcCer, GIPC und für andere komplexe SPL angewendet (SUZUKI *et al.* 1989; SULLARDS and MERRILL 2001; PETTUS *et al.* 2003; MARKHAM and JAWORSKI 2007). Umkehrphasen- (RP) UPLC wurde hier unterstützend zur Identifizierung mittels MS/MS angewendet, die Trennung struktur- oder stereoisomerer Sphingolipide wurde nicht weiter verfolgt.

Etablierung der Methoden und Analyseparameter

Über käufliche SPL-Standards (Kalibrierstandards) war es möglich, Bedingungen für eine gleichzeitige massenspektrometrische Analyse verschiedener SPL innerhalb eines Analyselaufes zu etablieren (3.1.1). Wie in Abbildung 7 und Abbildung 8 exemplarisch dargestellt, führte die MS/MS-Analyse der verschiedenen SPL-Moleküle mittels Tandem-Quadrupol-

Massenspektrometer zu diagnostischen Fragmentionen. Dabei folgte die Fragmentierung unter bestimmten Bedingungen immer dem gleichen Muster (Abbildung 4 und Abbildung 5): Durch die Abspaltung von Wassermolekülen, etwaigen Kopfgruppen und der Fettsäuregruppe (bei Ceramiden und komplexen SPL), blieb das Rückgrat des SPL als detektierbares geladenes Fragment bestehen. Spezifische Fragmente waren dabei typischerweise die Sphingobasentrückgrate d18:2, d18:1, d18:0, t18:1 oder t18:0, mit m/z $[M-H_2O+H]^+$, $[M-2H_2O+H]^+$ bzw. $[M-3H_2O+H]^+$ für trihydroxy-SPL (Tabelle 7; 3.1.1). Um möglichst viele Analyten innerhalb eines Laufes erfassen zu können, wurde für jeden Analyt nur ein spezifisches Fragment zur Detektion und Quantifizierung ausgewählt. Weitere natürlich entstehende diagnostische Fragmente fließen nicht mit in die Berechnung der Gesamtmenge eines Analyten ein, was durch den Einsatz eines Responsefaktors kompensiert wird. Durch Verwendung des jeweils abundantesten Fragmentes (Sphingobasentrückgrat; ein- oder mehrfache Wasserabspaltung) für die Messung und Optimierung der Fragmentierungsbedingungen sollte die höchste Empfindlichkeit sichergestellt werden bzw. eine möglichst niedrige Nachweisgrenze erreicht werden.

Nachdem auch eine chromatographische Trennmethode etabliert werden konnte (3.1.2; Abbildung 9), wurden SPL-Gemische und Extrakte aus biologischem Material im „multiple reaction monitoring“ (MRM)-Modus innerhalb eines Laufs massenspektrometrisch analysiert (Abbildung 10) und mittels interner Standards und geeigneter Korrektur- und Auswertemethoden (z.B. spezifische Responsefaktoren; siehe 3.1.3) selektierte Sphingolipide auch quantifiziert.

Die einphasige Extraktion, d.h. die Verwendung eines einphasigen Extraktionsmittels (Isopropanol:Hexan:Wasser), welches sowohl polare als auch unpolare Eigenschaften besitzt, war dabei essentiell, um die diversen Sphingolipide mit ihren unterschiedlichen chemischen Eigenschaften innerhalb einer Extraktion erfassen zu können (MARKHAM *et al.* 2006). Die Verwendung von Extraktionsmitteln, bei welchen es zur Bildung mehrerer Phasen kommt, würde dazu führen, dass sich bestimmte Moleküle wie Sphingobasen, Ceramide oder phosphorylierte und komplexe SPL, je nach ihren physiko-chemischen Eigenschaften quantitativ in den Phasen verteilen.

Für natürlich vorkommende Isotopen wurde keine Korrektur durchgeführt. Zu jedem Element existieren natürliche Isotopen, deren Abundanz und Verteilung sich auf die Analytik von Biomolekülen auswirken und die, insbesondere bei besonders abundanter Analyten, andere Moleküle bei der massenspektrometrischen Detektion überlagern können (EIBL *et al.* 2008). Dadurch könnten die tatsächlichen absoluten Mengen der jeweiligen Analyten unterschätzt bzw. überschätzt werden (MARKHAM and JAWORSKI 2007). Die Verwendung einer RP18-

Umkehrphasenchromatographie ermöglichte zusätzlich zur Massendetektion auch eine zeitliche Auftrennung aufgrund massenunabhängiger hydrophober Wechselwirkungen. Überlagernde Isotope konnten daher vermieden werden. Der Einfluss von natürlichen Isotopen auf die Gültigkeit der Ergebnisse wurde für alle Experimente getrennt betrachtet und jeweils als vernachlässigbar befunden.

In dieser Arbeit wurden meist Untersuchungen zu zeitabhängigen Veränderungen der SPL-Gehalte nach biotischem oder abiotischem Stress durchgeführt. Relative Ergebnisse und Kinetiken dieser Arbeit besitzen somit allgemeine Gültigkeit, auch wenn die Erfassung absoluter Daten aufgrund von Inhomogenitäten pflanzlicher Sphingolipide bei der Quantifizierung Fehlerquellen und Ungenauigkeiten birgt.

Responsefaktoren konnten nur für die kommerziell erhältlichen SPL-Standards d17:1, d17:0, d18:1, d18:0, t18:0, d20:1, d20:0, d17:1-P, d18:0-P, d18:1-P, t18:0-P, d18:1-c12:0-P, t18:0-c8:0, d18:1-c10:0, d18:0-c18:0, t18:0-c18:0, d18:1-c24:1, d18:1-c24:1, d18:0-c24:1 und d18:0-c24:0 experimentell ermittelt werden. Die Responsefaktoren der restlichen analysierten SPL wurden nur abgeschätzt, daher stellen absolute Gehaltsangaben für diese Moleküle nur Näherungswerte dar. Außerdem blieben die Responsefaktoren in langen Analysereihen nicht konstant, weswegen nach etwa 30 Proben eine Reinigung des Massenspektrometers nötig war. Dazu kam es zu unterschiedlichen Detektorsensitivitäten, was im Vergleich der absoluten Quantifizierung einzelner Messreihen nicht immer durch die Responsefaktoren kompensiert werden konnte.

Die Erfassung so unterschiedlicher SPL wie freie Sphingobasen, Ceramide, GlcCer oder phosphorylierter SPL ist nach wie vor ein großes Problem dieser schwierigen Substanzgruppe und erfordert für eine ganzheitliche Betrachtung den Einsatz mehrerer paralleler Analysemethoden (SCHERER *et al.* 2010).

Der Vergleich von absoluten Sphingolipidmengen aus dieser Arbeit mit publizierten Daten oder Ergebnissen, die durch andere analytische Methoden gewonnen und quantifiziert wurden, erfordert daher besondere Aufmerksamkeit. Dies gilt jedoch generell für Ergebnisse, die durch unterschiedliche Analyse- oder Quantifizierungsmethoden erhalten wurden. Auch sind stark schwankende Basallevel der SPL in biologischem Material nicht ungewöhnlich und auch in unterschiedlichen Untersuchungen zu finden, die von denselben Experimentatoren durchgeführt wurden (MARKHAM and JAWORSKI 2007; TSEGAYE *et al.* 2007; CHEN *et al.* 2008; MICHAELSON *et al.* 2008). Die Lipidgehalte der vorliegenden Arbeit befinden sich jedoch im Rahmen der publizierten Daten.

Qualifizierung und Validierung

Die Analysemethodik (siehe hierzu auch 3.1.3) erwies sich, mit den genannten Einschränkungen, als ausreichend robust, präzise und genügend sensitiv für die in dieser Arbeit angestrebten Fragestellungen. Aufgrund der hohen Störanfälligkeit der Analyse durch Verschmutzungen des Messgeräts war allerdings auf ein striktes Reinigungsprogramm des Massenspektrometers zu achten um die Robustheit zu erhalten.

Niedrige Flussraten und geringe Injektionsvolumina zusammen mit einer chromatographischen Umkehrphasenauftrennung ermöglichten nicht nur eine ausreichend hohe Sensitivität und ein niedriges Hintergrundrauschen, durch die geringere Komplexität einer Probe zum jeweiligen Analysezeitpunkt nach der Chromatographie minimierten sich auch Ionen-Suppressionseffekte (Matrixeffekte) co-eluierender Substanzen (HAYNES *et al.* 2009).

Die Nachweisgrenze mittels massenspektrometrischer Detektion lag bei ca. 1 pmol absolut auf die Säule injiziertem Standard-SPL. Dabei war die MS-Methode um einen Faktor von ca. 10^2 - 10^3 sensitiver als die Fluoreszenzmethode nach OPA-Derivatisierung. Zur Quantifizierung der Analyten war der Einsatz interner Standards (ISs) nötig. Da nicht für alle untersuchten Analyten ideale interne Standards, etwa isotoopenmarkierte SPL, zur Verfügung standen, wurde für jede distinkte Sphingolipidklasse jeweils ein Sphingolipid mit einer in den untersuchten Organismen (*A. thaliana* sowie Pathogene) endogen nicht vorkommenden Kettenlänge gewählt (für Sphingobasen: d20:1; phosphorylierte Sphingobasen: d20:1-P; Ceramide: d18:1-c10:0). Andere untersuchte Klassen (Hydroxyceramide, Glycosylceramide) wurden ebenfalls mit d18:1-c10:0 quantifiziert. Aufgrund unterschiedlicher physiko-chemischer Eigenschaften der SPL ist diese Vorgehensweise für eine absolute Quantifizierung nicht ideal. Einerseits können die massenspektrometrischen Detektionsergebnisse stark von der Struktur und damit der Fragmentierung und Ionisierbarkeit eines Moleküls abhängig sein, andererseits können auch Matrixeffekte durch unterschiedliche Retentionszeiten bei der chromatographischen Auftrennung auftreten.

Eine alternative Methode stellt die Verwendung der hydrophilen Interaktionschromatographie (HILIC) dar. Die HILIC-Chromatographie hat sich als Möglichkeit für die Trennung von polaren und hydrophilen Verbindungen, unabhängig von Ladung und Molekülgröße, etabliert (CUBBON *et al.* 2009). Sphingolipide eignen sich aufgrund ihrer polaren klassenspezifischen Eigenschaften gut für eine HILIC-Auftrennung (SCHERER *et al.* 2010). Da die chromatographische Separation dabei nicht von der Länge der Kohlenwasserstoffketten abhängig ist, eluieren Sphingolipide einer Klasse aufgrund ihrer Polarität praktisch gleichzeitig. Matrixeffekte wirken sich somit auf alle Sphingolipide und den internen Standard ähnlich aus, wodurch eine robustere Quantifizierung bei gleichzeitiger Verwendung nur eines klassenspezifischen internen Standards

möglich wird. Der Einfluss natürlicher Isotope ist jedoch relevant und muss zwingend berücksichtigt werden. In dieser Arbeit wurde der HILIC-Ansatz getestet. Aufgrund der gleichzeitigen Elution ergab sich für die Sphingobasen jedoch eine deutlich erniedrigte Sensitivität. Diese Methodik fand somit nicht Eingang in die Routinemethodik, stellt aber einen möglichen Ansatz für weitere Untersuchungen dar, um komplexe SPL aufgrund ihrer polaren Eigenschaften aufzutrennen.

Eine weitere Möglichkeit wäre die Verwendung der sogenannten „shotgun lipidomics“, wobei auf eine Vortrennung durch LC-Systeme verzichtet wird und die Probe direkt in das Massenspektrometer injiziert wird (HAN and GROSS 2005; EJSING *et al.* 2009; HAN and JIANG 2009). Dadurch werden zwar unterschiedliche Matrixeffekte bezüglich einer chromatographischen Vortrennung von Standard und Analyten vermieden, allerdings hängt die Qualität solcher Untersuchungen sehr stark von den verwendeten Extraktions- und Aufreinigungsmethoden ab. Sphingolipide sollten nicht nur massenspektrometrisch, sondern für spezifische Fragestellungen, etwa der Gesamtlipid-Rückgratanalyse nach Hydrolyse, auch nach OPA-Derivatisierung fluorimetrisch analysiert werden. Publierte Protokolle erwiesen sich dabei für diese Arbeit als übertragbar (3.1.4).

Anwendung der Sphingolipidanalytik – targeted metabolite profiling

Durch den Einsatz von in dieser Arbeit etablierten spezifischen Extraktions- und Analysemethoden war es schließlich möglich, innerhalb eines „targeted metabolite profiling“-Ansatzes schnell und einheitlich die Zusammensetzung eines Teils des Sphingolipidoms in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* zu untersuchen (3.1.5).

Pflanzen besitzen ein breites Spektrum an Sphingolipiden mit theoretisch hunderten Spezies (MERRILL *et al.* 2005). Jedoch ist es nicht praktikabel, alle theoretisch und tatsächlich vorhandenen Sphingolipide mit Triple-Quadrupol Massenspektrometern zu detektieren. Erst durch den Einsatz von, technisch aufwendigen und teuren, Time-of-Flight-Massenspektrometern (Q-TOF) wird es in Zukunft möglich sein, diese analytische Lücke zu schließen. Einerseits sind die Mengen der verschiedenen Spezies oft sehr unterschiedlich, so dass SPL mit zu geringer Abundanz, etwa phosphorylierte Sphingobasen, durch unspezifische Extraktionsmethoden ungenügend detektierbar sind und dadurch bezüglich ihres Gehaltes unterschätzt würden (MARKHAM *et al.* 2006). Gerade Lipide sind auch aufgrund oftmals amphiphiler Eigenschaften schwer aus biologischem Material zu extrahieren.

Andererseits existieren für viele, v.a. komplexe aber auch pflanzentypische SPL (z.B. t18:1) keine geeigneten Standardverbindungen. Desweiteren steigt die Aufarbeitungs-, Analyse- und Auswertungszeit mit jeder weiteren Substanzklasse in einer Probe, etwa wenn GIPCs oder

Hydroxyceramide mit erfasst werden sollen. In dieser Arbeit lag daher der Fokus in der Analytik relativ einfacher, abundanter, gut zu messender und vor allem putativ funktionell relevanter Sphingolipide. Neben den freien Sphingobasen d18:2, d18:1, d18:0, t18:1 und t18:0, potentiellen Kandidaten für Signalfunktionen, wurden daher auch die Gehalte der, nach MARKHAM und JAWORSKI (2007), abundantesten Ceramide in *A. thaliana* bestimmt (Abbildung 14). Zur qualitativen und zum Teil semi-quantitativen Bestimmung wurden auch die Spiegel einiger phosphorylierter SPL und Hydroxyceramide sowie von abundanten Glycosylceramiden analysiert. Aufgrund fehlender biologischer Aktivität und Relevanz in den durchgeführten Versuchen wurde aber auf eine umfassende Optimierung und deren Routineanalytik verzichtet.

4.2. Sphingolipide in biotischen Stressreaktionen

SPL sind an einer Reihe von Funktionen und Stressreaktionen der unterschiedlichsten Organismen beteiligt (PÉTREMAND and WIDMANN 2008). Durch ihre membranbildende und -stabilisierende Wirkung vermitteln sie u.a. Kältetoleranz (CAHOON and LYNCH 1991) und Aluminiumresistenz (DA SILVA *et al.* 2006) in Pflanzen. Sphingolipide sind essentielle Bausteine von „Lipid Rafts“ (PRIESCHL and BAUMRUKER 2000; SPERLING and HEINZ 2003; BHAT and PANSTRUGA 2005) und gewährleisten die Funktionalität differenzierter Zellen (GONI and ALONSO 2006; YOSHIZAKI *et al.* 2008; POSSE DE CHAVES and SIPIONE 2010).

Auch direkte Signalwirkungen der SPL konnten nachgewiesen werden: Sphingosin-1-Phosphat (d18:1-P) ist an ABA-abhängigen Stomatabewegungen in *A. thaliana* beteiligt (NG *et al.* 2001; WORRALL *et al.* 2008). In tierischen Zellen sind für d18:1-P spezifische, G-Protein gekoppelte, Rezeptoren bekannt (SPIEGEL and MILSTIEN 2003; TAHA 2004; CHALFANT and SPIEGEL 2005). Auch Phytosphingosin-1-Phosphat hat bekannte Signalfunktionen (WORRALL *et al.* 2008), reguliert etwa die Antwort auf Hitzestress in Hefe (COWART *et al.* 2010). Auch Ceramide sind für direkte Signalwirkungen in tierischen Zellen (KITATANI *et al.* 2008) und Pflanzen (TOWNLEY *et al.* 2005) verantwortlich.

Zu den wichtigsten und allgemein anerkannten Funktionen der SPL in tierischen Zellen gehört die Beteiligung an Zelltodprozessen und Abwehrreaktionen (HUWILER *et al.* 2000; HANNUN *et al.* 2001; CHENG *et al.* 2003; HAIT *et al.* 2006; TAHA *et al.* 2006; HANNUN and OBEID 2008). Dabei ist der Rheostat zwischen freien Sphingobasen bzw. Ceramiden und ihrer phosphorylierten Form für Proliferation oder Apoptose in tierischen Zellen determinierend (LE STUNFF *et al.* 2002; MACEYKA *et al.* 2002; HAIT *et al.* 2006; SCHMITZ and LANGMANN 2006; PAUGH *et al.* 2008). Und in Pflanzen durch Mycotoxine induzierter PCD, welcher veränderten Sphingolipidspiegeln zugeschrieben wird (SPASSIEVA *et al.* 2002), kann durch Ceramide aufgehalten werden (BRANDWAGT *et al.* 2000).

Auch in Pflanzen ist also das Schicksal einer Zelle mit dem Rheostat verschiedener, u.a. phosphorylierter, Sphingolipide verknüpft, welcher auch durch Kinasen, Phosphatasen und Lyasen beeinflusst wird (GREENBERG *et al.* 2000; WORRALL 2003; NIU *et al.* 2007; SHI *et al.* 2007; TSEGAYE *et al.* 2007; WORRALL *et al.* 2008).

Und obwohl gerade Zelltodprozesse in direktem Zusammenhang mit Sphingolipiden, deren Metabolismus und Regulation stehen, sind genauere Zusammenhänge bisher weder in tierischen noch in pflanzlichen Organismen abschließend geklärt.

Sphingolipide und (programmierter) Zelltod in Pflanzen

Sphingolipide sind, wie bereits erwähnt, an einer Reihe von Zelltodprozessen in Pflanzen beteiligt: In einer Untersuchung von TOWNLEY *et al.* (2005) konnte gezeigt werden, dass exogen applizierte Ceramide mit kurzen Fettsäuren (z.B. C2; C6) in *A. thaliana* Zellkultur zu programmiertem Zelltod (PCD) führen, dem eine Konzentrationserhöhung von Calciumionen in der Zelle und eine Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) vorausgeht. Auch die Applikation freier Sphingobasen (LCBs) verursachte ROS-Produktion und PCD in Blättern (SHI *et al.* 2007). FB1 und AAL-Toxin, Pilztoxine und Inhibitoren der Ceramid-Synthase, verursachten einen Anstieg freier Sphingobasen bei gleichzeitiger Blockade der Ceramidsynthese, was u.a. zu einer ROS- und Phytoalexin-Produktion, Abwehrgenexpression und schließlich zu HR-ähnlichen Läsionen in Blättern führte (STONE *et al.* 2000; SPASSIEVA *et al.* 2002). Ähnliche Effekte traten auch in der Mutante *acd11* auf, in der ein SPL-Transporter defekt ist (BRODERSEN *et al.* 2002). Einen weiteren Hinweis auf die vielfältigen und zum Teil unverstandenen Wirkungen und Funktionen der SPL in Pflanzen lieferte die Mutante *acd5* (GREENBERG *et al.* 2000). ACD5 codiert für eine SPL-Kinase, bei deren Fehlen es zu Störungen der Sphingolipidhomöostase phosphorylierter und nicht-phosphorylierter SPL kommt, was sich direkt auf pflanzliche Abwehrreaktionen gegenüber Pathogenen auswirkt und wodurch HR-ähnliche Reaktionen in alternden Blättern auftreten (GREENBERG *et al.* 2000; LIANG *et al.* 2003).

Obwohl in weiteren Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass die Homöostase freier LCBs (SHI *et al.* 2007; TAKAHASHI *et al.* 2009), aber auch komplexer SPL (WANG *et al.* 2008), von essentieller Bedeutung für die Vitalität einer Zelle sind, konnten bisher keine Sphingolipidspezies direkt als wirksame Prinzipien bei der Pflanzen-Pathogen Interaktion identifiziert oder entsprechend spezifische Signalwege aufgeklärt werden.

Freie Sphingobasen lösen, wie bereits erwähnt, die Produktion von ROS aus (SHI *et al.* 2007). ROS sind in verschiedenen Signalwegen an Zelltodprozessen beteiligt (YOSHINAGA 2005; TRIANTAPHYLIDÈS and HAVAUX 2009).

Die Ergebnisse von BACH (2010) und dieser Arbeit zeigen, dass endogene freie LCBs (d18:0, d18:1 und t18:0) eine unterschiedliche Potenz aufweisen, die ROS-Produktion in *A. thaliana* auszulösen (Abbildung 34 und Abbildung 35). Wie mittels Leitfähigkeitsmessung auch in dieser Arbeit nachgewiesen, führen die freien Basen t18:0 und d18:0 exogen appliziert zu messbarem Zelltod (Abbildung 36).

Dabei spielen offenbar die Länge der LCB-Kette und der Sättigungsgrad eine Rolle, was auf einen strukturspezifischen Erkennungsmechanismus hinweisen könnte. Womöglich bildet in Pflanzen die C4-Hydroxygruppe des abundanten Phytosphingosins in t18:0 (und t18:0-P) die nötige bioaktive Struktur, welche im tierischen System durch die C4-Doppelbindung und die C3-Hydroxygruppe bei d18:1^{Δ4} (und d18:1^{Δ4}-P) in Form eines allylischen Alkohols gegeben ist (HWANG *et al.* 2001; RADIN 2004; PATA *et al.* 2009). Die phosphorylierten Formen könnten ebenfalls durch strukturabhängige spezifische Bindung eine antagonistische Wirkung in Zelltodprozessen ausüben. d18:0 hingegen besitzt nicht diese strukturellen Eigenschaften, zeigt in Übereinstimmung mit dieser Hypothese aber auch eine geringere ROS-elizitierende Wirkung. Langkettige Sphingobasen (d20:0 und d20:1) sowie die getesteten Ceramide konnten keine Reaktion in Pflanzen auslösen.

Die verschiedenen SPL lösen, abhängig von der jeweiligen Kettenlänge, dem Sättigungsgrad und weiterer Modifikationen, unterschiedlich starke Antworten und Reaktionen in *A. thaliana* aus. Nicht auszuschließen ist jedoch, dass aufgrund unterschiedlicher strukturell bedingter physikochemischer Eigenschaften, etwa Hydrophobizität und Polarität, die biologische Verfügbarkeit der extrazellulär applizierten SPL-Spezies divergiert. Löslichkeit, Membrangängigkeit und Interaktionen mit der Zellwand sind Faktoren, die die tatsächlichen SPL-Konzentrationen an potentiellen intra- und extrazellulären Wirkorten beeinflussen könnten. Aktivitätsassays und Markierungsansätze, auch *in vitro*, könnten in Zukunft helfen, den Einfluss dieser Faktoren zu bestimmen.

Über direkte Wirkweisen und Wirkorte von Sphingolipiden, um Zelltod auszulösen, ist noch nichts bekannt. Transient veränderte Sphingolipidspiegel könnten durch den spezifischen Einbau in Membranen und die damit verbundene Störung ihrer Zusammensetzung und Funktionalität Zelltod auslösen. Um dies zu überprüfen wäre es in zukünftigen Experimenten nötig, einzelne Kompartimente und subzelluläre Strukturen getrennt nach z.B. Pathogenstress auf ihre veränderte Lipidzusammensetzung hin zu analysieren. Dichtegradientenzentrifugation, Antikörper und Säulenchromatographische Verfahren könnten dazu beitragen, möglichst reine Trennungen verschiedener Organellen und Membransysteme zu erhalten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Sphingobasengehalte streng reguliert sind und dies zumindest mit Zelltodreaktionen korreliert. Eine weitere Möglichkeit ihrer Wirkweise könnte

daher auch darin bestehen, dass sie, wie in tierischen Zellen für d18:1-P nachgewiesen, als „second messenger“ an weiteren Signalkaskaden und Signalprozessen beteiligt sind. Die zunehmende Aufklärung der Biosynthese- und Metabolismuswege pflanzlicher Sphingolipide könnte daher dazu führen, dass in Zukunft proteinbiochemische und proteomische Methoden vermehrt an Bedeutung gewinnen. Der Einsatz spezifischer Enzyminhibitoren und Mutanten stellte schon für die vorliegende Arbeit einen Untersuchungsansatz dar und könnte auch in zukünftigen Arbeiten ein wichtiger Bestandteil sein.

Pseudomonas syringae* und *Arabidopsis thaliana

Pflanzenpathogene wie *Pseudomonas syringae* lösen in *Arabidopsis thaliana* Abwehrreaktionen aus (JONES and DANGL 2006). Diese Abwehrreaktionen gegenüber Pathogenen müssen rasch nach Befall in Gang gesetzt werden, um wirksam zu sein. Es gibt eine Reihe von Möglichkeiten, Abwehrmechanismen auf transkriptioneller, metabolischer oder physiologischer Ebene zu charakterisieren. Eine Möglichkeit ist die Detektion der hypersensitiven Reaktion (HR), eine Form des PCDs, welche bereits 1-6 h nach Befall durch bakterielle Pathogene nachweisbar ist (ALVAREZ *et al.* 1998; OROZCO-CARDENAS and RYAN 1999; BERGER *et al.* 2006; FREEMAN and BEATTIE 2009). Die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) ist ein typisches Merkmal der HR und lässt sich bereits wenige Minuten nach Pathogenbefall nachweisen (OROZCO-CARDENAS and RYAN 1999; NIMCHUK *et al.* 2003). Die Infektion mit avirulenten Pathogenen kann Zelltod (bzw. PCD) auslösen. Aber auch virulente Pathogene nutzen den programmierten Zelltod in der Wirtspflanze, um sich zu vermehren und auszubreiten, während sie gleichzeitig die aktive PCD-Abwehr der Pflanze unterdrücken können (MUR *et al.* 2008; TORRES 2010). Der zeitliche Verlauf dieser unterschiedlichen Formen des Zelltodes zeigt jedoch charakteristische Unterschiede (BERGER *et al.* 2006): Einem schnellen Zelltod und damit eingedämmter Ausbreitung der avirulenten Pathogene standen nach virulenter Infektion auch in der vorliegenden Arbeit ein späterer, dafür aber ungehinderter Zelltod gegenüber (Abbildung 33, Abbildung 35).

Sphingolipidkinetik nach Pathogeninfektion

Die Infiltration von *P. syringae* in Blätter von *A. thaliana* führte in dieser Arbeit bereits 1-2 h nach Infiltration (hpi) zu massenspektrometrisch detektierbaren transient veränderten Sphingolipidgehalten (Abbildung 15 und Abbildung 16), während phänotypisch erkennbare Merkmale des Zelltodes erst 6 hpi auftraten. Behandlung mit avirulenten *P. syringae* (*Pst* avr) erhöhte tendenziell die Gehalte mancher Ceramide. Besonders Ceramide mit dem Sphingobasenrückgrat t18:0 oder t18:1 und ungesättigten Fettsäuren (c16:0, c22:0, c24:0 und

c26:0) waren betroffen. Allerdings sanken die Ceramidgehalte bereits 5 hpi wieder auf ein basales Niveau.

In mehreren Wiederholungen zeigte sich bei t18:0 (Phytosphingosin) stets ein 2-3facher Gehaltsanstieg 1-2 hpi, welcher nur langsam wieder abnahm und auch 24 hpi das Basalniveau noch nicht wieder ganz erreicht hatte. Da dieser Anstieg schnell und transient, sowie vor Ausbildung sichtbarer Symptome und tiefgreifender Umsteuerungen des Metabolismus detektierbar war, könnte dem Phytosphingosin demnach eine Rolle als zelluläres Signal zukommen.

Infiltration mit virulenten *P. syringae* (*Pst vir*) hingegen führte zu keinen starken, frühen und transienten Gehaltsänderungen der untersuchten Ceramide. Bei manchen Ceramiden war ein geringer und dann kontinuierlicher Anstieg ca. 10 hpi festzustellen. Diese tendenziell erhöhten Werte waren vermutlich eine Folge der fortschreitenden Ausbreitung des virulenten Pathogens. Ceramide und weitere komplexe SPL wurden vermutlich aus den verschiedenen Membranen durch hydrolytische und degradative Prozesse während des Zelltodes freigesetzt und nicht *de novo* synthetisiert. Durch fortschreitenden Zelltod werden auch Regulations- und Metabolismuswege geschädigt, da viele dafür nötige Proteine membranassoziiert sind (PATA *et al.* 2009) und ihre Funktion und Assoziation durch eine zelltodbedingte Membranauflösung verloren geht.

Jedoch erhöhte sich auch der Spiegel an freiem t18:0 schnell 2-3fach, erreichte aber 5 hpi wieder Basalniveau.

Die Kinetik der Gehalte der freien Sphingobase t18:0 nach Pathogenbehandlung unterschied sich deutlich zwischen virulenten und avirulenten *P. syringae* und könnte mit unterschiedlichen pflanzlichen Signalprozessen bei der Infektion zusammenhängen. Beide Pathogen-Stämme lösten primär einen schnellen und starken Anstieg der freien Sphingobase t18:0 aus. Im Falle von *Pst avr* bleibt der hohe t18:0 Spiegel auch über einen Zeitraum von mehreren Stunden erhalten und nimmt anschließend nur langsam wieder ab. Dieser transiente Anstieg korreliert in der Pflanze mit Abwehrreaktionen, wie etwa der Expression spezifischer Abwehrgene (Abbildung 38), der ROS-Produktion (Abbildung 35), der Störung der Photosystem II-Aktivität (Abbildung 33) und schließlich der HR innerhalb weniger Stunden nach Infektion (TAO *et al.* 2003).

Im Zuge des „targeted metabolite profiling“-Ansatzes dieser Arbeit wurde zugunsten einer sensitiven, schnellen, praktikablen und kosteneffizienten Analytik auf die Erfassung weiterer Sphingolipide, etwa phosphorylierte Sphingolipide, Hydroxyceramide, Glycosylceramide (GlcCer) und Glycosyl-Inositol-Phosphorylceramide (GIPC), verzichtet. Eine Beteiligung dieser Sphingolipide an möglichen Signalwegen und Zelltodprozessen konnte somit nicht abschließend

geklärt werden. Die Behandlung mit avirulenten *Pst* führte zumindest zu keinen transienten Gehaltsänderungen derjenigen komplexen SPL, welche von MARKHAM und JAWORSKI (2007) in *A. thaliana* als besonders abundant nachgewiesen wurden (Abbildung 16).

Regulation des SPL-Metabolismus

Virulente Pathogene wie *Pst* vir verhindern aktiv die R-Gen vermittelte Immunantwort in Pflanzen (DANGL and JONES 2001). Der transiente Verlauf der t18:0-Kinetik mit der raschen Rückkehr zum Basalniveau bereits 5 hpi könnte daher bei *Pst* vir, neben einer generell schwächeren Induktion von Abwehrprozessen, durch die Hemmung des t18:0-Metabolismus hervorgerufen werden, wobei aktiv die Abwehrreaktionen von *A. thaliana* unterdrückt werden (WARD *et al.* 2010). Hierfür sind vermutlich bisher unbekannte wirtseigene Regulationsmechanismen verantwortlich.

Der Gehalt von Signalmolekülen muss von einer Zelle streng reguliert werden, um falsche bzw. unkontrollierte Signalantworten zu vermeiden. Dies zeigte sich für Sphingolipide auch nach Verwundung. Mechanischer Stress führt in Pflanzen einerseits zu spezifischen Verwundungsreaktionen wie verändertem Wachstum, vermehrter Produktion von Signalmolekülen und der Neubildung von Abwehrsubstanzen wie Proteaseinhibitoren und Phytoalexinen, andererseits durch die mechanische Zerstörung von Zellen, ihrer Kompartimente und Membranen auch zu einer Freisetzung diverser Moleküle daraus (MOSBLECH *et al.* 2008). So wurde etwa der geringfügige Anstieg an t18:0, wie er auch bei der Kontrollinfiltration mit Puffer zu beobachten war (Abbildung 15), womöglich durch leichte Quetschungen während der Infiltration mittels Spritze ausgelöst. Der Anstieg von t18:0 und einigen Ceramiden bei der Kontrollinfiltration war aber deutlich geringer als nach gleichzeitiger Bakteriengabe und spielt daher im Vergleich zu pathogenvermittelten Gehaltsänderungen der Sphingolipide eine vernachlässigbare Rolle. Dies zeigte sich auch nach starker mechanischer Verwundung mittels Pinzette. Einem schnellen Gehaltsanstieg von t18:0 etwa 1 h nach Verwundung (ca. 2-3fach) folgte bereits 2 h nach Quetschung wieder eine Rückkehr auf Basalniveau (Abbildung 17 und Abbildung 18). Bis auf t18:1-c16:0, t18:0-c16:0 und t18:0-c22:0 änderten sich auch hier die Gehalte der Ceramide nicht. Diese Anstiege von t18:0 und Ceramiden nach Verwundung waren dabei nicht ausreichend, um PCD auszulösen und das Gewebe erholte sich wieder. Die Kinetik von t18:0 ähnelte dabei der durch *Pst* vir verursachten.

Dass die zelleigene Metabolismusmaschinerie dazu befähigt ist, die beobachteten schnellen transienten Anstiege durch *de novo* Biosynthese zu verursachen, wurde durch Behandlung mit Fumonisin B1 deutlich. Dieses Pilztoxin hemmt die Ceramidsynthese, was zu einer Akkumulation freier Sphingobasen und dadurch u.a. zu Zelltod führt (ASAI *et al.* 2000). Bereits 10 μ M FB1

führten in dieser Arbeit 1 h nach Infiltration zu einem 50fachen Anstieg von t18:0 und auch der Gehalt an d18:0 erhöhte sich (Abbildung 22). Während die Mengen an freiem t18:0 und d18:0 kontinuierlich zunahmen, blieben die (allerdings wesentlich höheren) Spiegel abundanter Ceramide bis zu 24 h konstant. Dies weist auf eine effektive Hemmung der Ceramidsynthese und eine schnelle und spezifische Biosynthese der Sphingobasen hin. In *P. syringae* konnten keine LCBs, mit Ausnahme von Spuren von d18:1, nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies belegt, dass die beobachteten schnellen Konzentrationsänderungen der Sphingolipide nach *Pst*-Infiltration eine Folge des veränderten Wirtsmetabolismus ist.

Die schnelle Regulation der Sphingolipidgehalte wird auch nach Infiltration mit Sphingobasen deutlich (Abbildung 23). Hohe Mengen (50 μM) der exogen applizierten freien Basen d18:0 und t18:0 wurden schnell und effektiv metabolisiert. Bereits 5 h nach Applikation sanken die Gehalte dieser freien Basen substantiell, wobei ein dazu korrelierender transienter Anstieg einiger Ceramide zu beobachten war. Dies lässt auch auf eine schnelle und effektive Aufnahme in das Zellinnere durch spezifische Transporter oder Diffusion schließen. Die resorbierten freien Sphingobasen wurden schnell (2 h nach Applikation) durch Ceramid-Synthasen in die LCB-spezifischen Ceramide eingebaut und anschließend weiter, vermutlich zu komplexen Sphingolipiden, metabolisiert. Danach änderten sich die Spiegel von d18:0 und t18:0 nur noch langsam. Dies liegt vermutlich an der Verfügbarkeit bzw. Löslichkeit der Sphingobasen, die offenbar nicht komplett von den Zellen resorbiert wurden. Exogenes, putativ an die Zellwand gebundenes oder im Apoplasten ausgefallenes, t18:0 bzw. d18:0 konnte somit nicht bzw. nur sehr langsam weiter metabolisiert werden. Die Zell-assoziiert gemessenen hohen Spiegel der Sphingobasen d18:0 und t18:0 und die schnelle Aufnahme bedeuten aber nicht, dass diese Sphingobasen frei in der Zelle vorliegen und ihre Zelltod-auslösende Wirkung durch rezeptorvermittelte Prozesse oder Membranschädigungen auswirken.

In diesem Experiment führte die Infiltration von t18:0 und d18:0 (je 50 μM) in *A. thaliana* Blättern auch nicht zu phänotypisch erkennbarem PCD. Ebenfalls durch die Messung mittels PAM, einem Indikator der Chloroplastenintegrität, waren Zellschäden (bzw. Zelltod) durch die eingesetzten Mengen an freien LCBs kaum nachzuweisen (3.5.1.2). In einem weiteren Experiment jedoch, in dem Blattscheiben inkubiert wurden, ließ sich die Induktion von Zelltod nach Applikation von SPL mithilfe von Leitfähigkeitsmessungen nachweisen (Abbildung 36). Dass der Nachweis von Zelltod nur bei isolierten Blattscheiben gelang, könnte mit der Verfügbarkeit der gelösten Sphingolipide zusammenhängen. Vermutlich reichten die eingesetzten Konzentrationen nicht aus, um massiert PCD in ganzen Blättern auszulösen. Auch waren Chloroplasten aufgrund ihrer Lokalisation innerhalb der Zelle nicht sofort den exogen

applizierten SPL ausgesetzt. Blattscheinen hingegen weisen eine große Zahl beschädigter Zellen an den Blatträndern auf. Dadurch könnten SPL besser in diese Zellen diffundieren, PCD auslösen und diesen auch in angrenzenden Zellen induzieren. Desweiteren könnten sie durch das Ausstanzen bereits mechanisch so gestresst gewesen sein, dass bereits geringe Änderungen der SPL Konzentrationen ausreichend waren, um PCD auszulösen. Eine Konzentrationsabhängigkeit von Zelltodprozessen könnte, wie bereits erwähnt, auch auf die generelle Schädigung der Membranen zurückzuführen sein: Durch den Einbau der LCBs oder deren Stoffwechselprodukte in die Membran wird deren Integrität, Permeabilität und Struktur verändert, was schließlich die Funktion der Membranen stören könnte.

Sphingolipide sind auch am Aufbau von Lipid Rafts beteiligt (BHAT and PANSTRUGA 2005). Eine veränderte Zusammensetzung könnte die Funktionalität dieser Membrandomänen und ihrer assoziierten Proteine beeinflussen. Neben diversen anderen Signalfunktionen sind Lipid Rafts auch bei Pathogen-Interaktionen und Zelltodprozessen beteiligt (RIETHMULLER *et al.* 2006; LIN *et al.* 2008; HARTLOVA *et al.* 2010; VAN DER MEER-JANSSEN *et al.* 2010). Welchen Einfluss dabei spezifische Lipide oder Proteine spielen ist jedoch noch nicht hinreichend geklärt.

Betrachtet man jedoch das Lipidprofil der Kinetik zu bestimmten Zeitpunkten nach Infiltration freier LCBs, so erkennt man einen raschen Abbau der aufgenommenen freien Basen innerhalb von 5 h (Abbildung 23). Gleichzeitig stiegen die Gehalte t18:x-basierter Ceramide transient 2 h nach Infiltration. LCB- und Ceramidkonzentrationen werden von uninfiltriertem Gewebe also effektiv innerhalb von weniger als 5 h auf Basalniveau zurückreguliert. Dabei stellt der Einbau freier Basen in Ceramide einen möglichen Metabolismusweg dar. Nach Phosphorylierung könnten LCBs durch Lyasen auch irreversibel abgebaut und aus dem SPL-Pool entfernt werden (TSEGAYE *et al.* 2007; WANG 2007). In zukünftigen Arbeiten wäre es daher sinnvoll, die Analytik auch auf die Abbauprodukte Palmitaldehyd und Phosphoethanolamin auszuweiten. Auch können Ceramide durch weitere Metabolismusreaktionen in komplexe SPL überführt werden. Dies könnten z.B. als Membranmoleküle ohne Signalwirkung gespeichert werden.

Arabidopsis thaliana ist somit in der Lage, Aufbau, Abbau und Metabolismus von SPL sehr schnell und effektiv zu regulieren. Die beobachteten zeitlichen Abfolgen korrelieren dabei mit den beobachteten Kinetiken nach Pathogeninfektion. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass es sich bei den transient erhöhten t18:0-Spiegeln um ein aktives Signal während der Pflanzen-Pathogen Interaktion handeln kann.

Sphingolipide als Marker für Pflanzen-Pathogen Interaktionen

Infiltration von *P. syringae* DC3000 in Blätter von *A. thaliana* führt zu spezifisch und transient veränderten Sphingolipidspiegeln. Besonders Phytosphingosin (t18:0) scheint dabei eine

besondere Rolle zu übernehmen. Ob Sphingolipide auch in anderen Pathosystemen mit Pathogeninfektionen in Verbindung gebracht werden können, wurde in weiteren Experimenten überprüft.

Die Infiltration mit *P. syringae* pv. *maculicola* (*Psm*) ergab ein sehr ähnliches Muster der Sphingolipidkinetiken wie die Infiltration mit *Pst* (Abbildung 19): Einem spezifischen transienten Anstieg von t18:0 stehen nur geringe Gehaltsänderungen der untersuchten Ceramide gegenüber. Auch zeigten sich die schon bei *Pst* beobachteten differenziellen Kinetiken virulenter und avirulenter Pathogene. Infiltration mit *Psm*, im Unterschied zu *Pst*, führte jedoch auch zu einem transienten Anstieg von t18:1. Dies könnte an unterschiedlichen Signalwegen der putativen Erkennungs- und Abwehrreaktionen durch unterschiedlichen Effektoren von *Psm* und *Pst* liegen.

Um zu überprüfen, ob neben den getesteten (hemi-) biotrophen Bakterien *Pst* und *Psm* auch andere pathogene Organismen Änderungen der Sphingolipidspiegel mit Signalcharakter auslösen, wurde der necrotrophe Ascomycet *Sclerotinia sclerotiorum* eingesetzt (Abbildung 20). Aufgrund der verwendeten Infektionsmethode breitet sich das Pathogen ringförmig um die Infektionsstelle im Blatt aus, so dass keine einheitliche und gleichzeitige Infektion aller Zellen eines Blattes erreicht werden kann. Außerdem unterscheidet sich die Geschwindigkeit der Infektion von derjenigen, welche von bakteriellen Pathogenen erreicht wird. Trotz dieser Unterschiede zeigte sich auch nach *S. sclerotiorum* Inokulation 60 hpi ein deutlicher Anstieg von t18:0. Neben einigen t18:0 und t18:1-haltigen Ceramiden war auch ein Anstieg von d18:0 zu verzeichnen. Die Spiegel der meisten anderen untersuchten SPL waren nicht verändert. Ein Einfluss von *S. sclerotiorum* auf die Sphingolipide in systemischen Blättern konnte auch 60 hpi nicht nachgewiesen werden. Sphingolipide scheinen somit ein relativ lokal begrenztes Signal infizierter Zellen darzustellen. Auch die Pilze Mehltau (*Blumeria graminis*) und Grauschimmelfäule (*Botrytis cinerea*) zeigten in Vorversuchen einen Einfluss auf die Gehalte von t18:0 (Daten nicht gezeigt).

PAMP-triggered immunity wird z.B. durch ein 22 Aminosäuren langes Fragment des Flagellins (flg22) ausgelöst (ABRAMOVITCH *et al.* 2006). Infiltration mit flg22 führte in dieser Arbeit zu einem raschen, 4-5fachen, Anstieg von t18:0, tendenziell vergleichbar dem Anstieg nach Infiltration mit *Pst* avr oder *Pst* vir (Abbildung 21). Allerdings erreichte der t18:0-Spiegel schneller wieder das Basalniveau, ähnlich schnellen pflanzlichen Reaktionen wie der ROS-Produktion nach flg22-Inkubation (FELIX *et al.* 1999; TORRES 2010). Dies könnte an einem schnellen Metabolismus des flg22 liegen, wodurch es zu einer schnellen Konzentrationsabnahme von verfügbarem flg22 kommt, im Gegensatz zur ständigen Produktion von PAMPs durch die sich vermehrenden Bakterien nach Infiltration in das Blatt. Eventuell ist flg22 alleine auch nicht ausreichend, um ein

SPL-Signal wie nach *Pst* avr oder *Psm* avr Infiltration auszulösen und es sind noch weitere Effektoren nötig. Die Bedeutung von flg22 in der t18:0 abhängigen Pathogenabwehr konnte nicht abschließend geklärt werden.

Ob intra- und extrazelluläre Erkennungssysteme oder eine erfolgreiche Infektion notwendig sind, um veränderte Sphingolipidspiegel hervorzurufen, sollte auch durch den Einsatz eines mutierten Stammes des Pathogens *P. syringae* (*Pst* hrpA-; siehe 2.1.6.2) erreicht werden. Dieser Stamm ist nicht in der Lage, einen Infektionspilus (hrp) auszubilden und kann folglich keine Effektoren in das Cytosol einer Pflanzenzelle abgeben (LEE 2005).

Leider ergab ein erstes Experiment mit diesem Stamm keine eindeutigen Ergebnisse. Weitere Tests konnten aus Zeitgründen nicht mehr durchgeführt werden.

Aus den erhaltenen Ergebnissen lässt sich einerseits folgern, dass es sich bei dem beobachteten t18:0-Anstieg um ein Signal handeln könnte. Darüber hinaus wurde deutlich, dass die t18:0-Spiegel streng regulierte Stoffwechselprodukte darstellen. Andererseits könnten Sphingolipide, insbesondere die freie Sphingobase t18:0, auch lediglich eine Folge der avirulenten Pflanzen-Pathogen Interaktion darstellen. t18:0 wäre somit ein Marker für die Abwehrreaktion, allerdings ohne funktionelle Bedeutung.

4.3. Biosynthese bioaktiver Sphingolipide

Nachdem in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass ein Anstieg der freien Sphingobase t18:0 dem pathogenvermittelten programmierten Zelltod (PCD) vorausgeht und die Gehalte dieser freien Base streng reguliert werden, könnte t18:0 eine Signalfunktion in der Pflanzen-Pathogen Interaktion zukommen. Um diese Frage auf genetischer Ebene zu klären, sollten Mutanten untersucht werden, die einen Defekt in der t18:0 Biosynthese aufweisen.

CHEN *et al.* (2008) konnten zeigen, dass die beiden LCB-Hydroxylasen SBH1 und SBH2 für die *de novo* Synthese von t18:0 aus d18:0 verantwortlich sind. CHEN *et al.* konnten dazu T-DNA Mutanten charakterisieren, welche in jeweils einem oder beiden Genen defizient waren. Dabei zeigte sich für Blätter eine besondere Aktivität von SBH1, wobei Einzelmutanten generell keine phänotypischen Auffälligkeiten besaßen (CHEN *et al.* 2008). Die Doppelmutante hingegen wies starke phänotypische Merkmale auf und war nicht voll entwicklungsfähig. Deshalb wurden die Experimente mit den Einzelmutanten durchgeführt. Der Vergleich der basalen Sphingolipidgehalte zeigte auch in dieser Arbeit Unterschiede in den Sphingolipidgehalten (Abbildung 26): Während die Mutante *sbh21* erhöhte Spiegel einiger t18:1-Ceramide aufwies, davon abgesehen aber dem Sphingolipidprofil des Wildtyps entsprach, war in der Mutante *sbh1-1* vor allem der zweifach erhöhte Gehalt an d18:0 auffällig. Freies t18:0 war in beiden Mutanten

um ca. 90% reduziert. Betrachtet man den Gesamtpool an Sphingobasen, etwa nach Totalhydrolyse (Abbildung 27), so weist die Mutante *sbh1-1* erhöhte Gehalte der LCBs d18:1 (2-3fach) und d18:0 (5fach) auf. In der Mutante *sbh2-1* hingegen war besonders der Gehalt an t18:1 leicht erhöht. Der Gesamtpool von d18:0 und t18:0 in komplexen SPL erwies sich jedoch als dem Wildtyp ähnlich, was auf die generelle funktionelle Redundanz, jedoch auf teilweise unterschiedliche Spezifitäten der beiden Hydroxylasen SBH1 und SBH2 in ungestressten Blättern zurückzuführen ist.

Betrachtet man die Kinetiken der meisten Sphingolipide nach Pathogeninfiltration mit virulenten und avirulenten *Pst* (Abbildung 28 und Abbildung 29), so wird ein ähnliches Muster erkennbar, wie es bei Col-0 zu beobachten war (Abbildung 15). Unterschiede zeigten sich allerdings für *sbh1-1* bei den Gehalten der freien Base t18:0 und d18:0. In *sbh1-1* wies nicht t18:0 den deutlichsten Anstieg nach Pathogenbehandlung auf, sondern d18:0 (ca. 3fach; Abbildung 30). Die Gehaltsänderungen der Sphingobasen in der Mutante *sbh2-1* entsprach dem Wildtyp.

Die Mutante *sbh1-1* enthielt, im Vergleich zum Wildtyp, mit etwa 1,5fach erhöhte Mengen an konjugierter t18:0 im Gesamtpool komplexer SPL sehr ähnliche Gehalte (Abbildung 27). Pathogenstress führte auch zu keinen veränderten Gesamtgehalten der Sphingobasen in komplexen SPL (Abbildung 31).

Dies weist darauf hin, dass t18:0 nach (Pathogen-)Stress nicht durch unspezifische Lipasen aus komplexen SPL, etwa GlcCer und GIPC in Membranen, freigesetzt wird, da sich die Gehalte komplexer t18:0-SPL in Mutante und Wildtyp sehr ähneln. Ob allerdings spezifische Lipasen beteiligt sind, denen auch aufgrund der höheren Verfügbarkeit d18:0-basierter komplexer SPL (d18:0 nach Totalhydrolyse ca. 5fach erhöht) in *sbh1-1* mehr Substrat zu Verfügung steht, oder ob d18:0 *de novo* biosynthetisiert wird, ließ sich im Rahmen dieser Arbeit nicht klären. Versuche mit dem Serin-Palmitoyl-Transferase-Inhibitor Myriocin, welches den Startpunkt der *de novo* Biosynthese blockiert, führten zu keinen eindeutigen Ergebnissen (Daten nicht gezeigt).

SBH1 und SBH2 können *in vivo* sowohl freie d18:0 als auch komplexe SPL hydroxylieren (SPERLING *et al.* 2001; CHEN *et al.* 2008). Ob die Hydroxylasen allerdings spezifisch reguliert sind und z.B. nach Pathogenstress spezifische Aktivitäten bezüglich des t18:0 Metabolismus zeigen, ist nicht bekannt.

Zusammengenommen lieferte diese Arbeit allerdings einen starken Hinweis darauf, dass in Antwort auf biotische Stresseinwirkung die Sphingobase Phytosphingosin (t18:0) *de novo* aus Sphinganin (d18:0) spezifisch durch SBH1 synthetisiert wurde, wobei t18:0 typische Merkmale eines Signalmoleküls aufwies.

Die Mutante *sbh1-1* ist in der Umsetzung von d18:0 zu t18:0 gestört, was zum beobachteten Anstieg der freien Sphingobase d18:0 führte. In dieser Arbeit war keine Gehaltsveränderung von d18:0 mit den verwendeten Methoden und Zeitpunkten in Col-0 und *sbh2-1* zu detektieren.

Eine mögliche Erklärung für die dargestellten LCB-Kinetiken liegt in der Membranlokalisation SPL-spezifischen Enzyme (PATA *et al.* 2009). Eventuell ist SBH1 in räumlicher Nähe zu spezifischen Metabolismus- und Signalkettenenzymen lokalisiert, möglicherweise in Lipid Rafts, wodurch die direkte Kanalisierung des d18:0 zu t18:0 vermittelt wird. Somit wird *de novo* oder mittels „salvage pathway“ gebildetes d18:0 direkt in t18:0 umgesetzt.

Eine weitere Hypothese wäre eine unterschiedliche Aktivität der beiden Hydroxylasen. Fehlt die putativ schneller agierende SBH1, so akkumulieren d18:0 und in Folge davon auch d18:x-Ceramide nach akutem Stress, während durch normale und langsame Entwicklungsprozesse die SPL-Gehalte auch durch SBH2 reguliert werden könnten.

Es stellt sich die Frage, ob nun t18:0 tatsächlich ein Signalmolekül ist, oder ob eventuell d18:0 ursächlich für die beobachteten Signalprozesse war. Ebenso wie SBH1 sehr schnellen Zugriff auf d18:0 hat, so könnten auch weitere Proteine und Rezeptoren einen d18:0-Anstieg als Signal erfassen. t18:0 wäre demnach ein Abbauprodukt, um ein putativ aktives Signalmolekül d18:0 schnell aus dem Signalkreislauf zu entfernen.

Diese Frage ließ sich innerhalb der vorliegenden Arbeit nicht abschließend klären. Jedoch gibt es Hinweise auf möglicherweise unterschiedliche Rollen der Sphingobasen d18:0 und t18:0 in Signalwegen von *A. thaliana*. So führte die Behandlung mit avirulenten *Pst* in der Mutante *sbh11* zu einer verstärkten ROS-Produktion (Abbildung 35). Dies lässt auf eine besondere Bedeutung von d18:0 oder daraus entstehenden Metabolismusprodukten schließen. Es könnte sich aber auch um Homöostaseeffekte handeln, die durch fehlendes freies t18:0 verursacht werden. Auch könnte phosphoryliertes Phytosphingosin (t18:0-P), wie d18:1-P in tierischen Zellen (CHALFANT and SPIEGEL 2005), ein proliferatives Signal darstellen, welches in der Mutante *sbh1-1* fehlt.

Andererseits ergaben Experimente mit exogen applizierten LCBs besonders für t18:0 eine stärkere Signalwirkung im Vergleich zu d18:0. So löste t18:0 eine höhere ROS-Produktion als d18:0 in *sbh1-1* aus (Abbildung 35). Die Bedeutung von t18:0 zeigte sich auch in Vorversuchen anhand einer geringfügig gesteigerten Suszeptibilität gegenüber virulenten *Pst* in *sbh1-1* (Abbildung 37). Diese ist jedoch in zukünftigen Untersuchungen weiter zu untersuchen.

Die Behandlung mit exogenem t18:0 führte auch zu einem wesentlich stärkeren zelltodauslösenden Effekt als d18:0, dieser war jedoch sowohl für die Mutante *sbh1-1* und den Wildtyp gleich (Abbildung 36). Dabei bleibt, wie bereits erwähnt, die tatsächliche Verfügbarkeit und Konzentration der verschiedenen LCBs aufgrund ihrer unterschiedlichen physiko-

chemischen Unterschiede unberücksichtigt, auch wenn Untersuchungen des Puffermediums auf etwa gleiche Löslichkeiten der LCBs schließen lassen (Daten nicht gezeigt).

4.4. Ausblick

Mittels massenspektrometrischer Methoden konnte in dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass der Gehalt der freien Sphingobase Phytosphingosin (t18:0) in Pflanzen spezifisch bei der Interaktion mit pathogenen Bakterien (*Pseudomonas syringae*) reguliert wird. Diese Gehaltsänderung korreliert mit der Produktion von ROS und dem Verlauf der HR. Ebenfalls zum ersten Mal konnte gezeigt werden, dass dieser schnelle Metabolismus, der von d18:0 zu t18:0 führt, abhängig von SBH1 ist. Auch einige andere Sphingobasen sind an Mechanismen beteiligt, die mit HR in Verbindung gebracht werden. So lösen d17:1, d18:0 und d18:1 ebenfalls die Produktion von ROS aus und können zu Zelltod führen, nicht aber d20:0, d20:1 sowie weitere untersuchte Ceramide und phosphorylierte SPL.

Aus diesen Ergebnissen und unter Einbeziehung publizierter Daten ergeben sich daher weiterführende Fragen:

Wie vermitteln Sphingolipide ihre Signalwirkung in Zelltodprozessen?

Falls SPL nicht nur Biomarker der Pflanzen-Pathogen Interaktion darstellen, so ist offenbar die spezifische Struktur der SPL für eine putative Signalfunktion in pflanzlichen Abwehrprozessen von Bedeutung. Die Produktion von ROS und die Ausbildung von Zelltod wurden in dieser Arbeit selektiv nur durch einige SPL vermittelt. Auch zeigen publizierte Daten, dass nur spezifische SPL bestimmte Signalwirkungen aufweisen (TOWNLEY *et al.* 2005; SHI *et al.* 2007; WANG 2007; CHEN *et al.* 2008).

Eine mögliche Signalwirkung der SPL könnte dabei auf verschiedenen Wegen zustande kommen: Erstens könnten direkte rezeptorvermittelte Signalprozesse beteiligt sein. SPL könnten als MAMPs/PAMPs durch Rezeptoren erkannt werden. Bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) etwa werden in tierischen Zellen durch den *Toll-like receptor 4* (TLR4) erkannt (WYMANN and SCHNEITER 2008). In tierischen Zellen sind sogar spezifische Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren (G-Proteine) bekannt (SIEHLER and MANNING 2002). In Pflanzen ist jedoch noch kein spezifischer SPL-Rezeptor charakterisiert worden. Die Suche nach solchen Rezeptoren bzw. ihrer Funktion könnte durch proteinbiochemische, molekularbiologische, aber auch durch bioinformatische Methoden *in silico* in fortführenden Arbeiten zu Kandidaten führen.

Zweitens könnten SPL die Aktivität spezifischer Enzyme beeinflussen. Aktivitätsassays, Inhibitorstudien sowie die Verwendung der in dieser Arbeit selektierten Mutanten könnten

mögliche Einflüsse von SPL auf bestimmte Enzyme, aber auch ganze Metabolismuswege aufklären.

Untersuchungen in unserem Labor konnten zeigen, dass *respiratory burst oxidase homolog D* (RBOHD) für die SPL- abhängige ROS Produktion nötig ist (Frank Waller; persönliche Kommunikation). RBOHD ist eine durch CaDPK regulierte Oxidase, in Lipid Rafts lokalisiert und an der PAMP-vermittelten HR beteiligt (MILLER *et al.* 2009; POGÁNY *et al.* 2009). SPL, ebenfalls Bestandteile von Lipid Rafts, könnten somit HR-Signale darstellen, welche über die ROS-Produktion an Zelltodreaktionen beteiligt sind. Ob diese Signalwirkung rezeptorvermittelt oder aktivitätsmodulierend wirkt, ist bisher ungeklärt.

Die Gehalte freier Sphingobasen werden streng reguliert, wobei der schnelle Einbau in komplexe SPL in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte. Komplexe SPL könnten ebenfalls eine wichtige Rolle in Signalprozessen und Mechanismen wie dem PCD übernehmen. Sphingolipide stellen einen erheblichen Teil der Membranlipide, sind essentiell in Lipid Rafts, stellen Proteinanker dar und beeinflussen die Fluidität und die Permeabilität von Membranen. Aufgrund dieser vielfältigen Funktionen sind auch verschiedene Rollen der detektierten freien Sphingobase t18:0 denkbar.

Die Erforschung des SPL-Einflusses auf mögliche Zielproteine innerhalb spezifischer Signalwege, wie etwa RBOHD oder CaDPK, könnte helfen, die Rolle der SPL in Abwehrreaktionen zu charakterisieren. Auch ist es nötig, mehr über die strukturellen Voraussetzungen zu erfahren, welche zu den putativen Signalwirkungen der SPL führen. Eine Aufgabe zukünftiger Arbeiten wird daher sein, neben weiteren komplexen SPL auch verwandte Metabolismusprodukte, etwa freie Fettsäuren, in die Untersuchungen einzubeziehen.

Welche Rolle spielen Lipide bzw. Membranen?

In den letzten Jahren hat sich immer mehr die Erkenntnis durchgesetzt, dass Lipide eine weitaus zentralere Rolle für Organismen spielen als die bloße Errichtung von semipermeablen Barrieren und Speicherlipiden. Lipide werden immer mehr als zentrale Signalmediatoren verstanden, was bereits zur Bildung vieler wissenschaftlicher Initiativen und Projekte (u.a. www.lipidsignalling.de; www.lipidmaps.org, www.lipidomicnet.org und des GK1342) geführt hat.

Lipide formen Doppelschichten mit spezifischen Eigenschaften und interagieren mit Membranproteinen oder Proteinkomplexen, meist als strukturelle Cofaktoren (GE *et al.* 2010). Membranen trennen nicht nur Kompartimente, sie sind auch selbst welche. An und in ihnen findet eine große Zahl der bekannten Metabolismusreaktionen statt. Mindestens 30% der Gene der meisten Zellen codieren für Proteine, die entweder mit Membranoberflächen assoziiert sind oder als periphere bzw. integrale Membranproteine eingebettet sind (GRANSETH *et al.* 2005).

Membranen üben dadurch eine erhebliche Kontrolle über die Aktivität vieler Proteine aus. Durch die enorme strukturelle Vielfalt und inhomogene Distribution verschiedenster Lipide können sie zu vielen biosynthetischen und metabolischen Prozessen beitragen. Sie vermitteln Zell-Zell Interaktionen, beeinflussen die Osmolarität, bilden aktive Oberflächen und formen Lipid Rafts. Die Bedeutung der Sphingolipide für Lipid Rafts ist ein aktuell stark beforschtes Gebiet und die in dieser Arbeit etablierten Methoden könnten helfen, zu ihrer Charakterisierung beizutragen.

Die relativen Gehalte der unterschiedlichen Lipide (u.a. SPL, Phospholipide, DAG und Galactolipide) beeinflussen auch die Krümmung einer Membran und damit die lateralen Interaktionen (MARSH 2007; BOOTH and CURNOW 2009). Die Komposition einer Membran beeinflusst also nicht nur deren Rigidität und Interaktion mit Proteinen, sondern auch die tatsächliche Form, was zu den vielfältigen Membranfunktionen beiträgt (CAHOON and LYNCH 1991; MAGGIO *et al.* 2006; GOÑI and ALONSO 2009; GE *et al.* 2010). Dies wird auch an den komplizierten Membranstrukturen von Chloroplasten und Mitochondrien deutlich. Die getrennte Analyse der Membranen verschiedener Kompartimente und Organellen stellt für zukünftige Forschungen daher eine große Herausforderung dar.

Membranen stellen ferner einen Pool an verschiedensten Molekülen zu Verfügung, darunter viele komplexe Sphingolipide und andere bekannte Signalpräkursoren, welche bei Bedarf, beispielsweise durch Lipasen, als Signalmoleküle freigesetzt werden können. Dabei bestehen oft Schnittstellen zwischen den einzelnen Molekülklassen. Um die Regulation und Funktion von SPL-Signalen verstehen zu können, müssen in näheren Betrachtungen daher auch die anderen Molekülklassen einbezogen werden.

In Zukunft wird man daher, neben Lipidomics, vielleicht auch von Membranomics sprechen (müssen).

Nur durch einen integrativen systembiologischen Ansatz wird es in Zukunft möglich sein, die komplexen Stoffwechsel-, Signal-, sowie Regulationsmechanismen eines Organismus umfassend verstehen zu können. Die fortschreitende Entschlüsselung zahlreicher Genome, der systematische Vergleich mit anderen Organismen und die Einbeziehung „neuer“ Ansätze, etwa von Epigenomics und umfassender Bioinformatik, bieten vielfältige Optionen für weitere Forschungen.

5. Literaturverzeichnis

- Abbas, H. K., Duke, S., Paul, R. N. and Riley, R. T.** (1995). "AAL-Toxin, A Potent Natural Herbicide which Disrupts Sphingolipid Metabolism." *Pesticide Science*: 181-187.
- Abbas, H. K., Tanaka, T., Duke, S. O., Porter, J. K., Wray, E. M., Sessions, A. E., Wang, E., Merrill, A. H. and Riley, R. T.** (1994). "Fumonisin- and AAL-Toxin-Induced Disruption of Sphingolipid Metabolism with Accumulation of Free Sphingoid Bases." *Plant Physiology* **106**: 1085-1093.
- Abramovitch, R. B., Anderson, J. C. and Martin, G. B.** (2006). "Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7**(8): 601-611.
- Adrain, C. and Martin, S. J.** (2001). "The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas." *Trends in Biochemical Sciences* **26**(6): 390-397.
- Alfano, J. R.** (2009). "Roadmap for future research on plant pathogen effectors." *Molecular Plant Pathology* **10**: 805-813.
- Allwood, J. W., Clarke, A., Goodacre, R. and Mur, L. A. J.** (2010). "Dual metabolomics: a novel approach to understanding plant-pathogen interactions." *Phytochemistry* **71**(5-6): 590-597.
- Alonso, J. M., et al.** (2003). "Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*." *Science* **301**(5633): 653-657.
- Alvarez, M. E., Pennell, R. I., Meijer, P.-J., Ishikawa, A., Dixon, R. A. and Lamb, C.** (1998). "Reactive Oxygen Intermediates Mediate a Systemic Signal Network in the Establishment of Plant Immunity." *Cell* **92**(6): 773-784.
- Ann, Q. and Adams, J.** (1993). "Structure-specific collision-induced fragmentations of ceramides cationized with alkali-metal ions." *Analytical Chemistry* **65**(1): 7-13.
- Asai, T., Stone, J. M., Heard, J. E., Kovtun, Y., Yorgey, P., Sheen, J. and Ausubel, F. M.** (2000). "Fumonisin B1-Induced Cell Death in Arabidopsis Protoplasts Requires Jasmonate-, Ethylene-, and Salicylate-Dependent Signaling Pathways." *The Plant Cell* **12**(October): 1823-1835.
- Bach, M.** (2010). "Untersuchungen der Signalfunktion von Sphingolipiden in der Pathogenantwort von *Arabidopsis thaliana*." *Institut für Pharmazeutische Biologie, Bayerische Julius-Maximilians-Universität Wuerzburg*; Bachelor Thesis
- Baker, C. J. and Orlandi, E. W.** (1995). "Active Oxygen in Plant Pathogenesis." *Annual Review of Phytopathology* **33**(1): 299-321.

- Bartke, N., Fischbeck, A. and Humpf, H. U.** (2006). "Analysis of sphingolipids in potatoes (*Solanum tuberosum* L.) and sweet potatoes (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) by reversed phase high-performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS)." *Molecular Nutrition & Food Research* **50**(12): 1201-1211.
- Bartke, N. and Hannun, Y. A.** (2009). "Bioactive sphingolipids: metabolism and function." *Journal Of Lipid Research* **50**(Supplement): S91-S96.
- Bauer, Z., Gómez-Gómez, L., Boller, T. and Felix, G.** (2001). "Sensitivity of Different Ecotypes and Mutants of *Arabidopsis thaliana* toward the Bacterial Elicitor Flagellin Correlates with the Presence of Receptor-binding Sites." *Journal of Biological Chemistry* **276**(49): 45669-45676.
- Berger, S., Benediktyova, Z., Matous, K., Bonfig, K., Mueller, M. J., Nedbal, L. and Roitsch, T.** (2006). "Visualization of dynamics of plant-pathogen interaction by novel combination of chlorophyll fluorescence imaging and statistical analysis: differential effects of virulent and avirulent strains of *P. syringae* and of oxylipins on *A. thaliana*." *Journal of Experimental Botany* **58**(4): 797-806.
- Bhat, R. and Panstruga, R.** (2005). "Lipid rafts in plants." *Planta* **223**(1): 5-19.
- Bielawski, J., Pierce, J. S., Snider, J. and Rembiesa, B.** (2009). "Comprehensive Quantitative Analysis of Bioactive Sphingolipids by High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry." *Methods in Molecular Biology - Lipidomics* **579**(Chapter 22): 443.
- Bielawski, J., Szulc, Z. M., Hannun, Y. A. and Bielawska, A.** (2006). "Simultaneous quantitative analysis of bioactive sphingolipids by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry." *Methods* **39**(2): 82-91.
- Bilger, W., Johnsen, T. and Schreiber, U.** (2001). "UV-excited chlorophyll fluorescence as a tool for the assessment of UV-protection by the epidermis of plants." *Journal of Experimental Botany* **52**(363): 2007-2014.
- Björkman, O. and Demmig, B.** (1987). "Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins." *Planta* **170**(4): 489-504.
- Bligh, E. G. and Dyer, W. J.** (1959). "A rapid method of total lipid extraction and purification." *Canadian journal of biochemistry and physiology* **37**(8): 911-917.
- Bonfig, K. B.** (2008). "Untersuchungen zur Rolle des Kohlenhydratmetabolismus während Pflanze-Pathogen-Interaktionen und der Keimlingsentwicklung." *Institut für Pharmazeutische Biologie, Bayerische Julius-Maximilians-Universität Wuerzburg*; PhD Thesis
- Bonfig, K. B., Schreiber, U., Gabler, A., Roitsch, T. and Berger, S.** (2006). "Infection with virulent and avirulent *P. syringae* strains differentially affects photosynthesis and sink metabolism in *Arabidopsis* leaves." *Planta* **225**(1): 1-12.
- Booth, P. J. and Curnow, P.** (2009). "Folding scene investigation: membrane proteins." *Current Opinion in Structural Biology* **19**(1): 8-13.

- Borner, G. H., et al.** (2005). "Analysis of detergent-resistant membranes in Arabidopsis. Evidence for plasma membrane lipid rafts." *Plant Physiology* **137**(1): 104-116.
- Bou Khalil, M., Hou, W., Zhou, H., Elisma, F., Swayne, L. A., Blanchard, A. P., Yao, Z., Bennett, S. A. and Figeys, D.** (2010). "Lipidomics era: Accomplishments and challenges." *Mass Spectrometry Reviews* **29**(6): 877-929.
- Bradford, M. M.** (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.
- Brandwagt, B. F., Mesbah, L. A., Takken, F. L. W., Laurent, P. L., Kneppers, T. J. A., Hille, J. and Nijkamp, H. J. J.** (2000). "A longevity assurance gene homolog of tomato mediates resistance to *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* toxins and fumonisin B₁." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**(9): 4961-4966.
- Bras, M., Queenan, B. and Susin, S. A.** (2005). "Programmed Cell Death via Mitochondria: Different Modes of Dying." *Biochemistry (Moscow)* **70**(5): 231-239.
- Brinkmann, V.** (2007). "Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: Mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology." *Pharmacology & Therapeutics* **115**(1): 84-105.
- Brodersen, P., Malinovsky, F. G., Hematy, K., Newman, M.-A. and Mundy, J.** (2005). "The Role of Salicylic Acid in the Induction of Cell Death in Arabidopsis *acd11*." *Plant Physiology* **138**(2): 1037-1045.
- Brodersen, P., Petersen, M., Pike, H. M., Olszak, B., Skov, S., Odum, N., Jorgensen, L. B., Brown, R. E. and Mundy, J.** (2002). "Knockout of Arabidopsis *ACCELERATED-CELL-DEATH11* encoding a sphingosine transfer protein causes activation of programmed cell death and defense." *Genes and Development* **16**(4): 490-502.
- Bromley, P. E., Li, Y. O., Murphy, S. M., Sumner, C. M. and Lynch, D. V.** (2003). "Complex sphingolipid synthesis in plants: characterization of inositolphosphorylceramide synthase activity in bean microsomes." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **417**(2): 219-226.
- Cahoon, E. B. and Lynch, D. V.** (1991). "Analysis of Glucocerebrosides of Rye (*Secale cereale* L. cv Puma) Leaf and Plasma Membrane." *Plant Physiology* **95**(1): 58-68.
- Caligan, T. B., Peters, K., Ou, J., Wang, E., Saba, J. and Merrill, A. H., Jr.** (2000). "A high-performance liquid chromatographic method to measure sphingosine 1-phosphate and related compounds from sphingosine kinase assays and other biological samples." *Analytical Biochemistry* **281**(1): 36-44.
- Castro, A., Lemos, C., Falcao, A., Glass, N. L. and Videira, A.** (2008). "Increased Resistance of Complex I Mutants to Phytosphingosine-induced Programmed Cell Death." *Journal of Biological Chemistry* **283**(28): 19314-19321.
- Chakravarthy, S., Velásquez, A. C., Ekengren, S. K., Collmer, A. and Martin, G. B.** (2010). "Identification of *Nicotiana benthamiana* Genes Involved in Pathogen-Associated Molecular Pattern-Triggered Immunity." *Molecular plant-microbe interactions* **23**(6): 715-726.

- Chalfant, C. E. and Spiegel, S.** (2005). "Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: expanding roles in cell signaling." *Journal of Cell Science* **118**(Pt 20): 4605-4612.
- Chen, M., Markham, J. E., Dietrich, C. R., Jaworski, J. G. and Cahoon, E. B.** (2008). "Sphingolipid Long-Chain Base Hydroxylation Is Important for Growth and Regulation of Sphingolipid Content and Composition in *Arabidopsis*." *The Plant Cell* **20**(7): 1862-1878.
- Cheng, D. D., Jia, Y. J., Gao, H. Y., Zhang, L. T., Zhang, Z. S., Xue, Z. C. and Meng, Q. W.** (2010). "Characterization of the programmed cell death induced by metabolic products of *Alternaria alternata* in tobacco BY-2 cells." *Physiologia Plantarum*: Accepted Article.
- Cheng, J., Chio, T.-s. P. L.-c., Fischl, A. S. and Ye, X. S.** (2003). "Induction of Apoptosis by Sphingoid Long-Chain Bases in." *Microbiology* **23**(1): 163-177.
- Christensen, D. D.** (2003). "J.L.W. Thudichum, 1829-1901." *The American Journal of Psychiatry* **160**(3): 459.
- Coursol, S., Fan, L. M., Le Stunff, H., Spiegel, S., Gilroy, S. and Assmann, S. M.** (2003). "Sphingolipid signalling in *Arabidopsis* guard cells involves heterotrimeric G proteins." *Nature* **423**(6940): 651-654.
- Coursol, S., Le Stunff, H., Lynch, D. V., Gilroy, S., Assmann, S. M. and Spiegel, S.** (2005). "Arabidopsis sphingosine kinase and the effects of phytosphingosine-1-phosphate on stomatal aperture." *Plant Physiology* **137**(2): 724-737.
- Cowart, L. A., Shotwell, M., Worley, M. L., Richards, A. J., Montefusco, D. J., Hannun, Y. A. and Lu, X.** (2010). "Revealing a signaling role of phytosphingosine-1-phosphate in yeast." *Molecular systems biology* **6**(349): 349-349.
- Cubbon, S., Antonio, C., Wilson, J. and Thomas-Oates, J.** (2009). "Metabolomic applications of HILIC–LC–MS." *Mass Spectrometry Reviews* **29**(5): 671-684.
- Cuvillier, O., Edsall, L. and Spiegel, S.** (2000). "Involvement of Sphingosine in Mitochondria-dependent Fas-induced Apoptosis of Type II Jurkat T Cells." *Journal of Biological Chemistry* **275**(21): 15691-15700.
- da Silva, A., Sperling, P., Horst, W., Franke, S., Ott, C., Becker, D., Stas, A., Lorz, H. and Heinz, E.** (2006). "A possible role of sphingolipids in the aluminium resistance of yeast and maize." *Journal of Plant Physiology* **163**(1): 26-38.
- Dangl, J. L. and Jones, J. D. G.** (2001). "Plant pathogens and integrated defence responses to infection." *Nature* **411**: 826.
- Danon, A., Miersch, O., Felix, G., Camp, R. G. L. and Apel, K.** (2005). "Concurrent activation of cell death-regulating signaling pathways by singlet oxygen in *Arabidopsis thaliana*." *The Plant Journal* **41**(1): 68-80.
- Delgado, A., Casas, J., Llebaria, A., Abad, J. and Fabrias, G.** (2006). "Inhibitors of sphingolipid metabolism enzymes." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1758**(12): 1957-1977.

- Desai, N. N., Carlson, R. O., Mattie, M. E., Olivera, A., Buckley, N. E., Seki, T., Brooker, G. and Spiegel, S.** (1993). "Signaling pathways for sphingosylphosphorylcholine-mediated mitogenesis in Swiss 3T3 fibroblasts." *The Journal of Cell Biology* **121**(6): 1385-1395.
- Dickson, R. C.** (1998). "Sphingolipid functions in *Saccharomyces cerevisiae*: Comparison to Mammals." *Annual Review of Biochemistry* **67**: 27-48.
- Doonan, F.** (2008). "Morphological assessment of apoptosis." *Methods* **44**(3): 200-204.
- Dunn, T. M., Lynch, D. V., Michaelson, L. V. and Napier, J.** (2004). "A Post-genomic Approach to Understanding Sphingolipid Metabolism in *Arabidopsis thaliana*." *Annals of Botany* **93**(5): 483-497.
- Eibl, G., Bernardo, K., Koal, T., Ramsay, S. L., Weinberger, K. M. and Graber, A.** (2008). "Isotope correction of mass spectrometry profiles." *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **22**(14): 2248-2252.
- Ejsing, C. S., Sampaio, J. L., Surendranath, V., Duchoslav, E., Ekroos, K., Klemm, R. W., Simons, K. and Shevchenko, A.** (2009). "Global analysis of the yeast lipidome by quantitative shotgun mass spectrometry." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 2136-2141.
- Felix, G., Duran, J. D., Volko, S. and Boller, T.** (1999). "Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin." *The Plant Journal* **18**(3): 265-276.
- Freeman, B. C. and Beattie, G. A.** (2009). "Bacterial Growth Restriction During Host Resistance to." *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**(7): 857-867.
- Futerman, A. and Hannun, Y.** (2004). "The complex life of simple sphingolipids." *EMBO reports* **5**(8): 777-782.
- Gadjev, I., et al.** (2006). "Transcriptomic footprints disclose specificity of reactive oxygen species signaling in Arabidopsis." *Plant Physiology* **141**(2): 436-445.
- Garton, S., Michaelson, L. V., Beaudoin, F., Beale, M. H. and Napier, J. A.** (2003). "The dihydroceramide desaturase is not essential for cell viability in *Schizosaccharomyces pombe*." *FEBS Letters* **538**(1-3): 192-196.
- Ge, C., Georgiev, A., Ohman, A., Wieslander, A. and Kelly, A.** (2010). "Tryptophan residues promote membrane association for a plant lipid glycosyltransferase involved in phosphate stress" *Journal of Biological Chemistry* doi: **10.1074/jbc.M110.138495**.
- Godoy, G., Steadman, J. R., Dickman, M. B. and Dam, R.** (1990). "Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*." *Physiological and Molecular Plant Pathology* **37**(3): 179-191.
- Gomez-Gomez, L. and Boller, T.** (2002). "Flagellin perception: a paradigm for innate immunity." *Trends in Plant Science* **7**: 251.
- Goni, F. and Alonso, A.** (2006). "Biophysics of sphingolipids I. Membrane properties of sphingosine, ceramides and other simple sphingolipids." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1758**(12): 1902-1921.

- Goñi, F. M. and Alonso, A.** (2009). "Effects of ceramide and other simple sphingolipids on membrane lateral structure." *Biochimica et biophysica acta* **1788**: 169-177.
- Granseth, E., Daley, D. O., Rapp, M., Melén, K. and von Heijne, G.** (2005). "Experimentally Constrained Topology Models for 51,208 Bacterial Inner Membrane Proteins." *Journal of Molecular Biology* **352**(3): 489-494.
- Grant, M. and Lamb, C.** (2006). "Systemic immunity." *Current Opinion in Plant Biology* **9**(4): 414-420.
- Greenberg, J. T.** (1996). "Programmed cell death: away of life for plants." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**(22): 12094-12097.
- Greenberg, J. T., Silverman, F. P. and Liang, H.** (2000). "Uncoupling salicylic acid-dependent cell death and defense-related responses from disease resistance in the Arabidopsis mutant *acd5*." *Genetics* **156**(1): 341-350.
- Greenberg, J. T. and Yao, N.** (2004). "The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions." *Cellular Microbiology* **6**(3): 201-211.
- Gu, M., Kerwin, J. L., Watts, J. D. and Aebersold, R.** (1997). "Ceramide Pro ling of Complex Lipid Mixtures by Electrospray Ionization Mass Spectrometry." *Lipids* **356**(244): 347-356.
- Gulbins, E.** (2003). "Regulation of death receptor signaling and apoptosis by ceramide." *Pharmacological Research* **47**(5): 393-399.
- Guo, M., Tian, F., Wamboldt, Y. and Alfano, J. R.** (2009). "The Majority of the Type III Effector Inventory of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 Can Suppress Plant Immunity." *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**(9): 1069-1080.
- Guo, X. and Stotz, H. U.** (2007). "Defense Against *Sclerotinia sclerotiorum* in Arabidopsis Is Dependent on Jasmonic Acid, Salicylic Acid, and Ethylene Signaling." *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**(11): 1384-1395.
- Hait, N. C., Oskeritzian, C. A., Paugh, S. W., Milstien, S. and Spiegel, S.** (2006). "Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases." *Biochimica et Biophysica Acta* **1758**(12): 2016-2026.
- Han, X.** (2002). "Characterization and Direct Quantitation of Ceramide Molecular Species from Lipid Extracts of Biological Samples by Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry." *Analytical Biochemistry* **302**(2): 199-212.
- Han, X. and Gross, R. W.** (2005). "Shotgun lipidomics: Electrospray ionization mass spectrometric analysis and quantitation of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples." *Mass Spectrometry Reviews* **24**(3): 367-412.
- Han, X. and Jiang, X.** (2009). "A review of lipidomic technologies applicable to sphingolipidomics and their relevant applications." *European journal of lipid science and technology : EJLST* **111**(1): 39-52.
- Hannun, Y. A. and Luberto, C.** (2000). "Ceramide in the eukaryotic stress response." *Trends in Cell Biology* **10**(2): 73-80.

- Hannun, Y. A., Luberto, C. and Argraves, K. M.** (2001). "Enzymes of Sphingolipid Metabolism: From Modular to Integrative Signaling." *Biochemistry* **40**(16): 4893-4903.
- Hannun, Y. A. and Obeid, L. M.** (2008). "Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**(2): 139-150.
- Hartlova, A., Cervený, L., Hubalek, M., Krocova, Z. and Stulik, J.** (2010). "Membrane rafts: a potential gateway for bacterial entry into host cells." *Microbiology and immunology* **54**(4): 237-245.
- Haynes, C. A., Allegood, J. C., Park, H. and Sullards, M. C.** (2009). "SPHINGOLIPIDOMICS: METHODS FOR THE COMPREHENSIVE ANALYSIS OF SPHINGOLIPIDS." *Journal of Chromatography B* **877**(26): 2696-2708.
- Heath, M. C.** (2000). "Hypersensitive response-related death." *Plant Molecular Biology* **44**(3): 321-334.
- Hill, M. M., Adrain, C. and Martin, S. J.** (2003). "Portrait of a Killer: The Mitochondrial Apoptosome Emerges From the Shadows." *molecular interventions* **3**(1): 19-26.
- Hoeberichts, F. A. and Woltering, E. J.** (2003). "Multiple mediators of plant programmed cell death: interplay of conserved cell death mechanisms and plant-specific regulators." *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **25**(1): 47-57.
- Hogenhout, S. A., Van der Hoorn, R. A. L., Terauchi, R. and Kamoun, S.** (2009). "Emerging Concepts in Effector Biology of Plant-Associated Organisms." *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**(2): 115-122.
- Hu, W., Xu, R., Sun, W., Szulc, Z. M., Bielawski, J., Obeid, L. M. and Mao, C.** (2010). "Alkaline ceramidase 3 (ACER3) hydrolyzes unsaturated long-chain ceramides and its downregulation inhibits cell proliferation and apoptosis." *The Journal of biological chemistry* **3**(17): 1-23.
- Huwiler, A., Kolter, T., Pfeilschifter, J. and Sandhoff, K.** (2000). "Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1485**(2-3): 63-99.
- Hwang, O., Kim, G., Jang, Y. J., Kim, S. W., Choi, G., Choi, H. J., Jeon, S. Y., Lee, D. G. and Lee, J. D.** (2001). "Synthetic Phytoceramides Induce Apoptosis with Higher Potency than Ceramides." *Molecular pharmacology* **59**(5): 1249-1255.
- Imai, H., Ohnishi, M., Hotsubo, K., Kojima, M. and Ito, S.** (1997). "Sphingoid Base Composition of Cerebrosides from Plant Leaves." *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **61**(2): 351-353.
- Imai, H., Ohnishi, M., Kinoshita, M., Kojima, M. and Ito, S.** (1995). "Structure and Distribution of Cerebroside Containing Unsaturated Hydroxy Fatty Acids in Plant Leaves." *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **59**(7): 1309-1313.

- Isaac, G., Bylund, D., Månsson, J.-E., Markides, K. E. and Bergquist, J. (2003). "Analysis of phosphatidylcholine and sphingomyelin molecular species from brain extracts using capillary liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry." *Journal of Neuroscience Methods* **128**(1-2): 111-119.
- Jeworutzki, E., Roelfsema, M. R. G., Anschütz, U., Krol, E., Elzenga, J. T. M., Felix, G., Boller, T., Hedrich, R. and Becker, D. (2010). "Early signaling through the Arabidopsis pattern recognition receptors FLS2 and EFR involves Ca²⁺-associated opening of plasma membrane anion channels." *The Plant journal*: 367-378.
- Jones, J. D. G. and Dangl, J. L. (2006). "The plant immune system." *Nature* **444**(7117): 323-329.
- Jung, H. W., Tschaplinski, T. J., Wang, L., Glazebrook, J. and Greenberg, J. T. (2009). "Priming in systemic plant immunity." *Science* **324**(5923): 89-91.
- Kahn, W. A., Mascarella, S. W., Lewin, A. H., Wyrick, C. D., Carroll, F. I. and Hannun, Y. A. (1991). "Use of D-erythro-sphingosine as a pharmacological inhibitor of protein kinase C in human platelets." *Biochemical Journal* **278**(2): 387-392.
- Karlsson, A. Å., Michélsen, P. and Odham, G. (1998). "Molecular species of sphingomyelin: determination by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry with electrospray and high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization." *Journal of Mass Spectrometry* **33**(12): 1192-1198.
- Katagiri, F., Thilmony, R. and He, S. Y. (2002). "The Arabidopsis Thaliana-Pseudomonas Syringae Interaction." *The Arabidopsis Book* **20**(1): 1-35.
- Kawai-Yamada, M., Otori, Y. and Uchimiya, H. (2004). "Dissection of Arabidopsis Bax Inhibitor-1 Suppressing Bax-, Hydrogen Peroxide-, and Salicylic Acid-Induced Cell Death." *Plant Cell* **16**(January): 21-32.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. and Currie, A. R. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *British Journal of Cancer* **26**(4): 239-257.
- King, E. O., Ward, M. K. and Raney, D. E. (1954). "Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein." *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **44**(2): 301-307.
- Kitatani, K., Idkowiak-Baldys, J. and Hannun, Y. A. (2008). "The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling." *Cellular Signalling* **20**(6): 1010-1018.
- Krause, G. H. and Weis, E. (1991). "Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**(1): 313-349.
- Kuroyanagi, M. (2005). "Vacuolar Processing Enzyme Is Essential for Mycotoxin-induced Cell Death in Arabidopsis thaliana." *Journal of Biological Chemistry* **280**(38): 32914-32920.
- La Camera, S., Balagué, C., Göbel, C., Geoffroy, P., Legrand, M., Feussner, I., Roby, D. and Heitz, T. (2009). "The Arabidopsis Patatin-Like Protein 2 (PLP2) Plays an Essential Role in Cell Death Execution and Differentially Affects Biosynthesis of Oxylipins and Resistance to Pathogens." *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**(4): 469-481.

- Lam, E.** (2004). "Controlled cell death, plant survival and development." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **5**(4): 305-315.
- Lam, E. and Fukuda, H.** (2000). "Hypersensitive response-related death." *Plant Molecular Biology*: 321-334.
- Lam, E., Kato, N. and Lawton, M.** (2001). "Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response." *Nature* **411**(6839): 848-853.
- Le Stunff, H., Galve-Roperh, I., Peterson, C., Milstien, S. and Spiegel, S.** (2002). "Sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase in regulation of sphingolipid metabolism and apoptosis." *The Journal of Cell Biology* **158**(6): 1039-1049.
- Le Stunff, H., Giussani, P., Maceyka, M., Lépine, S., Milstien, S. and Spiegel, S.** (2007). "Recycling of Sphingosine Is Regulated by the Concerted Actions of Sphingosine-1-phosphate Phosphohydrolase 1 and Sphingosine Kinase 2." *Journal of Biological Chemistry* **282**(47): 34372-34380.
- Lee, S., Williams, M. and Blair, I.** (2005). "Targeted chiral lipidomics analysis." *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* **77**(1-4): 141-157.
- Lee, Y. H.** (2005). "Use of Dominant-negative HrpA Mutants to Dissect Hrp Pilus Assembly and Type III Secretion in *Pseudomonas syringae* pv. tomato." *Journal of Biological Chemistry* **280**(22): 21409-21417.
- Lennon, S. V., Martin, S. J. and Cotter, T. G.** (1991). "Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli." *Cell Proliferation* **24**(2): 203-214.
- Lester, R.** (2001). "High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Molecular Species of Sphingolipid-Related Long Chain Bases and Long Chain Base Phosphates in *Saccharomyces cerevisiae* after Derivatization with 6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl Carbamate." *Analytical Biochemistry* **298**(2): 283-292.
- Liang, H., Yao, N., Song, J. T., Luo, S., Lu, H. and Greenberg, J. T.** (2003). "Ceramide modulate programmed cell death in plants." *Genes and Development* **17**(21): 2636-2641.
- Liebisch, G., Drobnik, W., Reil, M., Arnecke, R., Roscher, A. and Schmitz, G.** (1999). "Quantitative measurement of different ceramide species from crude cellular extracts by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS)." *Journal Of Lipid Research* **40**: 1539-1546.
- Liebisch, G., Lieser, B., Rathenber, J., Drobnik, W. and Schmitz, G.** (2004). "High-throughput quantification of phosphatidylcholine and sphingomyelin by electrospray ionization tandem mass spectrometry coupled with isotope correction algorithm." *Lipids* **1686**: 108-117.
- Lin, S.-S., Martin, R., Mongrand, S., Vandenabeele, S., Chen, K.-C., Jang, I.-C. and Chua, N.-H.** (2008). "RING1 E3 ligase localizes to plasma membrane lipid rafts to trigger FB1-induced programmed cell death in Arabidopsis." *The Plant Journal* **56**(4): 550-561.
- Lockshin, R. A. and Zakeri, Z.** (2004). "Apoptosis, autophagy, and more." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **36**(12): 2405-2419.

- López-Montero, I., Monroy, F., Vélez, M. and Devaux, P. F.** (2010). "Ceramide: From lateral segregation to mechanical stress." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1798**(7): 1348-1356.
- Lynch, D. V., Chen, M. and Cahoon, E. B.** (2009). "Lipid signaling in Arabidopsis: no sphingosine? No problem!" *Trends in Plant Science*: 463-466.
- Lynch, D. V. and Dunn, T. M.** (2004). "An introduction to plant sphingolipids and a review of recent advances in understanding their metabolism and function." *New Phytologist* **161**(3): 677-702.
- Maceyka, M., Payne, S. G., Milstien, S. and Spiegel, S.** (2002). "Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis." *Biochimica et Biophysica Acta* **1585**(2-3): 193-201.
- Maggio, B., Fanani, M., Rosetti, C. and Wilke, N.** (2006). "Biophysics of sphingolipids II. Glycosphingolipids: An assortment of multiple structural information transducers at the membrane surface." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1758**(12): 1922-1944.
- Mano, N., Oda, Y. and Yamada, K.** (1997). "Simultaneous Quantitative Determination Method for Sphingolipid Metabolites by Liquid Chromatography/ Ion-spray Ionization Tandem Mass Spectrometry." *Analytical Biochemistry* **300**(244): 291-300.
- Markham, J. E. and Jaworski, J. G.** (2007). "Rapid measurement of sphingolipids from *Arabidopsis thaliana* by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry." *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **21**: 1304-1314.
- Markham, J. E., Li, J., Cahoon, E. B. and Jaworski, J. G.** (2006). "Separation and Identification of Major Plant Sphingolipid Classes from Leaves." *Journal of Biological Chemistry* **281**(32): 22684-22694.
- Marsh, D.** (2007). "Lateral Pressure Profile, Spontaneous Curvature Frustration, and the Incorporation and Conformation of Proteins in Membranes." *Biophysical Journal* **93**(11): 3884-3899.
- Maxwell, K. and Johnson, G. N.** (2000). "Chlorophyll fluorescence - a practical guide." *Journal of Experimental Botany* **51**(345): 659-668.
- McCabe, P. F., Levine, A., Meijer, P. J., Tapon, N. A. and Pennell, R. I.** (1997). "A programmed cell death pathway activated in carrot cells cultured at low cell density." *The Plant Journal* **12**(2): 267-280.
- McDowell, J. M. and Dangel, J. L.** (2000). "Signal transduction in the plant innate immune response." *Trends in Biochemical Sciences* **25**: 79.
- Merrill, A. H., Jr.** (2002). "De Novo Sphingolipid Biosynthesis: A Necessary, but Dangerous, Pathway." *Journal of Biological Chemistry* **277**(29): 25843-25846.
- Merrill, A. H., Jr., Caligan, T. B., Wang, E., Peters, K. and Ou, J.** (2000). "Analysis of sphingoid bases and sphingoid base 1-phosphates by high-performance liquid chromatography." *Methods in Enzymology* **312**: 3-9.

- Merrill, A. H., Jr., Stokes, T. H., Momin, A., Park, H., Portz, B. J., Kelly, S., Wang, E., Sullards, M. C. and Wang, M. D.** (2009). "Sphingolipidomics: a valuable tool for understanding the roles of sphingolipids in biology and disease." *Journal Of Lipid Research* **50**(Supplement): S97-102.
- Merrill, A. H., Jr., Sullards, M., Allegood, J., Kelly, S. and Wang, E.** (2005). "Sphingolipidomics: High-throughput, structure-specific, and quantitative analysis of sphingolipids by liquid chromatography tandem mass spectrometry." *Methods* **36**(2): 207-224.
- Merrill, A. H., Jr., van Echten, G., Wang, E. and Sandhoff, K.** (1993). "Fumonisin B1 Inhibits Sphingosine (Sphinganine) N-Acyltransferase and." *Molecular Biology* **268**(36): 27299-27306.
- Merrill, A. H., Jr., Wang, E. and Mullins, R. E.** (1988). "Kinetics of long-chain (sphingoid) base biosynthesis in intact LM cells: effects of varying the extracellular concentrations of serine and fatty acid precursors of this pathway." *Biochemistry* **27**(1): 340-345.
- Merrill, A. H., Jr., Wang, M., Park, M. and Sullards, M.** (2007). "(Glyco)sphingolipidology: an amazing challenge and opportunity for systems biology." *Trends in Biochemical Sciences* **32**(10): 457-468.
- Michaelson, L. V., et al.** (2008). "Functional Characterization of a Higher Plant Sphingolipid delta-4-Desaturase: Defining the Role of Sphingosine and Sphingosine-1-Phosphate in Arabidopsis." *Plant Physiology* **149**(1): 487-498.
- Milhas, D., Clarke, C. J. and Hannun, Y. A.** (2010). "Sphingomyelin metabolism at the plasma membrane: implications for bioactive sphingolipids." *FEBS Letters* **584**(9): 1887-1894.
- Miller, G., Schlauch, K., Tam, R., Cortes, D., Torres, M. A., Shulaev, V., Dangl, J. L. and Mittler, R.** (2009). "The Plant NADPH Oxidase RBOHD Mediates Rapid Systemic Signaling in Response to Diverse Stimuli." *Science Signaling* **2**(84): ra45-.
- Millet, Y. a., Danna, C. H., Clay, N. K., Songnuan, W., Simon, M. D., Werck-Reichhart, D. and Ausubel, F. M.** (2010). "Innate immune responses activated in Arabidopsis roots by microbe-associated molecular patterns." *The Plant cell* **22**(3): 973-990.
- Moeder, W. and Yoshioka, K.** (2008). "Lesion mimic mutants." *Molecular and Cellular Biology* **3**(10): 764-767.
- Montillet, J.-L., et al.** (2005). "Fatty Acid Hydroperoxides and H₂O₂ in the Execution of Hypersensitive Cell Death in Tobacco Leaves." *Plant Physiology* **138**(3): 1516-1526.
- Montillet, J. L., et al.** (2004). "The upstream oxylipin profile of *Arabidopsis thaliana*: a tool to scan for oxidative stresses." *The Plant Journal* **40**(3): 439-451.
- Morel, J. and Dangl, J. L.** (1997). "The hypersensitive response and the induction of cell death in plants." *Cell Death and Differentiation* **4**(8): 671-683.
- Moro, C., et al.** (2009). "Influence of Gender, Obesity, and Muscle Lipase Activity on Intramyocellular Lipids in Sedentary Individuals." *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **94**(9): 3440-3447.

- Mosblech, A., König, S., Stenzel, I., Grzeganeck, P., Feussner, I. and Heilmann, I.** (2008). "Phosphoinositide and Inositolpolyphosphate Signalling in Defense Responses of *Arabidopsis thaliana* Challenged by Mechanical Wounding." *Molecular Plant* **1**(2): 249-261.
- Mueller, S.** (2009). "Wirkspektrum und Signaltransduktionsmechanismus von oxidierten Lipiden in *Arabidopsis thaliana*." *Intitut für Pharmazeutische Biologie, Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg*; PhD Thesis
- Mur, L. A. J., Kenton, P., Lloyd, A. J., Ougham, H. and Prats, E.** (2008). "The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know?" *Journal of Experimental Botany* **59**(3): 501-520.
- Murashige, T. and Skoog, F.** (1962). "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures." *Physiologia Plantarum* **15**(3): 473-497.
- Nagano, M., Ihara-Ohori, Y., Imai, H., Inada, N., Fujimoto, M., Tsutsumi, N., Uchimiya, H. and Kawai-Yamada, M.** (2009). "Functional association of cell death suppressor, Arabidopsis Bax inhibitor-1, with fatty acid 2-hydroxylation through cytochrome *b₅*." *The Plant Journal* **58**(1): 122-134.
- Napier, J. A., Michaelson, L. V. and Dunn, T. M.** (2002). "A new class of lipid desaturase central to sphingolipid biosynthesis and signalling." *Trends in Plant Science* **7**(11): 475-478.
- Ng, C.** (2001). "Sphingolipid-mediated Signalling in Plants." *Annals of Botany* **88**(6): 957-965.
- Ng, C. K., Carr, K., McAinsh, M. R., Powell, B. and Hetherington, A. M.** (2001). "Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate." *Nature* **410**(6828): 596-599.
- Nilsson, Å.** (2007). "Sphingolipids in the gut? Which are the important issues?" *European Journal of Lipid Science and Technology* **109**(10): 971-976.
- Nimchuk, Z., Eulgem, T., Holt III, B. F. and Dangl, J. L.** (2003). "RECOGNITION AND RESPONSE IN THE PLANT IMMUNE SYSTEM." *Annual Review of Genetics* **37**(1): 579-609.
- Nishikawa, M., Hosokawa, K., Ishiguro, M., Minamioka, H., Tamura, K., Hara-Nishimura, I., Takahashi, Y., Shimazaki, K.-i. and Imai, H.** (2008). "Degradation of Sphingoid Long-Chain Base 1-Phosphates (LCB-1Ps): Functional Characterization and Expression of AtDPL1 Encoding LCB-1P Lyase Involved in the Dehydration Stress Response in Arabidopsis." *Plant and Cell Physiology* **49**(11): 1758-1763.
- Niu, Y., Chen, K., Wang, J., Liu, X., Qin, H., Zhang, A. and Wang, D.** (2007). "Molecular and Functional Characterization of Sphingosine-1-Phosphate Lyase Homolog from Higher Plants." *Journal of Integrative Plant Biology* **49**(3): 323-335.
- Obeid, L. M., Okamoto, Y. and Mao, C.** (2002). "Yeast sphingolipids: metabolism and biology." *Biochimica et Biophysica Acta* **1585**(2-3): 163-171.
- Ogretmen, B. and Hannun, Y. A.** (2004). "Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment." *Nature Reviews Cancer* **4**: 604-616.

- Oh, H. S., Park, D. H. and Collmer, A. C.** (2010). "Components of the *Pseudomonas syringae* type III secretion system can suppress and may elicit plant innate immunity." *Molecular Plant-Microbe Interactions* **teract**: 727-739.
- Orozco-Cardenas, M. and Ryan, C. A.** (1999). "Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**(11): 6553-6557.
- Panstruga, R., Parker, J. E. and Schulze-Lefert, P.** (2009). "SnapShot: Plant Immune Response Pathways." *Cell* **136**(5): 978.e971-978.e973.
- Pata, M. O., Hannun, Y. A. and Ng, C. K. Y.** (2009). "Plant sphingolipids: decoding the enigma of the Sphinx." *New Phytologist* **185**(3): 611-630.
- Paugh, S. W., et al.** (2008). "A selective sphingosine kinase 1 inhibitor integrates multiple molecular therapeutic targets in human leukemia." *Blood* **112**(4): 1382-1391.
- Peer, M., Stegmann, M., Mueller, M. J. and Waller, F.** (2010). "*Pseudomonas syringae* infection triggers *de novo* synthesis of phytosphingosine from sphinganine in *Arabidopsis thaliana*." *FEBS Letters* **584**(18): 4053-4056.
- Pennell, R. I. and Lamb, C.** (1997). "Programmed Cell Death in Plants." *Plant Cell* **9**(7): 1157-1168.
- Petersen, N. H. T., McKinney, L. V., Pike, H., Hofius, D., Zakaria, A., Brodersen, P., Petersen, M., Brown, R. E. and Mundy, J.** (2008). "Human GLTP and mutant forms of ACD11 suppress cell death in the *Arabidopsis acd11* mutant " *FEBS Journal* **275**(17): 4378-4388.
- Pétremand, J. and Widmann, C.** (2008). "Lipid metabolism: sphingolipids- from membrane constituents to signaling molecules that control cell-to-cell communications." *Current Opinion in Lipidology* **19**(6): 620-621.
- Pettus, B. J., Bielawska, A., Kroesen, B. J., Moeller, P. D., Szulc, Z. M., Hannun, Y. A. and Busman, M.** (2003). "Observation of different ceramide species from crude cellular extracts by normal-phase high-performance liquid chromatography coupled to atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry." *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **17**(11): 1203-1211.
- Pettus, B. J., Chalfant, C. E. and Hannun, Y. A.** (2002). "Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives." *Biochimica et Biophysica Acta* **1585**(2-3): 114-125.
- Pogány, M., et al.** (2009). "Dual Roles of Reactive Oxygen Species and NADPH Oxidase RBOHD in an *Arabidopsis-Alternaria* Pathosystem." *Plant Physiology* **151**(3): 1459-1475.
- Posse de Chaves, E. and Sipione, S.** (2010). "Sphingolipids and gangliosides of the nervous system in membrane function and dysfunction." *FEBS Letters* **584**(9): 1748-1759.
- Prieschl, E. E. and Baumruker, T.** (2000). "Sphingolipids: second messengers, mediators and raft constituents in signaling." *European Journal of Immunology*(11): 555-560.

- Pruett, S. T., Bushnev, A., Hagedorn, K., Adiga, M., Haynes, C. A., Sullards, M. C., Liotta, D. C. and Merrill, A. H.** (2008). "Thematic Review Series: Sphingolipids. Biodiversity of sphingoid bases ("sphingosines") and related amino alcohols." *The Journal of Lipid Research* **49**(8): 1621-1639.
- Pyne, N. J. and Pyne, S.** (2010). "Sphingosine 1-phosphate and cancer." *Nature Reviews Cancer* **10**(7): 489-503.
- Quartacci, M. F., Glišić, O., Stevanović, B. and Navari-Izzo, F.** (2002). "Plasma membrane lipids in the resurrection plant *Ramonda serbica* following dehydration and rehydration." *Journal of Experimental Botany* **53**(378): 2159-2166.
- Radin, N. S.** (2004). "POLY-DRUG CANCER THERAPY BASED ON CERAMIDE." *Experimental Oncology* **26**(1): 3-10.
- Ramstedt, B. and Slotte, J.** (2006). "Sphingolipids and the formation of sterol-enriched ordered membrane domains." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1758**(12): 1945-1956.
- Reape, T. J. and McCabe, P. F.** (2008). "Apoptotic-like programmed cell death in plants." *New Phytologist* **180**(1): 13-26.
- Reape, T. J., Molony, E. M. and McCabe, P. F.** (2008). "Programmed cell death in plants: distinguishing between different modes." *Journal of Experimental Botany* **59**(3): 435-444.
- Richael, C. and Gilchrist, D.** (1999). "The hypersensitive response: A case of hold or fold?" *Physiological and Molecular Plant Pathology* **55**(1): 5-12.
- Richberg, M. H., Aviv, D. H. and Dangl, J. L.** (1998). "Dead cells do tell tales." *Current Opinion in Plant Biology* **1**(6): 480-485.
- Riethmuller, J., Riehle, A., Grassme, H. and Gulbins, E.** (2006). "Membrane rafts in host-pathogen interactions." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1758**(12): 2139-2147.
- Roudier, F., et al.** (2010). "Very-Long-Chain Fatty Acids Are Involved in Polar Auxin Transport and Developmental Patterning in *Arabidopsis*." *The Plant Cell* **22**(2): 364-375.
- Ryan, P. R., Liu, Q., Sperling, P., Dong, B., Franke, S. and Delhaize, E.** (2007). "A Higher Plant delta8 Sphingolipid Desaturase with a Preference for (Z)-Isomer Formation Confers Aluminum Tolerance to Yeast and Plants." *Plant Physiology* **144**(4): 1968-1977.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Ehrlich, H. A.** (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* **239**: 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R.** (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74**(12): 5463-5467.

- Scherer, M., Leuthäuser-Jaschinski, K., Ecker, J., Schmitz, G. and Liebisch, G.** (2010). "A rapid and quantitative LC-MS/MS method to profile sphingolipids." *Journal Of Lipid Research* **51**(7): 2001-2011.
- Schmitz, G. and Langmann, T.** (2006). "The lipid flux rheostat: implications of lipid trafficking pathways." *Journal of Molecular Medicine* **84**(4): 262-265.
- Shaner, R. L., Allegood, J. C., Park, H., Wang, E., Kelly, S., Haynes, C. A., Sullards, M. C. and Merrill, A. H., Jr.** (2009). "Quantitative analysis of sphingolipids for lipidomics using triple quadrupole and quadrupole linear ion trap mass spectrometers." *Journal Of Lipid Research* **50**: 1692-1707.
- Shi, L., et al.** (2007). "Involvement of sphingoid bases in mediating reactive oxygen intermediate production and programmed cell death in *Arabidopsis*." *Cell Research* **17**(12): 1030-1040.
- Shulaev, V., Cortes, D., Miller, G. and Mittler, R.** (2008). "Metabolomics for plant stress response." *Plant Science*: 199-208.
- Siehler, S. and Manning, D. R.** (2002). "Pathways of transduction engaged by sphingosine 1-phosphate through G protein-coupled receptors." *Zebrafish* **1582**: 94-99.
- Skulachev, V.** (2006). "Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis." *Apoptosis* **11**(4): 473-485.
- Snyrychová, I., Ayaydin, F. and Hideg, E.** (2009). "Detecting hydrogen peroxide in leaves in vivo - a comparison of methods." *Physiologia plantarum* **135**(1): 1-18.
- Sohn, K. H., Zhang, Y. and Jones, J. D. G.** (2009). "The *Pseudomonas syringae* effector protein, AvrRPS4, requires *in planta* processing and the KRVY domain to function " *The Plant Journal* **57**(6): 1079-1091.
- Spassieva, S. and Hille, J.** (2003). "Plant Sphingolipids Today - Are They Still Enigmatic?" *Plant Biology* **5**(1874): 125-136.
- Spassieva, S. D., Markham, J. E. and Hille, J.** (2002). "The plant disease resistance gene *Asc-1* prevents disruption of sphingolipid metabolism during AAL-toxin-induced programmed cell death." *The Plant Journal* **32**(4): 561-572.
- Sperling, P., Franke, S., Luthje, S. and Heinz, E.** (2005). "Are glucocerebrosides the predominant sphingolipids in plant plasma membranes?" *Plant Physiology and Biochemistry* **43**(12): 1031-1038.
- Sperling, P. and Heinz, E.** (2003). "Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions." *Biochimica et Biophysica Acta* **1632**(1-3): 1-15.
- Sperling, P., Ternes, P., Moll, H., Franke, S., Zähringer, U. and Heinz, E.** (2001). "Functional characterization of sphingolipid C4-hydroxylase genes from *Arabidopsis thaliana*." *FEBS Letters* **494**(1-2): 90-94.
- Sperling, P., Ternes, P., Zank, T. K. and Heinz, E.** (2003). "The evolution of desaturases." *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **68**(2): 73-95.

- Spiegel, S. and Milstien, S.** (2003). "Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **4**(5): 397-407.
- Stiban, J., Caputo, L. and Colombini, M.** (2008). "Ceramide synthesis in the endoplasmic reticulum can permeabilize mitochondria to proapoptotic proteins." *Journal Of Lipid Research* **49**(3): 625-634.
- Stone, J. M., Heard, J. E., Asai, T. and Ausubel, F. M.** (2000). "Simulation of Fungal-Mediated Cell Death by Fumonisin B1 and Selection of Fumonisin B1-Resistant (*fbr*) Arabidopsis Mutants." *The Plant Cell* **12**(October): 1811-1822.
- Sullards, M. C.** (2000). Analysis of sphingomyelin, glucosylceramide, ceramide, sphingosine, and sphingosine 1-phosphate by tandem mass spectrometry. *Methods in Enzymology*. J. Alfred H. Merrill and Y. A. Hannun, Academic Press. **Volume 312**: 32-45.
- Sullards, M. C., Allegood, J. C., Kelly, S., Wang, E., Haynes, C. A., Park, H., Chen, Y. and Merrill, A. H., Jr.** (2007). Structure-Specific, Quantitative Methods for Analysis of Sphingolipids by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: "Inside-Out" Sphingolipidomics. *Methods in Enzymology*. H. A. Brown, Academic Press. **Volume 432**: 83-115.
- Sullards, M. C., Lynch, D. V., Merrill, A. H., Jr and Adams, J.** (2000). "Structure determination of soybean and wheat glucosylceramides by tandem mass spectrometry." *Journal of Mass Spectrometry* **35**(August 1999): 347-353.
- Sullards, M. C. and Merrill, A. H., Jr.** (2001). "Analysis of Sphingosine 1-Phosphate, Ceramides, and Other Bioactive Sphingolipids by High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry." *Science's STKE* **2001**(67): p11-.
- Suzuki, K.** (1998). "Twenty Five Years of the "Psychosine Hypothesis": A Personal Perspective of its History and Present Status." *Neurochemical Research* **23**(3): 251-259.
- Suzuki, M., Sekine, M., Yamakawa, T. and Suzuki, A.** (1989). "High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry of Glycosphingolipids: I. Structural Characterization of Molecular Species of GlcCer and IV3{beta}Gal-Gb4Cer." *The Journal of Biochemistry* **105**(5): 829-833.
- Szyroki, A., et al.** (2001). "KAT1 is not essential for stomatal opening." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**(5): 2917-2921.
- Taha, T.** (2004). "Sphingosine-1-phosphate receptors: receptor specificity versus functional redundancy." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1682**(1-3): 48-55.
- Taha, T. A., Mullen, T. D. and Obeid, L. M.** (2006). "A house divided: Ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate in programmed cell death." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1758**(12): 2027-2036.
- Takahashi, Y., Berberich, T., Kanzaki, H., Matsumura, H., Saitoh, H., Kusano, T. and Terauchi, R.** (2009). "Serine Palmitoyltransferase, the First Step Enzyme in Sphingolipid Biosynthesis, Is Involved in Nonhost Resistance." *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**(1): 31-38.

- Tao, Y., Xie, Z., Chen, W., Glazebrook, J. and Chang, H. S.** (2003). "Quantitative nature of Arabidopsis responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*." *Plant Cell* **15**: 317.
- Ternes, P.** (2002). "Identification and Characterization of a Sphingolipid Delta 4-Desaturase Family." *Journal of Biological Chemistry* **277**(28): 25512-25518.
- Thudichum, J. L. W., Ed.** (1884). *A Treatise on the Chemical Constitution of Brain*, Bailliere, Tindall and Cox, London.
- Torres, M. A.** (2010). "ROS in biotic interactions." *Physiologia Plantarum* **138**(4): 414-429.
- Townley, H. E., McDonald, K., Jenkins, G. I., Knight, M. R. and Leaver, C. J.** (2005). "Ceramides induce programmed cell death in *Arabidopsis* cells in a calcium-dependent manner." *Biological Chemistry* **386**(2): 161-166.
- Triantaphylidès, C. and Havaux, M.** (2009). "Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling." *Trends in Plant Science* **14**(4): 219-228.
- Tsegaye, Y., et al.** (2007). "Arabidopsis mutants lacking long chain base phosphate lyase are fumonisin-sensitive and accumulate trihydroxy-18:1 long chain base phosphate." *Journal of Biological Chemistry* **282**(38): 28195-28206.
- Uemura, A., Watarai, S., Kushi, Y., Kasama, T., Ohnishi, Y. and Kodama, H.** (2006). "Analysis of neutral glycosphingolipids from *Trypanosoma brucei*." *Veterinary Parasitology* **140**(3-4): 264-272.
- Uemura, M., Joseph, R. A. and Steponkus, P. L.** (1995). "Cold Acclimation of *Arabidopsis thaliana* (Effect on Plasma Membrane Lipid Composition and Freeze-Induced Lesions)." *Plant Physiology* **109**(1): 15-30.
- Uemura, M. and Steponkus, P. L.** (1994). "A Contrast of the Plasma Membrane Lipid Composition of Oat and Rye Leaves in Relation to Freezing Tolerance." *Plant Physiology* **104**(2): 479-496.
- van Breusegem, F. and Dat, J. F.** (2006). "Reactive Oxygen Species in Plant Cell Death " *Plant Physiology* **141**: 384-390.
- van der Meer-Janssen, Y. P. M., van Galen, J., Batenburg, J. J. and Helms, J. B.** (2010). "Lipids in host-pathogen interactions: pathogens exploit the complexity of the host cell lipidome." *Progress in Lipid Research* **49**(1): 1-26.
- van Doorn, W. G. and Woltering, E. J.** (2004). "Senescence and programmed cell death: substance or semantics?" *Journal of Experimental Botany* **55**(406): 2147-2153.
- van Doorn, W. G. and Woltering, E. J.** (2005). "Many ways to exit? Cell death categories in plants." *Trends in Plant Science* **10**(3): 117-122.
- van Doorn, W. G. and Woltering, E. J.** (2010). "What about the role of autophagy in PCD?" *Trends in Plant Science* **15**(7): 361-362.

- Vesper, H., Schmelz, E.-M., Nikolova-Karakashian, M. N., Dillehay, D. L., Lynch, D. V. and Merrill, A. H., Jr.** (1999). "Sphingolipids in Food and the Emerging Importance of Sphingolipids to Nutrition." *Journal of Nutrition* **129**(7): 1239-1250.
- Wang, D.** (2007). "Molecular and Functional Characterization of Sphingosine-1-Phosphate Lyase Homolog from Higher Plants." *Journal of Integrative Plant Biology* **49**(3): 323-335.
- Wang, E., Norred, W. P., Bacon, C. W., Riley, R. T. and Merrill, A. H., Jr.** (1991). "Inhibition of Sphingolipid Biosynthesis by Fumonisin. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*." *The Journal of Biological Chemistry* **266**(22): 14486-14490.
- Wang, H., Jones, C., Ciacci-Zanella, J., Holt, T. and Gilchrist, D. G.** (1996). "Fumonisin and *Alternaria alternata* lycopersici toxins: Sphinganine analog mycotoxins induce apoptosis in monkey kidney cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**(April): 3461-3465.
- Wang, H., Li, J., Bostock, R. M. and Gilchrist, D. G.** (1996). "Apoptosis: A Functional Paradigm for Programmed Plant Cell Death Induced by a Host-Selective Phytotoxin and Invoked during Development." *The Plant Cell* **8**: 375-391.
- Wang, L., Wang, T. and Fehr, W. R.** (2006). "HPLC Quantification of Sphingolipids in Soybeans with Modified Palmitate Content." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**(20): 7422-7428.
- Wang, W., et al.** (2008). "An Inositolphosphorylceramide Synthase Is Involved in Regulation of Plant Programmed Cell Death Associated with Defense in *Arabidopsis*." *The Plant Cell* **20**(11): 3163-3179.
- Ward, J. L., et al.** (2010). "The metabolic transition during disease following infection of *Arabidopsis thaliana* by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*." *The Plant Journal* **63**(3): 443-457.
- Warnecke, D. and Heinz, E.** (2003). "Recently discovered functions of glucosylceramides in plants and fungi." *Cellular and Molecular Life Sciences* **60**(5): 919-941.
- Whalen, M. C., Innes, R. W., Bent, A. F. and Staskawicz, B. J.** (1991). "Identification of *Pseudomonas syringae* Pathogens of *Arabidopsis* and a Bacterial Locus Determining Avirulence on Both *Arabidopsis* and Soybean." *The Plant Cell* **3**(1): 49-59.
- Woltering, E. J.** (2004). "Death proteases come alive." *Trends in Plant Science* **9**(10): 469-472.
- Worrall, D.** (2003). "Sphingolipids, new players in plant signaling." *Trends in Plant Science* **8**(7): 317-320.
- Worrall, D., Liang, Y.-K., Alvarez, S., Holroyd, G. H., Spiegel, S., Panagopoulos, M., Gray, J. E. and Hetherington, A. M.** (2008). "Involvement of sphingosine kinase in plant cell signalling." *The Plant Journal* **56**(1): 64-72.
- Wright, B.** (2003). "Synthesis of 4-hydroxysphinganine and characterization of sphinganine hydroxylase activity in corn." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **415**(2): 184-192.
- Wymann, M. P. and Schneider, R.** (2008). "Lipid signalling in disease." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**(2): 162-176.

- Yao, N., Eisfelder, B. J., Marvin, J. and Greenberg, J. T.** (2004). "The mitochondrion - an organelle commonly involved in programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*." *The Plant Journal* **40**(4): 596-610.
- Yoshinaga, K.** (2005). "Mitochondrial Behaviour in the Early Stages of ROS Stress Leading to Cell Death in *Arabidopsis thaliana*." *Annals of Botany* **96**(2): 337-342.
- Yoshizaki, F., Nakayama, H., Iwahara, C., Takamori, K., Ogawa, H. and Iwabuchi, K.** (2008). "Role of glycosphingolipid-enriched microdomains in innate immunity: Microdomain-dependent phagocytic cell functions." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1780**(3): 383-392.
- Yu, R. K. and Ariga, T.** (2000). Ganglioside Analysis by High-Performance Thin-Layer Chromatography. *Methods in Enzymology*. A. H. J. Merrill and Y. A. Hannun, Academic Press. **Volume 312**: 115-134.
- Zeier, J., Delledonne, M., Mishina, T., Severi, E., Sonoda, M. and Lamb, C.** (2004). "Genetic Elucidation of Nitric Oxide Signaling in Incompatible Plant-Pathogen Interactions." *Plant Physiology* **136**(1): 2875-2886.
- Zhang, G., Slaski, J. J., Archambault, D. J. and Taylor, G. J.** (1997). "Alternation of plasma membrane lipids in aluminum-resistant and aluminum-sensitive wheat genotypes in response to aluminum stress." *Physiologia Plantarum* **99**(2): 302-308.
- Zheng, W.** (2006). "Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signaling and autophagy." *Biochimica et Biophysica Acta* **1758**: 1864-1884.

Publikationen

Peer, M., Stegmann, M., Mueller, M. J. and Waller, F.

Pseudomonas syringae infection triggers *de novo* synthesis of phytosphingosine from sphinganine in *Arabidopsis thaliana*.

FEBS Letters (2010) **584**(18): 4053-4056

Peer, M., Mueller, M. J. and Waller, F.

The role of Sphingolipids in plant pathogen defence.

invited review – Manuskript in Vorbereitung

Peer, M., Bach, M., Mueller, M. J. and Waller, F.

Free Sphingobases induce rbohD-dependent reactive oxygen species production in *Arabidopsis* leaves.

Manuskript in Vorbereitung

Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Martin J. Müller für die Überlassung dieses spannenden und modernen Themas im Rahmen des DFG Graduiertenkollegs 1342 „Lipid Signalling“ sowie für Betreuung und Unterstützung. Dabei möchte ich auch allen Organisatoren und Verantwortlichen des Graduiertenkollegs sowie der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung und die Möglichkeiten danken, auch an Fortbildungsmaßnahmen und Tagungen teilzunehmen. Ebenfalls danke ich Prof. Ed Cahoon für die Bereitstellung der *sbh1-1* und *sbh2-1* Mutanten.

Ein besonderer und herzlicher Dank geht an Herrn PD Dr. Frank Waller, der mich nicht nur tatkräftig und jederzeit hilfsbereit während meiner Arbeit unterstützt, beraten und betreut hat, sondern der auch ein guter Ratgeber in vielen anderen Belangen eines Doktorandenlebens war. Auch für die Unterstützung bei der Erstellung der Fachpublikation sowie für die Durchsicht und Begutachtung der vorliegenden Arbeit möchte ich mich bedanken.

Desweiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. Thomas Müller für das Zweitgutachten und die nette Atmosphäre danken.

Im Weiteren möchte ich allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie und der befreundeten Lehrstühle sowie des botanischen Gartens und des Versuchsgewächshauses meinen persönlichen Dank aussprechen, die für eine überaus angenehme und kollegiale Stimmung gesorgt haben und denen ich sehr viel Unterstützung verdanke.

Besonders möchte ich auch Herrn Dr. Markus Krischke für seine Hilfsbereitschaft und technische Unterstützung sowie meinen (Ex-)Kollegen Prof. Dr. Heribert Warzecha, Dr. Stefan Albert, Dr. Henrik Stotz, Dr. Martin Selmann, Simone Findling, Maria Zöller, Beate Stephan, Nadja Stingl und nicht zuletzt Dr. Stefan Müller danken.

Ein großer Dank geht auch an meinen Diplomanden und Bachelor-Studenten sowie an die unzähligen HiWis und Praktikanten, die durch viel Fleiß und Einsatz stark zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein liebevollster Dank gilt meiner Freundin Tina für ihre grenzenlose Unterstützung, ihre unermüdliche Geduld und ihre stets offenen Ohren. Danke!

Abschließend möchte ich mich ganz besonders herzlich bei meiner Familie, insbesondere meiner Mutter, bedanken. Ohne Euch wäre diese Arbeit nie zustande gekommen!

Ehrenwörtliche Erklärung

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

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch zu keinem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Ich erkläre, dass ich bisher keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, 21.12.20010

Markus Peer