

---

**LIPIDPEROXIDATION IN DER INKOMPATIBLEN  
*PSEUDOMONAS-ARABIDOPSIS* INTERAKTION:  
BIOSYNTHESE VON PIMELIN- UND AZELAINSÄURE**

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES  
NATURWISSENSCHAFTLICHEN DOKTORGRADES  
DER JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT WÜRZBURG

VORGELEGT VON

MARIA SIMONE ZÖLLER

GEBOREN IN MILTENBERG



WÜRZBURG 2012

---

EINGEREICHT AM:

MITGLIEDER DER PROMOTIONSKOMMISSION

VORSITZENDER: PROF. DR. WOLFGANG RÖSSLER

1. GUTACHTER: PROF. DR. DR. MARTIN J. MÜLLER

2. GUTACHTER: PD DR. DIRK BECKER

TAG DES PROMOTIONSKOLLOQUIUMS:

DOKTORURKUNDE AUSGEHÄNDIGT AM:

## ZUSAMMENFASSUNG

Die Biosynthese von fragmentierten Fettsäuren (kurzkettige Dicarbonsäuren und deren Oxocarbonsäure-Vorstufen) ist in den meisten Pflanzen noch unklar. Wichtige, bekannte Dicarbonsäuren sind Pimelinsäure (PIM) und Azelainsäure (AZA) mit den putativen Vorstufen 7-Oxoheptanonsäure (OHA) und 9-Oxononanonsäure (ONA). Es besteht großes Interesse die Biosynthesemechanismen und die Regulation der Synthese dieser Substanzen aufzuklären, da Fettsäurefragmente an wichtigen biologischen Prozessen beteiligt sind. PIM ist eine essentielle Vorstufe von Biotin in Mikroben, Pilzen und Pflanzen. Bisher konnte die Biosynthese von PIM nur in Bakterien (*E. coli* und *B. subtilis*) aufgeklärt werden. Es gibt keine Hinweise auf einen analogen Mechanismus in Pflanzen. Eine biologische Aktivität von AZA bei Pflanzen konnte erst vor kurzem beschrieben werden. Eine Forschergruppe identifizierte AZA als Metabolit, der nach Infektion mit dem Pathogen *Pseudomonas syringae* vermehrt im Phloemsaft von *Arabidopsis* vorhanden ist und der in Pflanzen eine lokale und systemische Resistenz gegenüber dem Pathogen induziert. In Tieren sind Fettsäurefragmente ebenfalls Gegenstand aktueller Forschung. Es ist bekannt, dass eine nichtenzymatische oxidative Fragmentierung von Fettsäurehydroperoxiden in komplexen Membranlipiden als Folge von oxidativem Stress abläuft. Phospholipide mit veresterter ONA / AZA spielen aufgrund ihrer Struktur eine Rolle als endogene Liganden bei Reaktionen des angeborenen Immunsystems.

Ziel dieser Arbeit war es, die Mechanismen der Oxidation von Fettsäuren und deren Fragmentierung in Pflanzen aufzuklären. Weiterhin sollte die Rolle der oxidierten Fragmente in der Immunantwort der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* untersucht werden. In Pflanzen wurden fragmentierte Fettsäuren im Rahmen dieser Arbeit erstmals in komplexen Lipiden identifiziert und verschiedene Hypothesen zur Bildung von Fettsäurefragmenten experimentell überprüft.

Es konnte gezeigt werden, dass die Biosynthese der Fettsäurefragmente in *Arabidopsis thaliana* ausgehend von zwei- oder dreifach ungesättigten Fettsäuren stattfindet. 9- und 13-Lipoxygenasen (LOX1, LOX5 und LOX2) spielen dabei keine essentielle Rolle. Die Mitglieder der Lipid-Transfer-Proteinfamilie AZELAIC ACID INDUCED 1 (AZI1) und DEFECTIVE IN INDUCED RESISTANCE 1 (DIR1), ebenso wie die chloroplastidäre Fettsäure Desaturase 7 (FATTY ACID DESATURASE 7, FAD7) sind ebenfalls nicht essentiell für die Biosynthese der Fettsäurefragmente. Für diese Enzyme wurde eine Rolle in der Biosynthese und / oder dem Transport des Signals in der systemischen Resistenz der Pflanze bzw. eine Rolle in der Induktion der systemischen Resistenz postuliert.

Die Fettsäurefragmente konnten in *Arabidopsis* in freier Form und in komplexen Lipiden verestert (ausschließlich in Galactolipiden) detektiert werden. Applikationsexperimente zeigten, dass die Biosynthese der Fettsäurefragmente in den komplexen Lipiden auf nichtenzymatischem Wege *in situ* stattfindet. Dabei wird in Übereinstimmung mit den experimentellen *in vitro* und *in vivo* Daten als Reaktionsmechanismus die Dimer-Hypothese der Arbeitsgruppe um Alan Brash vorgeschlagen. In grünen Pflanzenteilen verläuft die Biosynthese demzufolge in drei Schritten ab: Im ersten Schritt entsteht ein „Pool“ von oxidierten Galactolipiden mit Hydroperoxid-Acyllipiden (mit konjugierten Dienen). Diese Hydroperoxide entstehen fortlaufend durch Oxidation der Fettsäureacylketten mittels Singulett Sauerstoff in Plastiden. Nach Infektion mit dem Pathogen *Pseudomonas syringae pathovar tomato* (avirulenter Stamm) wird der „Pool“ von Galactolipidperoxiden durch die katalytische Einwirkung von freien Radikalen und der Lipoxygenase 2 erhöht. Im zweiten Schritt findet eine Radikal-katalysierte Addition von Peroxylradikalen an Fettsäurehydroperoxide statt, wobei Lipid-Peroxid-Dimere gebildet werden. Diese instabilen Zwischenprodukte zerfallen spontan in vier Produkte, darunter zwei Aldehyd-Fragmente, ein Alkoxyradikal und ein Hydroxylradikal. Bemerkenswert ist hierbei, dass durch die Fragmentierung des Dimers weitere Radikale *de novo* entstehen. Im dritten Schritt können die in Galactolipiden veresterten Oxocarbonsäuren in einem Radikal-katalysierten Prozess zu Dicarbonsäuren oxidiert werden.

Hydroperoxide, die Vorläufer der Fettsäurefragmente, wurden in freier Form und in komplexen Lipiden verestert analysiert. Die Detektion der Peroxide erfolgte nach Reduktion mit Triphenylphosphin zu Hydroxyfettsäuren. Unter basalen Bedingungen liegt sowohl bei den freien, als auch bei den veresterten Hydroxyfettsäuren ein fast komplett Singulett Sauerstoff abhängiger Oxidationsmechanismus vor. Drei Galactolipid Hauptspezies (Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG)-18:3-16:3, Digalactosyldiacylglycerol (DGDG)-18:3-18:3 und DGDG-18:3-16:3) sind hoch oxidiert (5 bis 9 Mol-%, relativ zur jeweiligen Vorstufe). MGDG-18:3-18:3, ebenso wie Phosphatidylglycerol-, Phosphatidylinositol- und Triacylglycerol-Hydroxyfettsäurespezies liegen basal nur schwach oxidiert vor (< 2 Mol-%). Nach Infektion mit dem Pathogen *P. syringae* kommt es zu einer massiven Lipid Biosynthese und Oxidation durch die 13-Lipoxygenase LOX2, Singulett Sauerstoff und freie Radikale. Der Oxidationsgrad der Hydroxyfettsäuren in den Galactolipiden ändert sich kaum. Innerhalb der Triacylglycerole kommt es zu einem großen Anstieg der oxidierten Spezies (auf 12 bis 38 Mol-%). Die Oxidation und Fragmentierung der Fettsäuren in den Galactolipiden unter basalen Bedingungen und induziert durch die Pathogenbehandlung, stellen einen wichtigen biochemischen Prozess dar. Auf diesem Weg entstehen die essentielle Biotin Vorstufe PIM und AZA, die in *A. thaliana* eine lokale und systemische Resistenz induziert.

Darüber hinaus konnte eine starke Akkumulation von LOX2-abhängigen Oxidationsprodukten nach Infektion mit dem Pathogen, vor allem innerhalb der Gruppe der MGDG, wie z.B. den Arabidopsiden, beobachtet werden. MGDG, ebenso wie höher oxidierte Lipide, stellen aufgrund ihrer Struktur Lipide dar, die nur zusammen mit anderen „Bilayer“-bildenden Lipiden (z.B. Phosphatidylcholinen und DGDG) eine Lipid-Doppelschicht aufbauen können. Die Oxidation von Plastidenlipiden führt zu einem dramatischen Verlust von Thylakoidmembranen, der durch Neusynthese ausgeglichen wird. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Lipidverluste nicht nur kompensiert werden sondern die *de novo* gebildeten Lipide nach Pathogeninfektion sogar akkumulieren. Die Spiegel an Galactolipiden, Triacylglycerolen und einigen Phospholipiden nehmen nach Pathogeninfektion stark zu. Der größte Anstieg in der Summe der Lipide ist bei den Triacylglycerolen mit einer 8,5-fachen Zunahme zu beobachten. Weiterhin konnte eine 2-fache Anreicherung von MGDG infolge der Pathogeninfektion detektiert werden. Diese Anstiege in der Summe der Lipide gehen einher mit der Zunahme der Größe und Anzahl von Plastoglobuli (Speicher für Triglyceride) und Prolamellarkörper (Speicher für Thylakoidmembranlipide, insbesondere MGDG) in den Chloroplasten von infizierten Blättern. Es wird postuliert, dass diese Strukturen ein Lipidreservoir für die Neubildung von Thylakoidmembranlipiden darstellen.

**SUMMARY**

The biosynthesis of fragmented fatty acids (short chain bicarboxylic acids and their precursor oxoacids) has not been established in plants. Important and common bicarboxylic fatty acids are pimelic acid and azelaic acid (PIM and AZA) and their putative precursors 7-oxoheptanoic acid (OHA) and 9-oxononanoic acid (ONA). Interest in the biogenetic origin of these unusual fatty acids stems from the fact that these fragmented fatty acids are involved in important biological processes. PIM is an established precursor of biotin in bacteria, fungi and plants. PIM biosynthesis has only recently been clarified in bacteria (*E. coli* and *B. subtilis*) and there is yet no evidence that an analogous pathway is operative in plants. Moreover, AZA has been identified as a pathogen-induced metabolite in *Arabidopsis* vascular sap that has been reported to prime local and systemic resistance against the pathogen *Pseudomonas syringae*. In animals, non-enzymatic fragmentation of fatty acid hydroperoxides is known to occur in complex membrane lipids during oxidative stress. ONA and AZA comprising phospholipids serve as endogenous pattern recognition ligands in the innate immune system of animals.

The aim of this work was to clarify the mechanisms of fatty acid oxidation and fragmentation as well as the function of the oxidized fragments in the immune response of the model plant *Arabidopsis thaliana*. Within this work, fragmented fatty acids have been identified in complex lipids of plants for the first time and different hypotheses for the biosynthesis of fragmented fatty acids were examined.

It could be shown that dienoic or trienoic fatty acids are precursors of fatty acid fragments in *Arabidopsis thaliana*. 9- and 13-lipoxygenases (LOX1, LOX5 and LOX2) are not essential for biosynthesis. AZELAIC ACID INDUCED 1 (AZI1) and DEFECTIVE IN INDUCED RESISTANCE 1 (DIR1), members of the lipid transfer protein family, as well as FATTY ACID DESATURASE 7 (FAD7) are also not necessary for biosynthesis of fragmented fatty acids. It has been postulated that these enzymes play a role in synthesis and / or transport of systemic resistance signals in plants and in induction of systemic resistance, respectively.

In *Arabidopsis* fragmented fatty acids could be identified in free form and esterified in complex lipids, exclusively galactolipids. Application experiments revealed that biosynthesis of fatty acid fragments takes place in galactolipids *in situ* in a non-enzymatic way. Interpretation of *in vitro* and *in vivo* results lets suggest a reaction mechanism due to dimer hypothesis from Alan Brash's working group. The fragmentation process in green organelles was found to proceed through three steps. An initial and essential event is the formation of a pool of galactolipids comprising acyl hydroperoxides with conjugated dienes. These hydroperoxides are generated continuously in plastids through oxidation of fatty acyls by singlet oxygen. After infection with the avirulent strain of *Pseudomonas syringae*

*pathovar tomato* the pool of galactolipid-peroxides is increased by catalytic impact of free radicals and lipoxygenases. In a second step, peroxy radical addition to fatty acid hydroperoxides results in dimerization of peroxides thereby forming an unstable intermediate that spontaneously decomposes to yield two aldehyde fragments, an alkoxy radical and a hydroxy radical. Notably, decomposition of the dimer leads to a *de novo* production of radicals. In a third step oxoacids esterified in galactolipids could be oxidized into bicarboxylic acids in a radical catalyzed process.

Hydroperoxides, precursors of fatty acid fragments, were analyzed reduced to hydroxy fatty acids, in free form and esterified in complex lipids. Under basal conditions, some complex lipids were found to be highly and almost exclusively oxidized by singlet oxygen. Three galactolipid species (monogalactosyldiacylglycerole (MGDG)-18:3-16:3, digalactosyldiacylglycerole (DGDG)-18:3-18:3 and DGDG-18:3-16:3) showed highest level of oxidation with 5 to 9 mol-% (relative to their precursors). MGDG-18:3-18:3, as well as phosphatidylglycerol, phosphatidylinositol and triacylglycerol species are only slightly oxidized (< 2 mol-%). After *P. syringae* infection, massive lipid biosynthesis and oxidation by 13-lipoxygenase LOX2, singlet oxygen and free radicals was observed. Degree of oxidation in galactolipids was almost the same but hydroxylated triacylglycerol species showed a strong increase (up to 12 until 38 mol-%). Basal and pathogen-induced fatty acyl oxidation and fragmentation in galactolipids might be an important and general biochemical process yielding the essential biotin precursor PIM and AZA, which has previously been shown to prime the local and systemic immune response of *A. thaliana*.

Moreover a strong accumulation of LOX2-depending oxidation products, particularly in MGDG, e. g. arabidopsides, could be shown. MGDG and higher oxidized lipids are non-bilayer forming lipids that can only be integrated into membranes in the presence of sufficient bilayer forming lipids such as phosphatidylcholines and DGDG. Oxidation of plastidic lipids results in a dramatic loss of thylakoid membranes that is overcompensated by *de novo* lipid synthesis. Indeed levels of galactolipids, triacylglycerols and phospholipids increased after pathogen infection. In case of triacylglycerols highest rise with 8.5-fold lipid accumulation could be observed. Also a strong accumulation of MGDG (2-fold) could be observed after pathogen infection. This massive lipid biosynthesis is in agreement with increase of size and number of plastoglobules (reservoir for triacylglycerols) and prolamellar bodies (reservoir for thylakoid membrane lipids, particularly MGDG) in chloroplasts of infected leaves. It has been postulated that these structures display a lipid reservoir for *de novo* synthesized thylakoid membrane lipids.

INHALTSVERZEICHNIS

<b>I</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1	Chloroplasten: Hauptort der Lipidperoxidation?.....	3
2	Oxidierete Lipide im pflanzlichen und tierischen System.....	4
3	Die oxidierten Fettsäurefragmente Pimelin- und Azelainsäure.....	8
4	Ziel der Arbeit .....	16
<b>II</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>17</b>
1	Nachweis von AZA und PIM in <i>A. thaliana</i> nach verschiedenen Arten von Stress.....	17
2	Hypothesen zur Biosynthese von AZA und PIM: Mutantenscreen .....	22
3	Oxidation von Fettsäuren <i>in vitro</i> .....	26
4	Oxidation von Fettsäuren <i>in vivo</i> .....	31
5	Oxidation von komplexen Lipiden.....	33
6	Oxidierete Fettsäurefragmente in komplexen Lipiden .....	40
7	LOX2-abhängige oxidierte Fettsäuren in Galactolipiden.....	47
8	Anstieg der Gesamtmenge der Lipide nach Infektion mit <i>P. syringae</i> .....	49
9	Transmissionselektronenmikroskopie .....	51
<b>III</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>55</b>
1	Biosynthese der Dicarbonsäuren Azelain- und Pimelinsäure .....	55
2	Fettsäure Fragmentierungsmechanismus: Dimer-Hypothese .....	56
3	Bedeutung der AZA und PIM Biosynthese .....	59
4	Lokalisation der Lipide .....	60
<b>IV</b>	<b>MATERIAL .....</b>	<b>64</b>
1	Chemikalien .....	64
2	Verbrauchsmaterial .....	65
3	Pflanzenmaterial .....	66
4	Medium zur Pflanzenanzucht.....	66
5	Bakterien für Infiltration.....	67
6	Medien für Infiltration von <i>A. thaliana</i> mit <i>P. syringae</i> .....	67



<b>7</b>	<b>Lösungen für die Transmissionselektronenmikroskopie .....</b>	<b>67</b>
<b>8</b>	<b>Laborgeräte.....</b>	<b>68</b>
<b>V</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>71</b>
<b>1</b>	<b>Anzucht der Pflanzen.....</b>	<b>71</b>
<b>2</b>	<b>Behandlung der Pflanzen .....</b>	<b>71</b>
<b>3</b>	<b>Extraktion von Pflanzenmaterial zur Lipidanalyse.....</b>	<b>73</b>
<b>4</b>	<b><i>In vitro</i> Oxidation verschiedener Fettsäuren.....</b>	<b>75</b>
<b>5</b>	<b>Lipidanalytik.....</b>	<b>76</b>
<b>6</b>	<b>Berechnungen zum Oxidationsmechanismus.....</b>	<b>86</b>
<b>7</b>	<b>Identitätsnachweis der veresterten Fettsäurefragmente .....</b>	<b>87</b>
<b>8</b>	<b>Applikationsversuche .....</b>	<b>89</b>
<b>9</b>	<b>Transmissionselektronenmikroskopie .....</b>	<b>90</b>
<b>VI</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>92</b>
<b>VII</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>100</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

16:3	Hexadecatriensäure
18:3	Linolensäure
AZA	Azelainsäure (engl.: azelaic acid)
DGDG	Digalactosyldiacylglycerol
ESI	Elektrospray Ionisation
HODE	Hydroxyoctadecadiensäure / Hydroxyfettsäure
HOTE	Hydroxyoctadecatriensäure / Hydroxyfettsäure
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
JA	Jasmonsäure
<i>m/z</i>	Masse/Ladungs-Verhältnis
MGDG	Monogalactosyldiacylglycerol
MRM	multiple reaction monitoring
MS	Massenspektrometer
MW	Mittelwert
OHA	7-Oxoheptanonsäure
ONA	9-Oxononanonsäure
OPDA	12-Oxo-Phytodiensäure
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphoethanolamine
PG	Phosphatidylglycerole
PI	Phosphatidylinositole
PIM	Pimelinsäure (engl.: pimelic acid)
PLB	Prolamellarkörper (engl.: prolamellar body)
PS	Phosphatidylserine
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (engl.: reactive oxygen species)
SD	Standardabweichung
SE	Standardfehler
TG	Triacylglycerole
UPLC	Ultrahochleistungs-Flüssigchromatographie
<i>v/v</i>	Volumen pro Volumen
<i>w/v</i>	Masse pro Volumen

## I EINLEITUNG

*Pseudomonas syringae* ist ein Gram negatives, stäbchenförmiges Bakterium mit polaren Flagellen. Bereits in den späten 1980ern wurden mehrere Stämme isoliert, die die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* infizieren können. In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem Bakterienstamm *P. syringae* pathovar tomato DC3000 (*Pst*) gearbeitet. Ein avirulenter und ein virulenter Stamm dieses Bakteriums wurden zur Infektion von *Arabidopsis thaliana* eingesetzt. Gegenüber dem avirulenten *Pst*-Stamm ist *Arabidopsis* resistent, was zu einer inkompatiblen Interaktion führt. Nach Infektion mit dem virulenten *Pst*-Stamm kommt es zu einer kompatiblen Interaktion (Whalen *et al.* 1991). Die „Gen-für-Gen“-Hypothese beschreibt die genetischen Grundlagen von Anfälligkeit und Resistenz einer Pflanzenart gegenüber verschiedenen Pathogenstämmen. Eine Rassen-spezifische Resistenz wird nur dann erreicht, wenn die Wirtspflanze zu dem jeweiligen dominant vererbten Avirulenzgen des Pathogens das komplementäre, ebenfalls dominant vererbte Resistenzgen trägt (Flor 1971).

Nach dem Befall einer Pflanze mit einem avirulenten Pathogen, kommt es in einem als „Hypersensitive Reaktion“ (HR) bezeichneten Prozess zur Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (engl.: reactive oxygen species, ROS) und Stickstoffmonoxid (NO). Nach der initialen ROS-Bildung und der vermehrten NO-Freisetzung, kommt es einige Stunden später zu einem zweiten „oxidativen burst“ (Low und Merida 1996). Dies führt zum programmierten Zelltod, wobei das pflanzliche Gewebe in der Umgebung des Infektionsorts abstirbt und somit die Verbreitung des Pathogens verhindert wird (Shah 2005).

Zur Gruppe der ROS zählen das Hydroxyl-Radikal ( $\text{OH}^\cdot$ ), das Perhydroxyl-Radikal ( $\text{O}_2\text{H}^\cdot$ ), das Superoxidanion-Radikal ( $\text{O}_2^\cdot$ ), Singulett Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) und Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Generiert werden ROS im Apoplasten durch NADPH-Oxidasen, zellwandgebundene Peroxidasen, Superoxid-Dismutasen und Aminooxidasen (Laloi *et al.* 2004). ROS werden fortwährend in den Mitochondrien bei der unvollständigen Reduktion von Sauerstoff in der Atmungskette, sowie in den Chloroplasten beim direkten Elektronentransfer vom Photosystem I auf Sauerstoff (Mehler-Reaktion) generiert (Mehler 1951; Neill *et al.* 2002; Vranova *et al.* 2002). Infolge verschiedener abiotischer und biotischer Stresstimuli, wie z. B. Hitze- und Kältestress, Trockenheit, Verwundung und Pathogenbefall (Dat *et al.* 2000; Hancock *et al.* 2001; Neill *et al.* 2002) kommt es zu einer vermehrten Bildung von ROS.

Liegen erhöhte Spiegel an ROS in der Zelle vor, lösen diese Mechanismen aus, die in Verbindung mit Signalprozessen und programmiertem Zelltod stehen (Mittler *et al.* 2004; Van Breusegem und Dat 2006). Eine klare Trennung zwischen den spezifischen Effekten der einzelnen ROS Spezies stellt sich als sehr schwierig dar, da sie oft gleichzeitig gebildet und leicht in andere ROS Spezies umgewandelt

werden. Ebenso fehlen entsprechende Marker, die eine Quantifizierung von ROS bzw. des oxidativen Stresses erlauben.

Eine Konsequenz der Anreicherung von ROS ist die Lipidperoxidation. Nur Singulett Sauerstoff und freie Radikale sind dabei reaktiv genug um ungesättigte Fettsäuren direkt oxidieren zu können (Mueller *et al.* 2006). Unklar ist, ob die Lipidperoxidation eine Ursache oder Folge des Zelltods darstellt. Eine Möglichkeit die Lipidperoxidation zu untersuchen, stellt die Analyse von Hydroxyfettsäure-Mustern dar. Hydroperoxide bzw. Hydroxyfettsäuren entstehen als primäre Produkte bei der nichtenzymatischen Lipidperoxidation. Die durch Singulett Sauerstoff initiierte Lipidperoxidation unterscheidet sich von dem Mechanismus der Radikal-katalysierten Oxidation. Singulett Sauerstoff kann aufgrund seiner hohen Elektrophilie direkt die Doppelbindung einer ungesättigten Fettsäure angreifen, während für die Radikal-katalysierte Oxidation eine Pentadienylgruppe in der Fettsäure vorhanden sein muss, an der die Oxidation startet. Durch den unterschiedlichen Reaktionsmechanismus werden spezifische Muster an Hydroperoxiden generiert, die Rückschlüsse auf den zugrundeliegenden Oxidationsmechanismus liefern (Frankel 1998; Montillet *et al.* 2004). Durch Analyse der Hydroxyfettsäure-Muster konnte gezeigt werden, dass Singulett Sauerstoff selbst unter optimalen Wachstumsbedingungen für mehr als 80 % der nichtenzymatischen Lipidperoxidation verantwortlich ist. Weiterhin stellt Singulett Sauerstoff das Hauptspezies dar, welches für den photooxidativen Schaden in Pflanzen verantwortlich ist (Triantaphylides *et al.* 2008). Der Hauptort und die molekularen Ziele der Lipidperoxidation, ebenso wie der Beitrag der verschiedenen ROS Spezies und Lipoxygenasen, sind bisher noch nicht aufgeklärt.

## 1 CHLOROPLASTEN: HAUPTORT DER LIPIDPEROXIDATION?

Die Plastiden stellen in Pflanzen eine der Hauptquellen an ROS, hauptsächlich an Singulett Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ), dar. Die kurze Halbwertszeit von  $^1\text{O}_2$  bedingt, dass dieser mit Lipiden reagiert, die nahe an dem Ort, an dem er entsteht, lokalisiert sind: dem Photosystem II (Triantaphylides *et al.* 2008).

Im Vergleich zur typischen Zellmembran von Tieren, Pilzen oder nichtphotosynthetischen Bakterien, scheint auf den ersten Blick die Lipidkomposition von Chloroplastenmembranen unüblich zu sein. Die Membranen der Chloroplasten bestehen zu über 70 % aus Galactoglycerolipiden, den Mono- und Digalactosyldiacylglyceriden (MGDG und DGDG). Weitere Komponenten sind die Sulfolipide Sulfoquinovosyldiacylglycerole (SQDG) und Phospholipide (Browse und Somerville 1994). In extraplastidären Membranen sind keine Galactolipide, sondern nur Phospholipide zu finden. Lediglich infolge Phosphatmangels kommt es zu einer Translokation von DGDG in extraplastidäre Membranen (Haertel *et al.* 2000).

Höhere Pflanzen können Glycerolipide auf zwei verschiedenen Biosynthesewegen synthetisieren: auf dem prokaryotischen Weg, der an der inneren Chloroplastenmembran stattfindet und über den eukaryotischen Weg, welcher im Endoplasmatischen Retikulum (ER) stattfindet. Aufgrund der Acyl-Gruppen-Spezifität der Acyltransferasen in verschiedenen Organellen, haben Lipide, die in Plastiden synthetisiert werden eine C16 Fettsäure an der *sn*-2 Position, während bei Lipiden, die im ER synthetisiert werden eine C18 Fettsäure an *sn*-2 Position verestert vorliegt (Somerville und Browse 1991).

Abundanteste Fettsäure in den oberirdischen Geweben der meisten Pflanzen ist die dreifach ungesättigte  $\alpha$ -Linolensäure (18:3). In Blättern von *A. thaliana* liegt 18:3 mit bis zu 54 Mol-% vorwiegend in Chloroplasten und Mitochondrien vor (Harwood 1982; Falcone *et al.* 2004). Über 90 bzw. 75 % der in MGDG bzw. DGDG veresterten Fettsäuren sind dreifach ungesättigt (Douce und Joyard 1982). Es scheint verwunderlich, dass gerade die hoch ungesättigten Fettsäuren, die äußerst anfällig sind für nichtenzymatische Oxidation (Frankel 1998), vorwiegend in Chloroplasten, dem Hauptort der ROS Produktion, vorliegen. Zahlreiche Studien an der Mutante *fad3,7,8*, die keine dreifach ungesättigten Fettsäuren besitzt (McConn und Browse 1996), bieten Aufschluss über die Funktion der hoch ungesättigten Fettsäuren im Chloroplasten. Dreifach ungesättigte Fettsäuren werden benötigt, um die Photosynthese unter Kälte aufrecht zu erhalten (Routaboul *et al.* 2000). In Bezug auf erhöhte Temperaturen ist die Mutante *fad3,7,8*, auf kurze Sicht thermotoleranter als der Wildtyp. Auf lange Sicht sind die Photosynthese, das Wachstum und die Überlebensrate der Dreifachmutante im Vergleich zum Wildtyp stark beeinträchtigt (Routaboul *et al.* 2011). Linolensäure ist ein Vorläufermolekül für eine Vielzahl an enzymatisch und nichtenzymatisch gebildeten Signalstoffen, wie z. B. Jasmonate und Phytoprostane (McConn *et al.* 1997; Mueller 2004). Die

Arbeitsgruppe um E. Farmer postulierte eine Rolle für dreifach ungesättigte Fettsäuren im Abfangen von ROS Spezies und damit eine physiologische Funktion dieser Fettsäuren in dem Absenken der ROS Spiegel (Mene-Saffrane *et al.* 2008).

## 2 OXIDIERTE LIPIDE IM PFLANZLICHEN UND TIERISCHEN SYSTEM

Neben dreifach ungesättigten Fettsäuren dienen in Pflanzen auch zwei- und einfach ungesättigte C18 und C16 Fettsäuren als Substrat für die Synthese von oxidierten Lipiden (Oxylipinen). In Abhängigkeit von der Art des Stresses (z. B. Verwundung, Pathogenbefall, Behandlung mit Elicitoren oder Signalmolekülen) kommt es zu einer schnellen und dramatischen Veränderung in der Zusammensetzung der oxygenierten Fettsäurederivate (Blee 2002). Die Vielzahl der möglichen Oxidationsprodukte vergrößert sich noch durch weitere Modifikation einzelner Moleküle, wie die Veresterung in komplexe Lipide und die Konjugation mit Aminosäuren, Sulfaten, Glutathion, Ethanolamin oder Kohlehydraten (Mosblech *et al.* 2008). Abbildung I-1 gibt einen Überblick über die Biosynthese enzymatisch und nichtenzymatisch gebildeter Oxylipine in Pflanzen.

Der erste Schritt in der Oxylipin-Biosynthese ist die Oxygenierung einer ungesättigten Fettsäure, wodurch ein Fettsäure-Hydroperoxid entsteht. Dieser Prozess kann enzymatisch oder durch chemische (Aut-) Oxidation erfolgen (Berger *et al.* 2001; Mueller 2004).

An der enzymatischen Bildung von Hydroperoxiden sind Lipoxygenasen (LOX) und  $\alpha$ -Dioxygenasen ( $\alpha$ -DOX) beteiligt (Feussner und Wasternack 2002; Hamberg *et al.* 2002). Jede bisher analysierte Pflanzenspezies enthält mehrere LOX Gene. In *Arabidopsis* konnten sechs LOX (AtLOX) Gene identifiziert werden. Die LOX werden nach der Position des in Linol- bzw. Linolensäure eingeführten Sauerstoffs in 9-LOX (Position 9) und 13-LOX (Position 13) eingeteilt (Feussner und Wasternack 2002). In *Arabidopsis* gibt es zwei 9-LOX: AtLOX-1 und AtLOX-5. Die vier weiteren LOX (AtLOX-2, AtLOX-3, AtLOX-4 und AtLOX-6) gehören zur Gruppe der 13-LOX (Bannenber *et al.* 2009). Früher wurde angenommen, dass pflanzliche und tierische LOX ausschließlich freie Fettsäuren oxidieren. Inzwischen gibt es Studien, die belegen, dass LOX auch veresterte Fettsäuren als Substrat nutzen. Die Fettsäuren können dabei in Phospholipide, Galactolipide, Triacylglycerole oder an Cholesterol verestert vorliegen (Mosblech *et al.* 2008). In Pflanzen ist ausschließlich LOX2 bekannt, die an Galactolipide veresterte Fettsäuren als Substrat nutzt (Gläuser *et al.* 2009).

Die Hydroperoxide können im weiteren Verlauf durch verschiedene alternative Wege, mithilfe von Enzymen oder nichtenzymatisch, zu den verschiedensten Oxylipinen umgewandelt werden (siehe Abbildung I-1).



und  $\omega$ -Oxofettsäuren gespalten werden. Die meisten Pflanzen besitzen nur eine oder mehrere 13-HPL und keine 9-HPL (Matsui 2006; Chehab *et al.* 2008).

Ein weiteres CYP-Enzym ist die Divinylether-Synthase (DES, CYP74D), die die Bildung von Divinylethern aus freien Fettsäure-Hydroperoxiden katalysiert (Itoh und Howe 2001). Über die Peroxygenasen (PXG / POX) können die Hydroperoxide zu Alkoholen reduziert und in Epoxy-Hydroxy-Derivate überführt werden. Hierbei können auch Mono-, Di- und Trihydroxy-Fettsäuren entstehen (Blee 1998). Ähnliche Produkte entstehen auch durch die Epoxyalkohol-Synthase (EAS). Oft unterscheiden sich die Moleküle nur aufgrund ihrer Stereochemie von den POX-Produkten (Hamberg 1999).

Durch eine Radikal-katalysierte Oxidation von Linolensäure können Phytoprostane entstehen (Imbusch und Mueller 2000a; Imbusch und Mueller 2000b). Die Gruppe der nichtenzymatisch gebildeten Oxidationsprodukte umfasst weiterhin Di- und Trihydroxyfettsäuren, Epoxy-Alkohole, Ketodiene, Ketotriene und Alkenale (Porter 1984).

Für die meisten freien Oxylipine sind zahlreiche biologische Funktionen in der Immunantwort von Pflanzen bekannt. Die Erläuterung würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen. Als Beispiel wird hier nur die Gruppe der Jasmonate aufgeführt, da Vertreter dieser Gruppe in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden. Jasmonate spielen eine entscheidende Rolle in der Abwehr von Insekten und Pathogenen, aber auch in der Stressantwort auf Ozon, UV Licht, Verwundung und andere abiotische Faktoren (Memelink 2009).

Zur Funktion oxidierter komplexer Lipide in der Immunantwort von Pflanzen gibt es kaum Studien, während in Tieren bekannt ist, dass oxidierte Phospholipide eine Rolle in der Initiation und dem Fortschreiten von entzündungsbedingten Krankheiten, wie Atherosklerose, spielen (Berliner *et al.* 2009). Podrez *et al.* (2002a) identifizierten oxidierte Phospholipide (oxPL) *in vitro* und *in vivo* als Produkte nichtenzymatischer Lipidperoxidation. Sie konnten zeigen, dass bestimmte oxPL als endogene Liganden fungieren, die über die spezifische Mustererkennung von Rezeptoren Makrophagen aktivieren, welche Entzündungsmediatoren produzieren und die Phagozytose stimulieren.

Ein Protein, welches unter anderem auf der Oberfläche von Makrophagen exprimiert wird, ist CD36 (Daviet und McGregor 1997; Silverstein und Febbraio 2000). *In vivo* fungiert CD36 als Rezeptor für Phagozyten in der Erkennung von oxidierten Lipoproteinen und seneszenten oder apoptotischen Zellen, er spielt eine Rolle beim Transport von Fettsäuren, bei Zell-Matrix Interaktionen und bei anti-angiogenen Prozessen (Nozaki *et al.* 1995; Febbraio *et al.* 1999; Jimenez *et al.* 2000). CD36 vermittelt



eine Akkumulation von Lipiden und die Formation von Makrophagen Schaumzellen (Nozaki *et al.* 1995; Huh *et al.* 1996; Nakata *et al.* 1999). Es konnte gezeigt werden, dass oxidierte Phospholipide, welche an CD36 (oxPL<sub>CD36</sub>) binden können, stark konservierte Strukturen aufweisen (siehe Abbildung I-2). Nicht nur Phosphocholine, sondern auch Phosphatidylethanolamine, Phosphoserine und Phosphatidsäuren, welche das CD36 Motiv beinhalten, können die CD36-vermittelte Erkennung und Phagozytose induzieren (Hazen 2008). Die Kombination mit diesen amphipathischen Molekülen ist notwendig, da die freien oxidierten Fettsäuren nicht von CD36 erkannt werden (Podrez *et al.* 2002a).

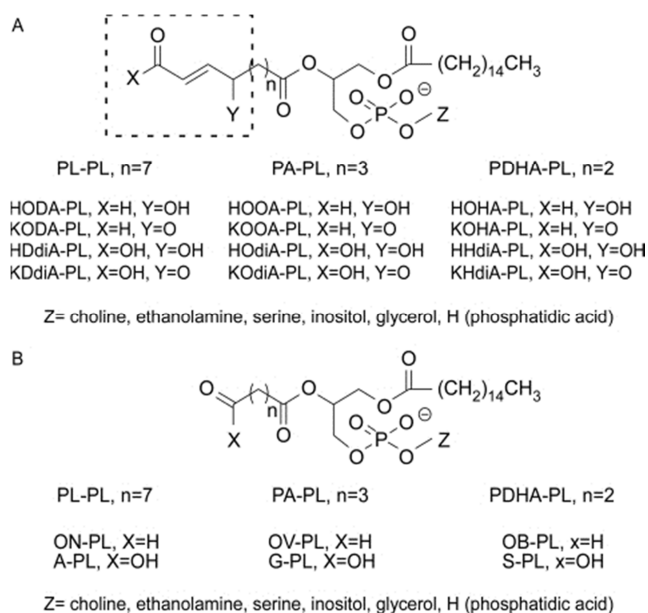


Abbildung I-2: Struktur oxidierter Phospholipide, die Liganden für den Rezeptor CD36 (oxPL<sub>CD36</sub>) darstellen; nach Hazen (2008). A: Die Länge der Acylkette variiert entsprechend der Ausgangsfettsäure (n=2, 3 bzw. 7 für Docosahexaen-, Arachidon- bzw. Linolsäure). Die Struktur in der gestrichelten Box verleiht die hohe Affinität zu CD36, wenn sie sich an der sn-2 Position eines Phospholipids befindet. B: Struktur weiterer ausgewählter Oxidationsprodukte, darunter 9-Oxononanonsäure (ON-PL) und Azelainsäure (A-PL).

Die Gruppe der oxPL<sub>CD36</sub> beinhaltet viele kurzkettinge Aldehyde und Dicarbonsäuren, darunter der C9 Aldehyd 9-Oxononanonsäure (ONA) und die C9 Dicarbonsäure Azelainsäure (AZA). Phospholipide, die mit ONA bzw. AZA verestert sind, konnten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als nichtenzymatische Oxidationsprodukte nachgewiesen werden (Hazen 2008).

Oxidierete Moleküle in bzw. auf der Membran von seneszenten und apoptotischen Zellen, sind dafür verantwortlich, dass diese Zellen erkannt, von Makrophagen aufgenommen und phagozytiert werden (Stuart und Ezekowitz 2005; Ravichandran und Lorenz 2007). Autoantikörper gegen oxidierte Lipoproteine zeigten sowohl genetische als auch strukturelle Übereinstimmung mit Antikörper gegen infektiöse Pathogene. Das bedeutet, dass ein molekulares Mimikry zwischen oxidierten

Membranlipiden und den Lipiden auf der Oberfläche von Pathogenen besteht. Endogener oxidativer Stress induziert somit das Immunsystem auf ähnliche Weise wie es für die Abwehr von Pathogenen vorgesehen ist (Binder *et al.* 2002; Binder *et al.* 2003).

Es wurden inzwischen mehrere Rezeptortypen identifiziert, die bei der biologischen Aktivität der oxPL eine Rolle spielen. Hierzu gehören G-Protein gekoppelte Rezeptoren, Toll-like Rezeptoren (TLRs), Phagozyten und Rezeptoren des Zellkerns. Die Aktivierung der Rezeptoren durch oxPL kann zu einer vermehrten Expression von Adhensionsmolekülen, chemischen Lockstoffen und Cytokinen führen, wodurch eine Entzündungsreaktion forciert wird (Fruhvirth *et al.* 2007). Im Gegensatz dazu wurde auch beobachtet, dass oxPL die Fähigkeit haben Reaktionen auszulösen, die einer Entzündung entgegenwirken. Sie können die Aktivierung von TLRs inhibieren, die proinflammatorische Cytokin Produktion unterdrücken und die dendritische Zell Reifung abschwächen. Zusätzlich können oxPL die Barrierefunktion des Endothels beeinflussen und die Expression von Genen mit Zell-protectiven Eigenschaften hochregulieren, wodurch die Regeneration des Gewebes unterstützt wird (Fu und Birukov 2009; Singleton *et al.* 2009).

### 3 DIE OXIDIERTEN FETTSÄUREFRAGMENTE PIMELIN- UND AZELAINSÄURE

Die oxidierten Fettsäurefragmente, die in Tieren an Phospholipide verestert vorliegen, sind in freier Form auch in Pflanzen bekannt. Wichtige Vertreter sind Azelainsäure (C9-Dicarbonsäure, AZA) und Pimelinsäure (C7-Dicarbonsäure, PIM), sowie deren putative Vorstufen 9-Oxononanonsäure (C9-Aldehyd, ONA) und 7-Oxoheptanonsäure (C7-Aldehyd, OHA).

Azelainsäure ist ubiquitär verbreitet. Sie wurde unter anderem im Medium von Laktose bildenden Bakterien (Broberg *et al.* 2007) und im Urin von Tieren (Jardines *et al.* 2003) nachgewiesen. Die freie Säure kommt in unterschiedlichen Pflanzenspezies in verschiedenen Organen vor (Zhang *et al.* 1993; Zhang *et al.* 2006; Jung *et al.* 2009; Gallagher *et al.* 2010). Sie konnte als Lipidperoxidationsprodukt identifiziert werden (Velasco *et al.* 2002; King *et al.* 2009). In niedrigen Konzentrationen kann AZA von *Pseudomonas* als Kohlenstoffquelle genutzt werden (Janota-Bassalik und Wright 1964). Therapeutisch wird AZA aufgrund ihrer antibiotischen und antimykotischen Eigenschaften bei Akne und Rosazea eingesetzt (Fleischer 2011). Weiterhin wurden für AZA antiproliferative und zytotoxische Effekte auf verschiedene Tumor Zellkulturen nachgewiesen (Fitton und Goa 1991).

In Pflanzen wurde eine wichtige biologische Rolle von AZA erst 2009 von Jung *et al.* beschrieben. Die Forschergruppe konnte zeigen, dass in *Arabidopsis* eine lokale und systemische Resistenz gegenüber dem Pathogen *Pseudomonas syringae* durch AZA induziert wird. Nach Infektion mit *Pseudomonas* kommt es zu einer Anreicherung von AZA im Phloemsaft. AZA induziert die Expression des AZELAIC

ACID INDUCED 1 (AZI1) Gens. Mit Hilfe einer *Arabidopsis* Mutantenlinie (*azi1*) dieses Proteins, das zur Familie der Lipid-Transfer-Proteine gehört, wurde nachgewiesen, dass dieses apoplastische Protein essentieller Bestandteil der systemisch erworbenen Resistenz (engl.: systemic acquired resistance, SAR) ist (Jung *et al.* 2009). AZI1 scheint auch eine Rolle in der Kältetoleranz von *Arabidopsis* zu spielen (Xu *et al.* 2011). Ein weiteres Protein der Lipid-Transfer-Proteinfamilie ist DEFECTIVE IN INDUCED RESISTANCE 1 (DIR1) (Maldonado *et al.* 2002), das an der Generierung und / oder Transduktion des systemischen Signals für die AZA-induzierte Resistenz beteiligt ist. AZA hat Einfluss auf die Akkumulation von Salicylsäure nach Pathogeninfektion, was Voraussetzung für die SAR ist und zur Expression von PATHOGENESIS RELATED (PR) Genen führt. AZA verleiht *Arabidopsis* eine Resistenz gegenüber *P. syringae* durch „Priming“ des SA-Signalweges (Shah 2009)

Sato *et al.* (2011) konnten zeigen, dass nach Behandlung der Blätter von *Capsicum annuum* mit einer Cellulase-Lösung Salicylsäure, Phenylalanin und AZA akkumulieren und die Pflanze eine erhöhte Resistenz gegen eine Virusinfektion aufweist. Bei *Pisum sativum* Keimlingen konnte nach Infektion eine Akkumulation von AZA detektiert werden (Mukhtarova *et al.* 2011). Zusammenfassend betrachtet scheint AZA also eine wichtige Rolle in der Antwort auf abiotischen und biotischen Stress in Pflanzen zu spielen.

Pimelinsäure ist ein Vorläufermolekül im Biosyntheseweg des essentiellen Vitamins Biotin (Vitamin B7 / Vitamin H). Nur Mikroben, Pilze und Pflanzen können Biotin synthetisieren. Säugetiere erhalten das Vitamin über die Nahrung und / oder über die intestinale Mikroflora. Die physiologische aktive Form von Biotin ist eine Enzym-gebundene prosthetische Gruppe, die Kohlenstoffdioxid in vielen metabolischen Carboxylierungs-, Decarboxylierungs und Transcarboxylierungsreaktionen transportiert. Biotin-abhängige Enzyme sind involviert in der Fettsäuresynthese, im Metabolismus von Aminosäuren und in der Gluconeogenese (Lin und Cronan 2011).

### **Biosynthese von AZA und PIM**

Die Biosynthese von PIM ist bisher nur in Bakterien aufgeklärt. Es sind zwei Wege bekannt: (1) der *E. coli* BioC-BioH und (2) der *B. subtilis* BioI-BioW Syntheseweg. Es gibt keine Hinweise, dass ein ähnlicher Biosyntheseweg in Pflanzen ablaufen kann.

Erst kürzlich konnte der *E. coli* BioC-BioH Syntheseweg für PIM aufgeklärt werden (Lin *et al.* 2010). Es handelt sich dabei um eine Modifizierung des Fettsäure Biosyntheseweges, bei dem die zwei Enzyme BioC und BioH die Hauptrolle spielen. Die Pimelat Synthese erfolgt hierbei in drei Hauptschritten und ist in Abbildung I-3 dargestellt.

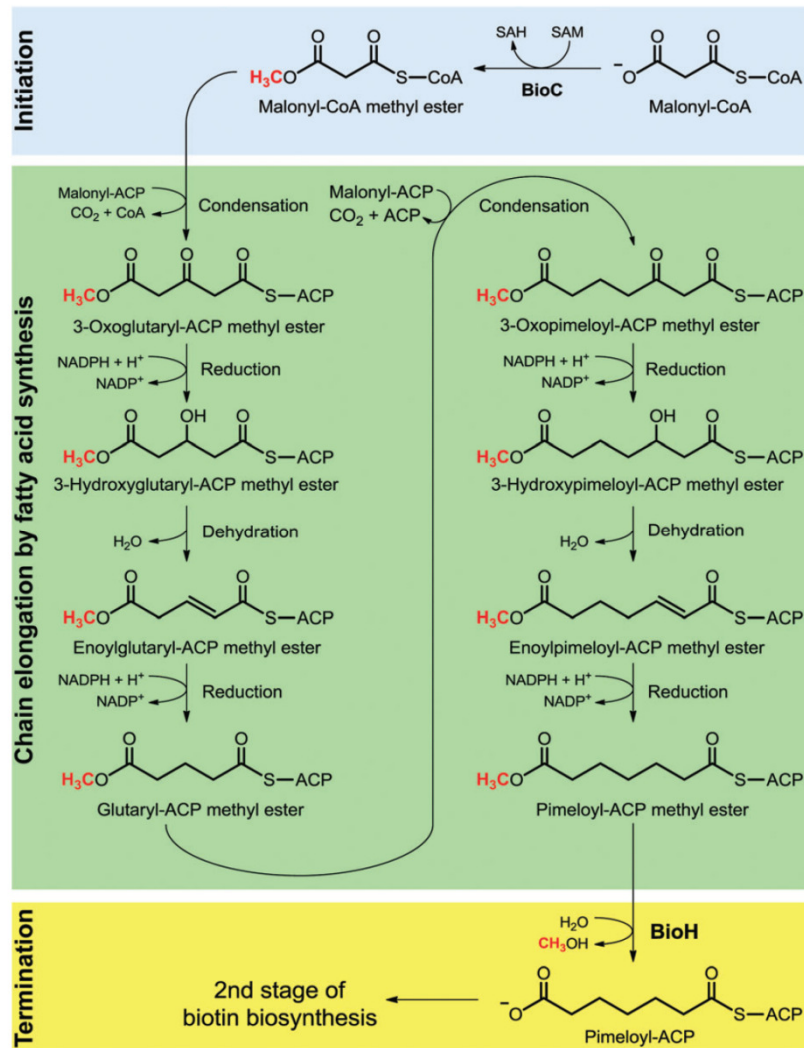


Abbildung I-3: Der *E. coli* BioC-BioH Biosyntheseweg von PIM; nach Lin und Cronan (2011). Die Synthese findet in drei Schritten statt. Im ersten Schritt katalysiert BioC die Methylierung von Malonyl-CoA. Im zweiten Schritt erfolgt eine Kettenverlängerung analog der Fettsäuresynthese. Nach zwei Zyklen entsteht der Pimeloyl-ACP Methyl Ester. Anschließend spaltet BioH den Methylester ab und beendet damit die Kettenreaktion. Es entsteht Pimeloyl-ACP, was als Substrat für die folgenden enzymatischen Schritte in der Biotin-Biosynthese dient.

Der erste Schritt ist die Übertragung einer Methylgruppe von S-Adenosylmethionin (SAM) auf die  $\omega$ -Carboxylgruppe von Malonyl-CoA. Katalysiert wird diese Methylierung durch die BioC O-Methyltransferase und es entsteht hierbei ein Malonyl-CoA-Methylester. Im zweiten Schritt erfolgt die Kettenverlängerung analog der Fettsäuresynthese. Die Acylkette ist hierbei an das Acyl-Carrier-Protein (ACP) gebunden. Nach zwei Zyklen der Kettenverlängerung entsteht der Pimeloyl-ACP Methylester. Anschließend spaltet BioH den Methylester ab und beendet damit die Kettenreaktion. Es entsteht Pimeloyl-ACP, was als Substrat für die folgenden enzymatischen Schritte in der Biotin-Biosynthese dient.

Neben *E. coli* ist *B. subtilis* der einzige Organismus, bei dem der Biosynthesemechanismus von PIM ebenfalls aufgeklärt ist. *B. subtilis* hat zwei Möglichkeiten Pimelat-Thioester zu gewinnen: (1) eine Pimeloyl-CoA Synthetase, die *bioW* codiert und (2) ein Cytochrom P450 Enzym, das *biol* codiert (Bower *et al.* 1996).

Die Pimeloyl-CoA Synthetase ermöglicht die Aufnahme von exogener PIM in den Biotin Syntheseweg. Homologe Enzyme wurden auch in anderen Bakterien charakterisiert, wobei der Ursprung von PIM unklar ist. PIM ist ein Molekül, was im zentralen Metabolismus nicht gefunden wird und es kommt auch nicht abundant in der Umwelt vor (Lin und Cronan 2011).

Im Gegensatz dazu bietet Biol eine *de novo* Synthese von Pimeloyl-ACP, indem es die oxidative Spaltung einer Kohlenstoffbindung von langkettigen Acyl-ACPs katalysiert (Stok und De Voss 2000). In Abbildung I-4 ist dieser Spaltungsmechanismus dargestellt.

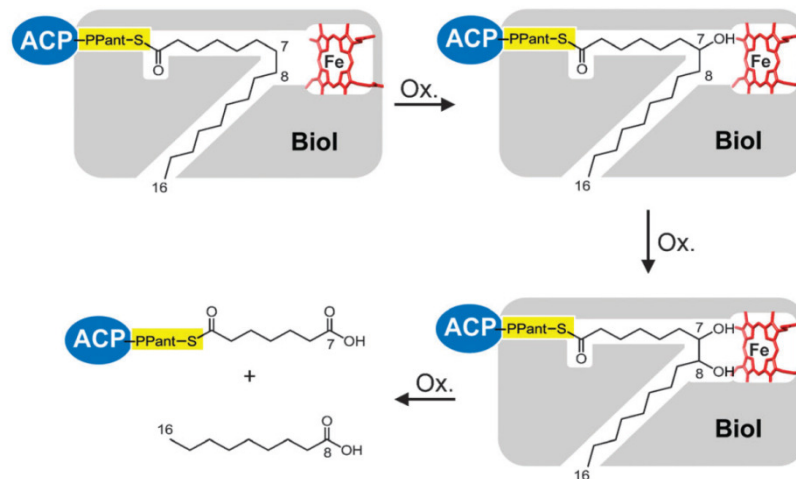


Abbildung I-4: Spaltung von langkettigen Acyl-ACPs durch Biol; nach Lin und Cronan (2011). Es findet unabhängig von der Acylkettenlänge eine Spaltung der C7-C8 Bindung statt, wodurch Pimeloyl-ACP und eine Monocarbonsäure entsteht.

Im Gegensatz zum *E. coli* BioC-BioH Syntheseweg sind beim *B. subtilis* Biol-BioW Weg noch viele Fragen ungeklärt. Es wurde noch nicht deutlich, ob beide Proteine (Biol und BioW) benötigt werden oder nicht. Die aktuelle Hypothese ist, dass Biol essentiell ist für die Synthese von Pimeloyl-ACP, während BioW PIM aus der Umwelt aufnimmt oder möglicherweise PIM, welches durch unspezifische Spaltung von freien Fettsäuren durch Biol entsteht. PIM könnte auch noch auf anderen Wegen entstehen und durch BioW zu Pimeloyl-CoA umgewandelt werden, da *B. subtilis* trotz einer Mutation im *biol* Gen, ein schlechtes Wachstum zeigt (Bower *et al.* 1996). Weiterhin ist ungeklärt, welches Substrat in *Bacillus* für die weitere Biotin Synthese genutzt wird.

In einigen Pflanzen, z. B. in *Pisum sativum*, kann die Biosynthese von AZA und dem Vorläufermolekül ONA über einen enzymatischen Weg ablaufen (Mukhtarova *et al.* 2011). Der Syntheseweg, bei dem die Enzyme 9-LOX und 9-HPL essentiell sind, ist in Abbildung I-5 (linke Seite) dargestellt. Linolen- bzw. Linolsäure (und die C16-Analoga), die aus Membranlipiden freigesetzt werden, dienen als Substrat für die 9-LOX. Als Produkt entsteht eine allylische 9-Hydroxyfettsäure, die durch die 9-HPL (CYP74C) in ein Hemiacetal-Derivat umgewandelt wird. Dieses instabile Produkt zerfällt in zwei Fragmente. Hierbei entsteht zum einen ONA (bzw. OHA) und als zweites Fragment flüchtige Aldehyde (Matsui 2006). ONA kann im Anschluss reduziert oder oxidiert werden, wobei 9-Hydroxynonanonsäure bzw. AZA entstehen (Mukhtarova *et al.* 2011). Analog kann OHA zu PIM oxidiert werden.

Nur wenige Pflanzen exprimieren eine funktionstüchtige 9-HPL (Matsui 2006; Chehab *et al.* 2008). Das bedeutet, dass der 9-HPL Biosyntheseweg auf eine kleine Gruppe an Pflanzenspezies beschränkt ist. In den restlichen Pflanzen muss es einen alternativen Weg geben. In den restlichen, bzw. in allen Pflanzen, könnte die Biosynthese durch nichtenzymatische Prozesse ablaufen. Durch eine Hock Fragmentierung entstehen aus dem 9-Hydroperoxid, analog zum 9-HPL Syntheseweg, ONA bzw. OHA (siehe Abbildung I-5, rechte Seite), die weiter zu AZA bzw. PIM oxidiert werden können.

Die Hock Fragmentierung ist eine bekannte Reaktion für benzyllische, allyllische und dienyllische Hydroperoxide. Um die Fragmentierung von schwachen Carboxylsäuren zu erreichen, werden hohe Temperaturen (60-80 °C) benötigt. Bei Raumtemperatur kann die Reaktion nur mit starken Säuren ablaufen (Schneider *et al.* 2008b). Diese unphysiologischen Bedingungen lassen schlussfolgern, dass die Hock Fragmentierung vermutlich nicht den Biosyntheseweg von AZA und PIM in Pflanzen darstellt.

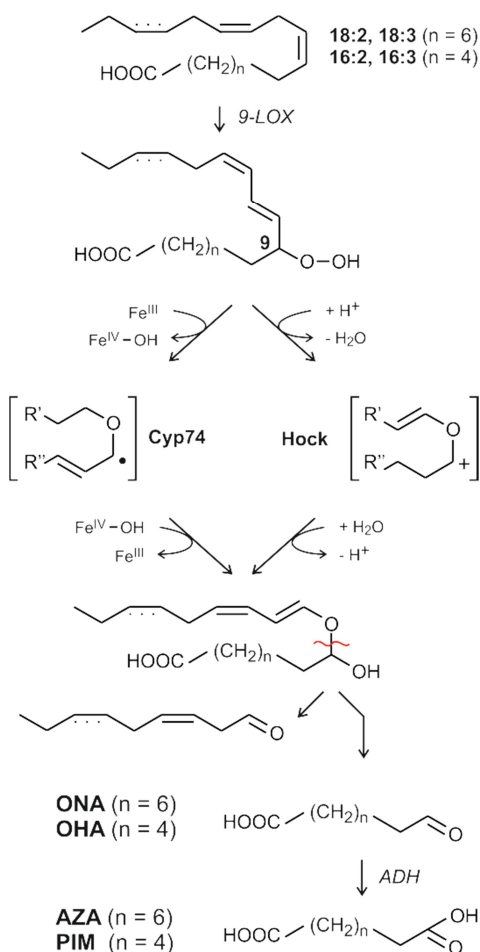


Abbildung I-5: Mögliche Biosynthesewege für Azelain- und Pimelinsäure: 9-HPL- und Hock Fragmentierung. Auf der linken Seite der Abbildung ist der 9-HPL-Weg nach Mukhtarova *et al.* (2011) dargestellt, der in einigen Pflanzen den Biosynthesemechanismus von AZA und PIM beschreibt. Einen nichtenzymatischen Weg stellt eine Hock Fragmentierung des 9-Hydroperoxids dar, wodurch ONA / OHA entstehen, die anschließend zu AZA / PIM oxidiert werden können.

Eine weitere Hypothese zum Syntheseweg von AZA bzw. PIM kann analog des Lipid-Dimer-Mechanismus der Arbeitsgruppe um Alan Brash formuliert werden. Die Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe führten zur Dimer-Hypothese, mit Hilfe derer z. B. die Synthese von 4-Hydroxynonenal (4-HNE) und einer Reihe an Epoxid-Verbindungen erklärt werden kann (Schneider *et al.* 2008a; Schneider *et al.* 2008b; Liu *et al.* 2011).

Bereits in den 1970ern wurde in Autoxidationsansätzen Fettsäureperoxid-Dimere gefunden. Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesen Dimeren um potente Moleküle handelt, die die Lipid-peroxidation vorantreiben (Morita und Fujimaki 1973a; Morita und Fujimaki 1973b). Diesen Peroxiden wurde auch schon früh eine Rolle als Vorläufermoleküle in der Entstehung von Aldehyden, wie z. B. Hexanal, 2-Octenal und 2,4-Dienal, zugeschrieben (Morita und Tokita 1990; Morita und Tokita 1993). Die aktiven Komponenten konnten schließlich als Verbindungen, die mit Peroxid-

Dimern verknüpft sind und die zwei Hydroperoxygruppen beinhalten, identifiziert werden (Morita und Tokita 2006). Auch die Arbeitsgruppe um Takashi Kaneda untersuchte bereits in den 1980er Jahren die Bildung von Dimeren während der Lipidperoxidation von Linolensäure. Sie veröffentlichten mehrere Artikel, in welchen die Analysen zur Struktur der Dimer-Verbindungen und deren Fragmente beschrieben sind (Miyashita *et al.* 1982a; Miyashita *et al.* 1982b; Miyashita *et al.* 1984; Miyashita *et al.* 1985a; Miyashita *et al.* 1985b).

Die Reaktionen der Dimer-Hypothese der Arbeitsgruppe um Alan Brash sind in Abbildung I-6 dargestellt. Das Schema zeigt die Synthese von 4-Hydroxyperoxynonenal (4-HPNE), weiterer Aldehyde und Epoxyverbindungen als Oxidationsprodukte von 15-Hydroxyperoxyeicosatriensäure (15-HPETE) (Schneider *et al.* 2008b). Im ersten Schritt (I) attackiert ein Peroxylradikal die 11,12-Doppelbindung in einem 15-HPETE Molekül, wodurch ein allylisches Kohlenstoffradikal entsteht. Das ungepaarte Elektron des Radikals ist über C12 bis C14 delokalisiert (II). Die zwei möglichen anschließenden Reaktionen des Kohlenstoffradikals sind hauptsächlich von der lokalen Verfügbarkeit von molekularem Sauerstoff abhängig. Falls Sauerstoff nicht verfügbar ist, kann das C12-Radikal die Peroxid Brücke des Dimers angreifen und eine homolytische Spaltung induzieren. Dies resultiert in der Bildung eines Epoxyhydroperoxids und eines Alkoxyradikals, das weitere Umwandlungen durchlaufen kann. Wenn molekularer Sauerstoff zur Verfügung steht, reagiert das Kohlenstoffradikal zu einem neuen Peroxylradikal (III). Das Peroxyl kann durch Wasserstoff Abstraktion zu einem Hydroperoxid reduziert werden, was in einer Dimerstruktur (IV) resultiert. Alternativ kann das Peroxyl an der 11,12-Doppelbindung eines dritten 15-HPETE Moleküls angreifen und zu einem Fettsäure Trimer reagieren. Dieser Prozess kann weiterlaufen und resultiert in einer Oligomerisierung von Fettsäuren. Der durch Wasserstoff Abstraktion gebildete Dimer (IV) ist anfällig für eine Spaltung der Peroxidbindungen, besonders des „cross“-molekularen Peroxids (V). Dies führt zu einem Bruch der Kohlenstoffkette und zur Produktion von zwei Aldehyden (VI), in diesem Fall 11-Oxoundeca-5,8-dienonsäure und 4-HPNE.



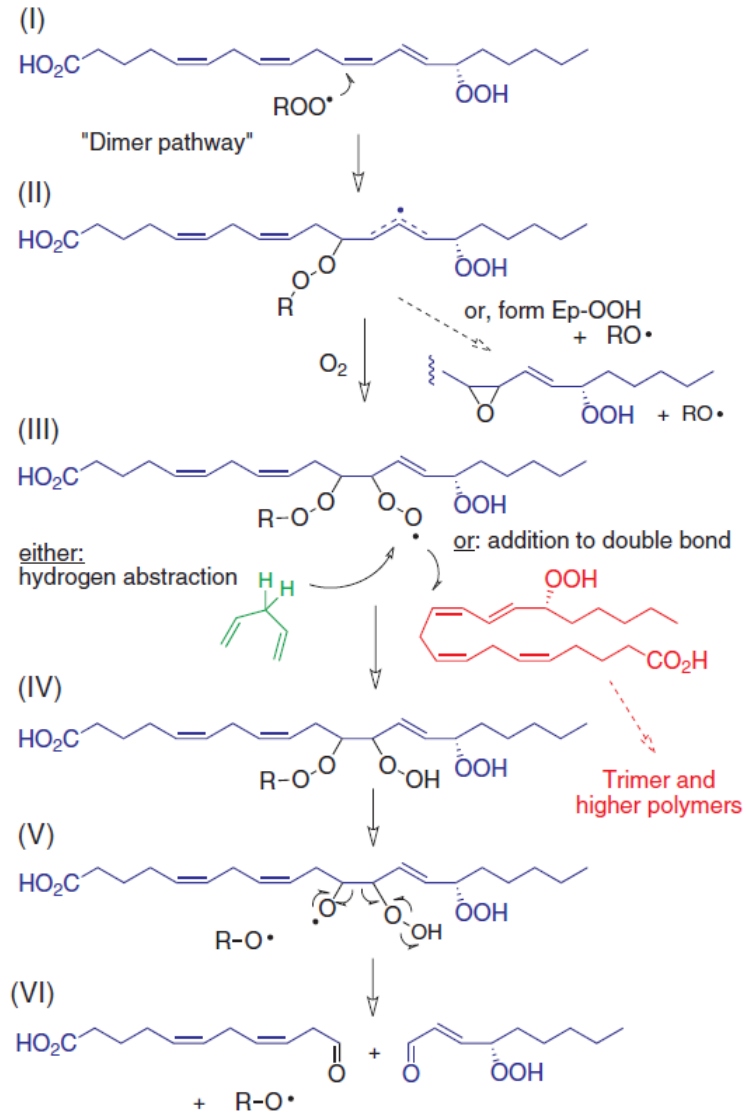


Abbildung I-6: Dimer-Hypothese der Arbeitsgruppe um Alan Brash; nach Schneider *et al.* (2008b). Das Schema zeigt die Synthese von 4-Hydroxyperoxynonenal (4-HPNE), weiterer Aldehyde und Epoxyverbindungen als Oxidationsprodukte von 15-Hydroxyperoxyeicosatriensäure (15-HPETE).

Die Biosynthese von AZA / PIM bzw. den putativen Vorstufen ONA / OHA in Pflanzen könnte nach dieser Dimer-Hypothese rein nichtenzymatisch ablaufen. Bisher ist allerdings völlig unklar, welche Fettsäuren als Substrat für die Biosynthesereaktion dienen könnten und ob der beschriebene Mechanismus in Pflanzen möglich ist.

#### 4 ZIEL DER ARBEIT

Die Biosynthese von Dicarbonsäuren und auch deren Aldehyd-Vorstufen ist in den meisten Pflanzen noch unklar. Wichtige, bekannte Dicarbonsäuren sind Pimelinsäure (PIM) und Azelainsäure (AZA) mit den putativen Vorstufen, den Aldehyden 7-Oxoheptanonsäure (OHA) und 9-Oxononanonsäure (ONA).

Es besteht großes Interesse die Biosynthesemechanismen und die Regulation der Synthese dieser Substanzen aufzuklären, da diese Substanzen in wichtige biologische Prozesse involviert sind. PIM ist ein essentielles Vorläufermolekül in der Biotin-Biosynthese von Mikroben, Pilzen und Pflanzen. Bisher konnte die Biosynthese von PIM nur in *E. coli* und *B. subtilis* aufgeklärt werden (Cronan und Lin 2011). Es gibt keine Hinweise auf einen analogen Mechanismus in Pflanzen. AZA ist ubiquitär verbreitet und wird therapeutisch bei Hautkrankheiten eingesetzt. Eine biologische Aktivität von AZA bei Pflanzen konnte erst 2009 von Jung *et. al* beschrieben werden. Diese Forschergruppe identifizierte AZA als Metabolit, der nach Infektion mit dem Pathogen *Pseudomonas* vermehrt im Phloemsaft von *Arabidopsis* vorhanden ist und der in Pflanzen eine lokale und systemische Resistenz gegenüber dem Pathogen induziert.

In Tieren sind Fettsäurefragmente ebenfalls Gegenstand aktueller Forschung. Es ist bekannt, dass eine nichtenzymatische oxidative Fragmentierung von Fettsäurehydroperoxiden in komplexen Membranlipiden als Folge von oxidativem Stress abläuft. Phospholipide mit veresterter ONA/ AZA spielen aufgrund ihrer Struktur eine Rolle als endogene Liganden bei Reaktionen des angeborenen Immunsystems.

In Pflanzen wurden die fragmentierten Fettsäuren bisher noch nicht in komplexen Lipiden identifiziert. Ebenfalls sind der Ablauf und die Regulationsmechanismen der Biosynthesereaktion dieser Fettsäurefragmente noch ungeklärt.

Ziel dieser Arbeit war es, die Mechanismen der Oxidation von Fettsäuren und deren Fragmentierung aufzuklären. Hierbei wurden verschiedene Hypothesen, die in der Einleitung bereits beschrieben wurden, überprüft. Weiterhin sollte die Rolle dieser oxidierten Fragmente in der Immunantwort der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* untersucht werden.

## II ERGEBNISSE

Die neun Kohlenstoff lange Dicarbonsäure Azelainsäure (AZA) wurde u. a. von Jung *et al.* (2009) im Phloemsaft von *Arabidopsis thaliana* nachgewiesen. Nach Infektion mit *Pseudomonas syringae* kam es zu einer 6,2-fachen Akkumulation dieses Metaboliten. Die Analyse erfolgte mittels Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (GC/MS). Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass AZA in der Pflanze eine lokale und systemische Resistenz gegenüber dem Pathogen *P. syringae* induziert. Pimelinsäure (PIM), die sieben Kohlenstoff lange Dicarbonsäure, stellt einen essentiellen Vorläufer in der Biotin Biosynthese dar.

Abgesehen von der Publikation von Jung *et al.* (2009), gibt es keine weiteren Studien, die eine Rolle für AZA oder PIM in der pflanzlichen Stressantwort belegen. Überdies ist die Biosynthese der Dicarbonsäuren in Pflanzen noch weitgehend ungeklärt. In einigen Pflanzen, jedoch nicht in *Arabidopsis*, kann AZA auf einem 9-HPL vermittelten Weg synthetisiert werden. Nur wenige Pflanzen exprimieren eine funktionstüchtige 9-HPL (Matsui 2006; Chehab *et al.* 2008), daher ist der 9-HPL Biosyntheseweg auf eine kleine Gruppe an Organismen beschränkt und in den restlichen Pflanzen muss es einen alternativen Syntheseweg geben.

Zunächst wurde eine Methode entwickelt, die den schnellen und eindeutigen Nachweis der Fettsäurefragmente ermöglicht. Aus Pflanzenmaterial wurde ein Rohextrakt hergestellt, der anschließend chromatographisch mittels Ultra-Hochleistungsflüssigchromatographie (Ultra High Performance Liquid Chromatographie, UHPLC) aufgetrennt wurde. Die Detektion erfolgte an einem Triple Quadrupol Massenspektrometer nach Elektrospray-Ionisierung im negativen (ESI<sup>-</sup>) Modus. Die Detektion der Analyten fand hierbei im „multiple reaction monitoring“ (MRM) Modus statt. Bei diesem Modus werden zunächst die gewünschten Molekül-Ionen („Parent“-Ionen) anhand ihres Masse/Ladungs-Verhältnisses ( $m/z$ ) im ersten Quadrupol des Massenspektrometers selektiert. In der Kollisionszelle werden diese Ionen anschließend durch Reaktion mit Argon fragmentiert. Im dritten Quadrupol werden ausschließlich die spezifischen Fragmente isoliert und im Detektor registriert. Somit ist ein sehr selektiver und spezifischer Nachweis der einzelnen Analyten möglich.

### 1 NACHWEIS VON AZA UND PIM IN *A. THALIANA* NACH VERSCHIEDENEN ARTEN VON STRESS

Einzelne Blätter von *A. thaliana* Wildtyp Pflanzen (Ecotyp Col0) wurden mit verschiedenen Arten von Stress behandelt. Anschließend wurden die entsprechenden Blätter geerntet und in Stickstoff

schockgefroren. Das homogenisierte Pflanzenmaterial wurde extrahiert und aus den gewonnenen Rohextrakten wurden anschließend die Spiegel verschiedener Oxylipine bestimmt.

### 1.1 INFEKTION MIT DEM PATHOGEN *PSEUDOMONAS SYRINGAE*

Die Pflanzen wurden mit dem virulenten und dem avirulenten Stamm von *Pseudomonas syringae pathovar tomato* DC3000 infiziert. Hierzu wurde eine Bakteriensuspension ( $10^8$  Kolonie bildenden Einheiten pro Milliliter) mit Hilfe einer Spritze durch die Stomata in die Blätter gedrückt (Infiltration). Als Kontrolle erfolgte eine Infiltration mit Magnesiumsulfat, dem Puffer, in dem die Bakterien resuspendiert waren. Die infiltrierten Blätter wurden nach verschiedenen Zeitpunkten (0 bis 24 Stunden nach Infiltration) geerntet. Es wurden sowohl die Spiegel der Fettsäurefragmente AZA und PIM bestimmt, als auch die Spiegel an nichtenzymatisch (16-Hydroxyfettsäure, 16-OH-18:3 und F<sub>1</sub>-Phytosteran, PPF<sub>1</sub>) bzw. enzymatisch (12-Oxo-Phytodiensäure, OPDA und Jasmonsäure, JA) gebildeten Marker-Oxylipinen. Die Ergebnisse der Infektionskinetik sind in Abbildung II-1 dargestellt. Nach Infektion mit avirulenten Bakterien waren die Spiegel aller untersuchten Lipidspezies zwischen fünf und zehn Stunden nach Infektion erhöht. Die höchsten AZA und PIM Spiegel wurden nach 24 Stunden beobachtet. Bei den Fettsäurefragmenten kam es insgesamt nur zu einem 3- bis 4-fachen Anstieg. Die nichtenzymatisch gebildeten Spezies waren nach Infektion um ein 5- bis 10-faches höher, während es bei der enzymatisch gebildeten Jasmonsäure zu einer mehr als 75-fach gesteigerten Akkumulation kam.

Nach Infektion mit dem virulenten Bakterienstamm war bei allen Oxylipinen nur ein geringer und zeitlich verzögerter Anstieg zu beobachten.

Die frühe nichtenzymatische und enzymatische Oxylipin Biosynthese sind Merkmal der inkompatiblen Interaktion von *P. syringae* mit *A. thaliana*.

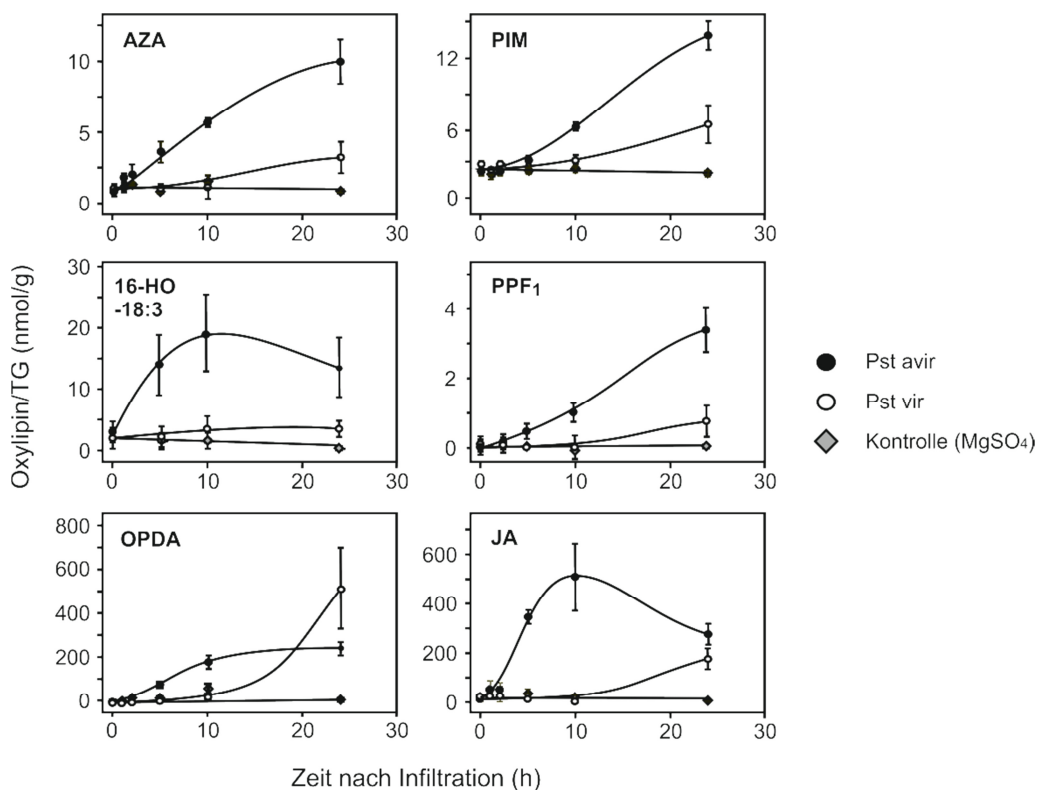


Abbildung II-1: Akkumulation freier oxidiertes Fettsäuren in *Arabidopsis thaliana* Col0 nach Pathogeninfektion. Dargestellt sind die Spiegel der Fettsäurefragmente AZA und PIM, ebenso wie die Spiegel an nichtenzymatisch (16-HO-18:3 und PPF<sub>1</sub>) bzw. enzymatisch (OPDA, JA) gebildeten Marker-Oxylipinen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infiltration mit avirulenten (avir) oder virulenten (vir) *Pseudomonas syringae* (Pst) bzw. Infiltration mit Magnesiumsulfat (MgSO<sub>4</sub>) als Kontrolle (MW±SD, n=3).

## 1.2 VERWUNDUNG

Als weitere Möglichkeit zur Auslösung von Stress, wurden einzelne Blätter von *Arabidopsis* mit Hilfe einer Pinzette verwundet. Auch hier wurde eine Kinetik der Spiegel verschiedener Oxylipine erstellt. Wie in Abbildung II-2 zu sehen, kam es nach Verwundung zu einer raschen Akkumulation von AZA, PIM und den Jasmonaten. Innerhalb von vier Stunden waren 4- bis 5-fach erhöhte AZA- bzw. PIM-Spiegel detektierbar. Am Ende der hier dargestellten Zeitkurve (10 Stunden) erreichten beide Fragmentspezies ihre Maxima. Die Jasmonate zeigten bereits nach ein bis zwei Stunden die höchsten Werte mit einem etwa 250-fachen Anstieg.

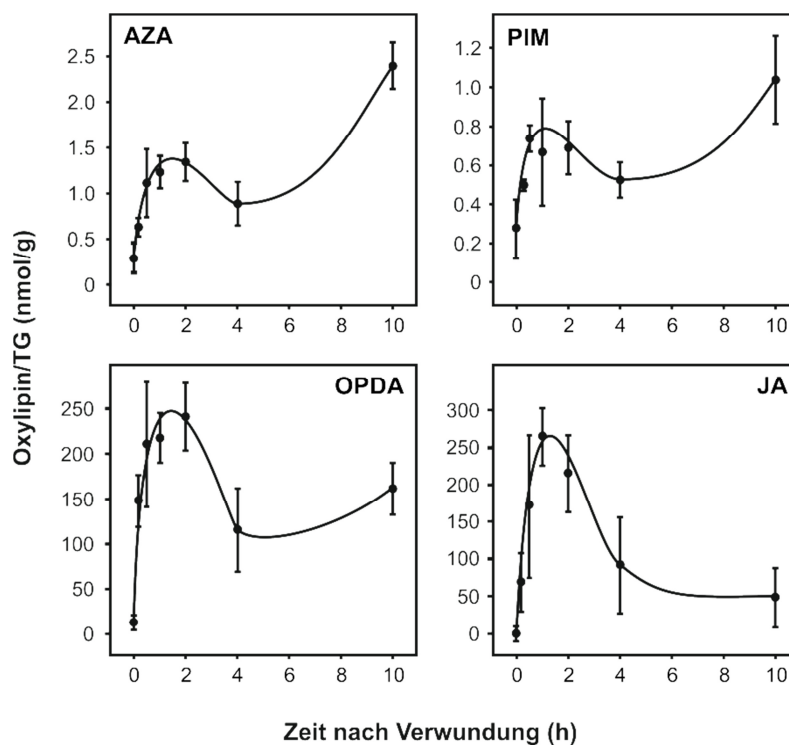


Abbildung II-2. Akkumulation freier oxidiertes Fettsäuren in *Arabidopsis thaliana* Col0 nach Verwundung. Dargestellt sind die Spiegel der Fettsäurefragmente AZA und PIM, ebenso wie die Spiegel an enzymatisch (OPDA, JA) gebildeten Marker-Oxylipinen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Verwundung mit einer Pinzette (MW $\pm$ SD, n=3).

### 1.3 BEHANDLUNG MIT HOCHLICHT

Die Arbeitsgruppe um Christian Triantaphylides (Commissariat à l'Énergie Atomique, CEA, Cadarache, Frankreich) führt diverse Experimente zur Antwort der Pflanzen auf Hochlichtstress durch. Freundlicherweise wurde uns Pflanzenmaterial zur Verfügung gestellt, welches aus einem Hochlicht-Experiment stammt. Daher konnte auch der Einfluss von Hochlichtstress auf die Biosynthese von AZA und PIM untersucht werden.

*Arabidopsis* Wildtyp Pflanzen wurden unter Hochlicht-Lampen (1500  $\mu$ E) gestellt. Nach zwei verschiedenen Zeitpunkten (50 und 74 Stunden) wurden die Blätter dieser Pflanzen geerntet und einer Lipidanalyse unterzogen. Wie in Abbildung II-3 zu erkennen, führte auch diese Stressbehandlung zu einer Akkumulation von AZA und PIM. Nach 50 Stunden Hochlicht kam es nur zu einem geringen Anstieg ( $\sim$ 2-fach) an AZA, PIM und OPDA. Die Jasmonsäurespiegel zeigten zum frühen Zeitpunkt keine Veränderung, stiegen aber nach 74 Stunden auf das doppelte (25 nmol/g Trockengewicht) an. Im Gegensatz dazu kam es sowohl bei den Dicarbonsäuren, als auch bei OPDA nach 74 Stunden zu einer etwa 10-fachen Akkumulation im Vergleich zur Kontrolle (0 h).

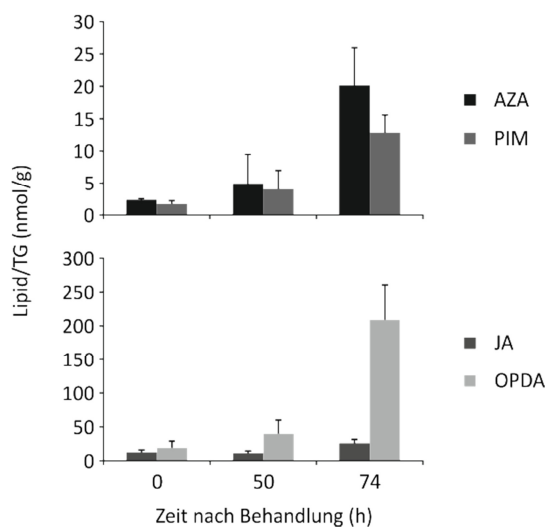


Abbildung II-3: Akkumulation freier oxidiertes Fettsäuren in *Arabidopsis thaliana* Col0 nach Behandlung mit Hochlicht. Dargestellt sind die Spiegel der Fettsäurefragmente AZA und PIM, ebenso wie die Spiegel an enzymatisch (OPDA, JA) gebildeten Marker-Oxylipinen nach verschieden langer Inkubation der Pflanzen unter Hochlichtbedingungen (MW+SD, n=3).

#### 1.4 OXIDATIVER STRESS DURCH KUPFERSULFAT BEHANDLUNG

Eine weitere Möglichkeit oxidativen Stress in der Pflanze hervorzurufen stellt die Behandlung mit Kupfersulfat dar. Für dieses Experiment wurden zehn Tage alte Keimlinge verwendet, die in Flüssigmedium herangezogen wurden. Dies ermöglicht eine vereinfachte Applikation, da das Kupfersulfat direkt ins Wachstumsmedium gegeben wird. Die Endkonzentration an Kupfersulfat betrug 500  $\mu\text{M}$ . Die Inkubation erfolgte für 1,5 bzw. 24 Stunden.

Die kurze Behandlung (1,5 Stunden) bewirkte keine Veränderung der Spiegel an AZA, PIM, JA oder OPDA, wie in Abbildung II-4 zu erkennen ist. Nach 24 Stunden konnten bei allen Oxylipinen erhöhte Werte detektiert werden. Während AZA und OPDA um das 8- bis 10-fache anstiegen, konnte bei PIM und JA ein etwa 4- bis 5-facher Anstieg verzeichnet werden.

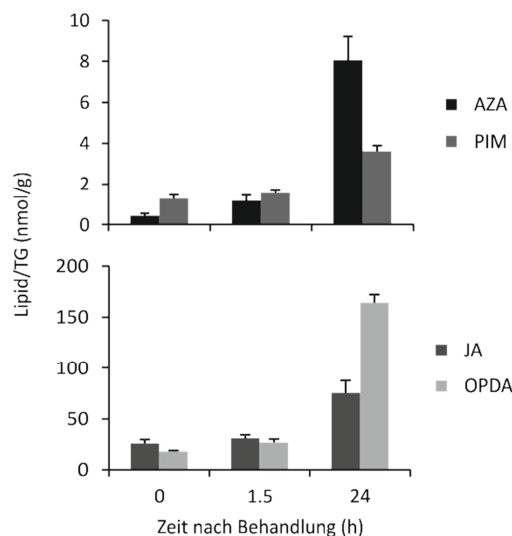


Abbildung II-4: Akkumulation freier oxidiertes Fettsäuren in *Arabidopsis thaliana* Col0 Keimlingen nach Behandlung mit Kupfersulfat als Auslöser von oxidativem Stress. Dargestellt sind die Spiegel der Fettsäurefragmente AZA und PIM, ebenso wie die Spiegel an enzymatisch (OPDA, JA) gebildeten Marker-Oxylipinen nach verschieden langer Inkubation der Keimlinge in einer 500  $\mu$ M Kupfersulfatlösung (MW+SD, n=3).

## 2 HYPOTHESEN ZUR BIOSYNTHESE VON AZA UND PIM: MUTANTENSREEN

Zur Aufklärung des Biosyntheseweges von AZA bzw. PIM wurde die Rolle verschiedener Enzyme in diesem Prozess untersucht. Die Kinetik aus Abbildung II-1 zeigte, dass es 24 Stunden nach Infektion mit avirulenten *Pseudomonas* zu einer deutlichen Akkumulation von AZA und PIM kam. Daher wurden für das folgende „Screening“ verschiedene Mutanten für 24 Stunden mit avirulenten Bakterien infiziert. Anschließend erfolgte eine Lipidanalyse.

### 2.1 SUBSTRAT DER BIOSYNTHESEREAKTION

Bisher ist unklar, welche Vorläufermoleküle für die Synthese von AZA bzw. PIM genutzt werden. Möglich wäre, dass nur dreifach ungesättigte Fettsäuren das Substrat für die Biosynthesereaktion darstellen. Es erfolgte daher die Analyse der Mutante *fad3,7,8*, die keine dreifach ungesättigten Fettsäuren besitzt (McConn und Browse 1996). Dreifach ungesättigten Fettsäuren sind in dieser Mutante durch zweifach ungesättigte Fettsäuren ersetzt. Darüber hinaus wurde publiziert, dass eine Induktion der systemischen Resistenz unter anderem von der chloroplastidären Fettsäure Desaturase 7 (FATTY ACID DESATURASE 7, FAD7) abhängig ist (Chaturvedi *et al.* 2008). Diese Abhängigkeit konnte ebenfalls mit Hilfe der Triple Mutante untersucht werden.



Sowohl unter basalen Bedingungen, als auch 24 Stunden nach Infektion mit *P. syringae*, akkumulierte die Mutante im Vergleich zum Wildtyp vergleichbare Spiegel an AZA und PIM sowohl in den lokalen als auch in den systemischen Blättern. Diese Ergebnisse sind in Abbildung II-5 dargestellt.

Die Triple Mutante *fad3,7,8* ist folglich sowohl unter basalen Bedingungen, als auch nach Infektion mit *P. syringae* nicht in der Biosynthese von AZA und PIM beeinträchtigt.

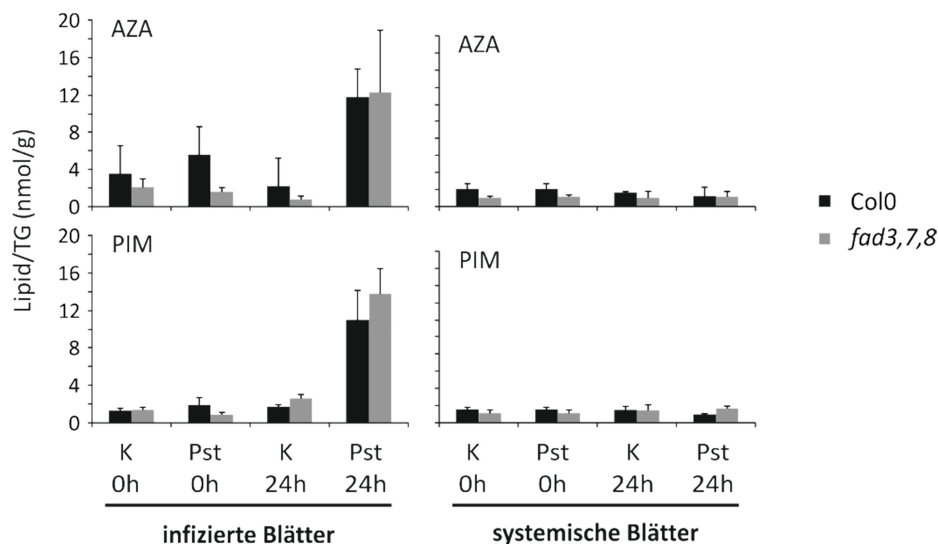


Abbildung II-5: Akkumulation von AZA und PIM nach Pathogenbehandlung im *Arabidopsis* Wildtyp Col0 und in der Mutante *fad3,7,8*. Dargestellt sind die Spiegel der Fettsäurefragmente AZA und PIM, 0 und 24 Stunden nach Infiltration von Col0 und *fad3,7,8* mit avirulenten *P. syringae* bzw. Magnesiumsulfat als Kontrolle. Die Spiegel der Fettsäurefragmente wurden sowohl in infizierten, als auch in systemischen Blättern bestimmt (MW+SD, n=3).

## 2.2 DIE ROLLE VON 9-LIPOXYGENASEN

In einigen Pflanzen kann die Biosynthese von AZA über einen enzymatischen Weg ablaufen (Mukhtarova *et al.* 2011). In diesem Syntheseweg sind 9-Lipoxygenasen (9-LOX) und 9-Hydroperoxidlyasen (9-HPL) essentiell. In *Arabidopsis* sind zwei 9-LOX bekannt (LOX1 und LOX5), die beide cytosolisch exprimiert werden. Eine Beteiligung der 9-LOX an der Biosynthese wurde mit T-DNA Insertionslinien, bei denen eines bzw. beide Gene komplett defizient sind, untersucht. Da die Mutanten aus dem *Arabidopsis* Ecotyp Wassilewskija generiert wurden, erfolgte als Kontrolle die Analyse dieses Wildtyp Ecotyps.

Wie in Abbildung II-6 zu sehen, akkumulierten sowohl die Einzelmutanten als auch die Doppelmutante 24 Stunden nach Infektion Wildtyp-Spiegel an AZA und PIM in den lokalen Blättern. In den systemischen Blättern konnte in keiner der untersuchten Linien ein Anstieg der Menge der

Fettsäurefragmente beobachtet werden. 9-LOX spielen daher keine essentielle Rolle in der Biosynthese von AZA und PIM.

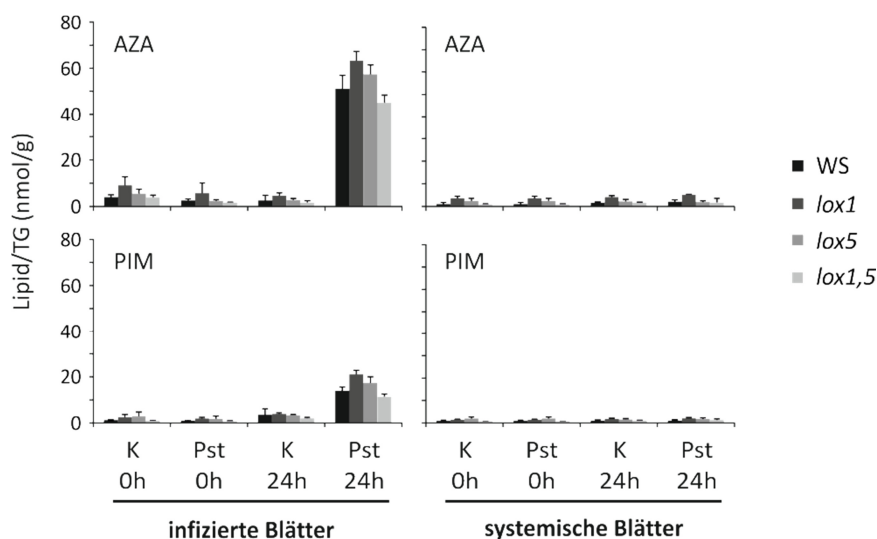


Abbildung II-6: Akkumulation von AZA und PIM nach Pathogenbehandlung im *Arabidopsis* Wildtyp WS und in den 9-LOX Mutanten. Dargestellt sind die Spiegel der Fettsäurefragmente AZA und PIM, 0 und 24 Stunden nach Infiltration von WS, *lox1*, *lox5* und *lox1,5* mit avirulenten *P. syringae* bzw. Magnesiumsulfat als Kontrolle. Die Spiegel der Fettsäurefragmente wurden sowohl in infizierten, als auch in systemischen Blättern bestimmt (MW+SD, n=3).

### 2.3 DIE ROLLE DER 13-LIPOXYGENASE LOX2

Um eine mögliche Rolle von Lipoxygenasen im Biosyntheseweg von AZA und PIM aufzuklären, erfolgte auch die Analyse der 13-LOX Mutante *lox2-1* (Bell *et al.* 1995).

Wie in Abbildung II-7 ersichtlich, unterschieden sich die basalen Werte an AZA und PIM in *lox2-1* nicht vom Wildtyp. Nach Infiltration mit *P. syringae* kam es zu einem vergleichbaren Anstieg von AZA in der Mutante. Die PIM Spiegel schienen in *lox2-1* im Vergleich zum Wildtyp nach Infektion in dieser Analyse erniedrigt. Das Infiltrationsexperiment wurde mit der LOX2 Mutante mehrmals durchgeführt. In den anderen Experimenten unterschieden sich die Spiegel an PIM kaum. Es war auch zu beobachten, dass es manchmal zu einer geringeren Akkumulation von AZA in *lox2-1* im Vergleich zum Wildtyp kam. Zusammengefasst betrachte, scheint LOX2 nicht essentiell für die Biosynthese von AZA und PIM zu sein.

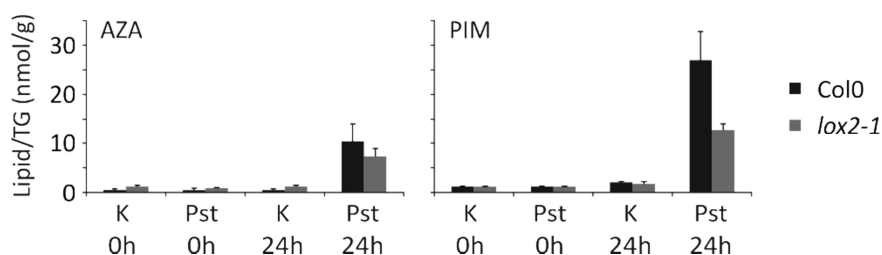


Abbildung II-7: Akkumulation von AZA und PIM nach Pathogenbehandlung im *Arabidopsis* Wildtyp Col0 und in der 13-LOX Mutante *lox2-1*. Dargestellt sind die Spiegel der Fettsäurefragmente AZA und PIM, 0 und 24 Stunden nach Infiltration von Col0 und *lox2-1* mit avirulenten *P. syringae* bzw. Magnesiumsulfat als Kontrolle (MW+SD, n=3).

## 2.4 DIE ROLLE VON PROTEINEN DER LIPID-TRANSFER-PROTEINFAMILIE

Es wurde postuliert, dass das Protein AZELAIC ACID INDUCED 1 (AZI1), ein Mitglied der Lipid-Transfer-Proteinfamilie, an der lokalen Produktion oder / und dem Transport von AZA beteiligt ist (Jung *et al.* 2009). Ein weiteres Protein der Lipid-Transfer-Proteinfamilie, DEFECTIVE IN INDUCED RESISTANCE 1 (DIR1), scheint ebenfalls eine Rolle in der Biosynthese oder dem Transport des systemischen Signals zu spielen (Chaturvedi *et al.* 2008). Es wurden Mutantenlinien dieser Proteine analytisch untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung II-8 dargestellt.

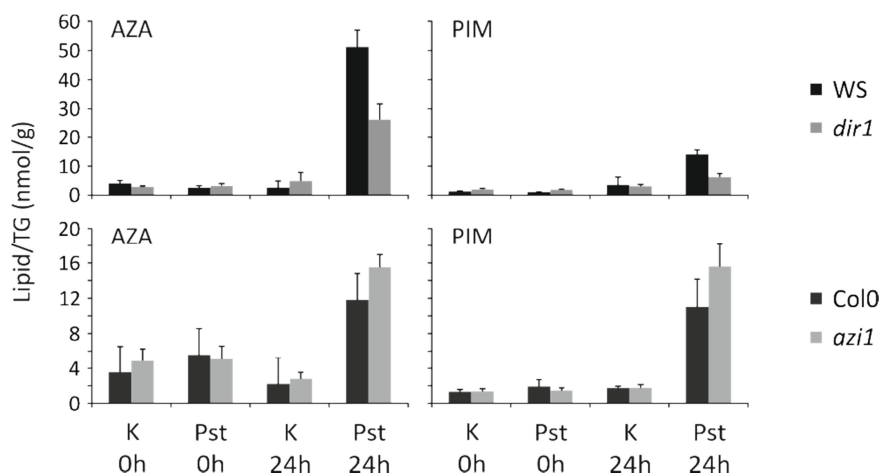


Abbildung II-8: Akkumulation von AZA und PIM nach Pathogenbehandlung im *Arabidopsis* Wildtyp Col0 bzw. WS und den Mutantenlinien von Mitgliedern der Lipid-Transfer-Proteinfamilie, *dir1* und *azi1*. Dargestellt sind die Spiegel der Fettsäurefragmente AZA und PIM, 0 und 24 Stunden nach Infiltration mit avirulenten *P. syringae* bzw. Magnesiumsulfat als Kontrolle (MW+SD, n=3).

Die Mutante *dir1* zeigte im Vergleich zum Wildtyp (Wassilewskija) nach Infektion mit *P. syringae* nur eine etwa halb so große Akkumulation von AZA und PIM. Zwischen *azi1* und Col0 waren keine

Unterschiede in den Spiegeln der beiden Fettsäurefragmente, sowohl basal als auch nach Infektion, detektierbar.

Die beiden untersuchten Proteine AZI1 und DIR1 scheinen ebenfalls keine essentielle Rolle in der Biosynthese von AZA bzw. PIM zu spielen.

### 3 OXIDATION VON FETTSÄUREN *IN VITRO*

Alternativ zur enzymatischen Biosynthese könnten die Fettsäurefragmente auch durch nichtenzymatische Oxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren entstehen. Bei der nichtenzymatischen Oxidation werden zwei verschiedene Mechanismen, die Oxidation mittels Singulett Sauerstoff und ein Radikal-vermittelter Weg, unterschieden. Die radikalische Lipidperoxidation von Linolensäure führt zur Bildung von vier Hydroperoxid-Isomeren (9-, 12-, 13- und 16-Hydroperoxid). Oxidation mittels Singulett Sauerstoff führt zusätzlich zur Bildung des 10- und 15-Hydroperoxids, wobei bei diesem Oxidationsmechanismus alle Isomere in gleichen Mengen entstehen (Frankel 1998; Triantaphylides *et al.* 2008).

Zur weiteren Aufklärung des Biosynthesemechanismus von AZA und PIM wurden *in vitro* Oxidationen mit verschiedenen Substraten durchgeführt. Hierbei wurden die Fettsäuren zum einen einer Dünnfilm-Oxidation (Radikal-katalysierter Mechanismus) und zum anderen einer Photooxidation (Singulett Sauerstoff) unterzogen.

#### 3.1 DÜNNFILM-OXIDATION

Es wurden Kinetiken der radikalischen Oxidation von Linol- und Linolensäure erstellt. Hierzu wurde die entsprechende Fettsäure als dünner Film unter Ausschluss von Licht an Luftsauerstoff oxidiert. Nach verschiedenen Zeitpunkten (0 bis 4 Tage) wurden die entstandenen Hydroperoxide mittels Triphenylphosphin zu Hydroxyfettsäuren reduziert und analysiert. Neben den Mengen an entstandenen Hydroperoxyfettsäuren (bestimmt als HODE bzw. HOTE) wurden auch die Mengen an entstandenen Fettsäurefragmenten (ONA und AZA) bestimmt. Die Kinetiken sind am Beispiel von Linolsäure in Abbildung II-9 und für Linolensäure in Abbildung II-10 dargestellt.

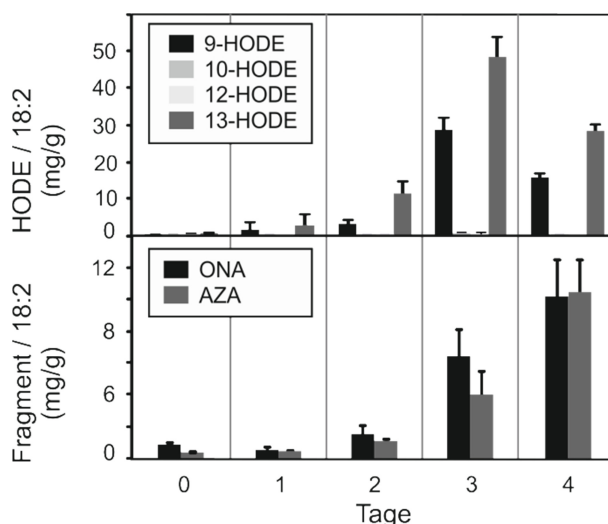


Abbildung II-9: Kinetik verschiedener Produkte der radikalischen Lipidperoxidation von Linolsäure. Dargestellt sind die Spiegel an Hydroxyfettsäuren und an den Fettsäurefragmenten ONA und AZA nach 0 bis 4 Tagen (MW+SD, n=3).

Die Radikal-katalysierte Oxidation von Linolsäure führte innerhalb von drei Tagen zu einer starken Akkumulation von Hydroperoxyfettsäuren. Am vierten Tag konnte bereits wieder ein Absinken der Gesamtmenge an Hydroperoxyfettsäuren beobachtet werden. Im Gegensatz dazu stiegen die Mengen an AZA und dem putativen Vorläufermolekül ONA im Laufe von vier Tagen stark an und erreichten erst zum Ende der Zeitkurve ein Maximum. Es konnten vergleichbare Mengen an ONA und AZA detektiert werden.

Bei der Dünnschicht-Oxidation von Linolensäure konnte eine deutlich schnellere Akkumulation der primären Oxidationsprodukte, den Hydroperoxyfettsäuren, beobachtet werden. Bereits am zweiten Tag war ein Maximum erreicht; an den nachfolgenden Tagen konnten keine oder nur geringe Mengen an Hydroxyfettsäuren detektiert werden. Phytoprostane, Marker nichtenzymatischer Fettsäureoxidation, entstehen durch Zyklisierung aus Hydroperoxiden und konnten in diesen Oxidationsansätzen ebenfalls als primäre Oxidationsprodukte analysiert werden. Die höchsten Spiegel an Phytoprostanen wurden ebenfalls zu einem frühen Zeitpunkt (1 bzw. 2 Tage) detektiert.

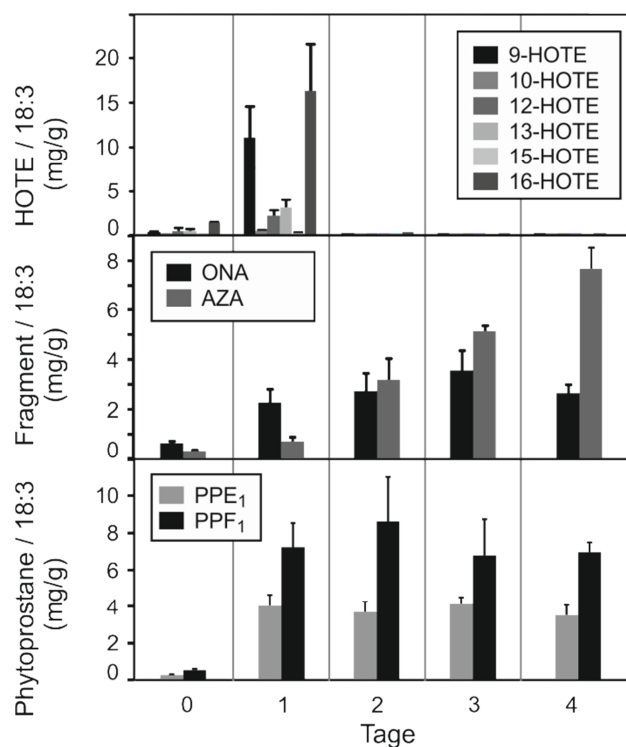


Abbildung II-10: Kinetik verschiedener Produkte der radikalischen Lipidperoxidation von Linolensäure. Dargestellt sind die Spiegel an Hydroxyfettsäuren, an den Fettsäurefragmenten ONA und AZA und Phytosteranen nach 0 bis 4 Tagen (MW+SD, n=3).

Analog zur Linolsäure kam es im Laufe von vier Tagen zu einem kontinuierlichen Anstieg von AZA. Die Mengen an ONA stiegen in den ersten drei Tagen stetig an und nahmen am vierten Tag wieder leicht ab.

Eine genaue Untersuchung des Hydroxyfettsäure-Musters, sowohl aus Linol- als auch aus Linolensäure, lässt auf einen rein radikalischen Oxidationsmechanismus schließen. Als Beispiel hierfür sind die Mengen 24 Stunden nach Oxidation in Abbildung II-11 dargestellt.

Neben den mehrfach ungesättigten Fettsäuren Linol- und Linolensäure, wurde auch die einfach ungesättigte Ölsäure einer radikalischen Oxidation unterzogen. Nach Oxidation dieser Fettsäure kam es nicht zur Bildung der Fettsäurefragmente ONA bzw. AZA. In Abbildung II-12 sind die Anteile von ONA bzw. AZA in Bezug auf die jeweiligen Substrate (Öl-, Linol- und Linolensäure) in Mol-% 24 Stunden nach Oxidation zusammengefasst.

Die radikalische Oxidation wurde auch mit dem 9- und 13-Hydroperoxid (9- bzw. 13-HOO-18:3) durchgeführt, um zu klären, ob beide Hydroperoxide Vorläufer für die oxidierten Fettsäurefragmente darstellen können. Bei beiden Substraten kam es zur Bildung von ONA und AZA, wie in Abbildung II-12 zu erkennen ist.

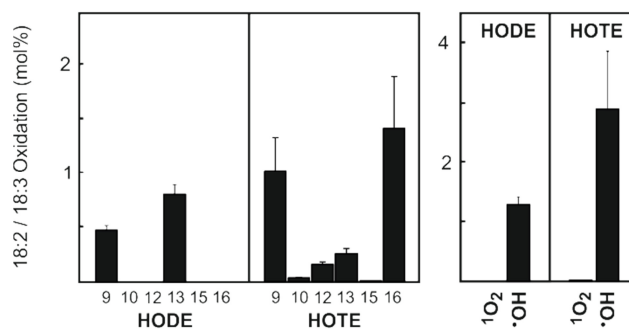


Abbildung II-11: Darstellung des zugrundeliegenden Oxidationsmechanismus durch Analyse des Hydroxyfettsäuremusters nach Dünnschichtoxidation. Dargestellt sind die Spiegel an Hydroxyfettsäuren von 18:2 bzw. 18:3 nach 24 Stunden einer Dünnschichtoxidation (MW+SD, n=3). Die Analyse des Hydroxyfettsäuremusters gibt Aufschluss über den Oxidationsmechanismus, der in diesem Fall rein Radikal-katalysiert abläuft.

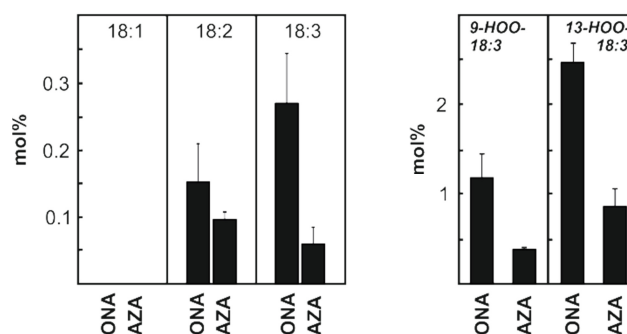


Abbildung II-12: Akkumulation der Fettsäurefragmente ONA und AZA nach radikalischer Oxidation verschiedener Substrate. Dargestellt sind die Spiegel der Fettsäurefragmenten ONA und AZA nach 24 Stunden Dünnschichtoxidation verschiedener Substrate (MW+SD, n=3). Als Substrat dienen die Fettsäuren 18:1, 18:2 und 18:3, ebenso wie das 9- und 13-Hydroperoxid der Linolensäure.

### 3.2 PHOTOOXIDATION

Die zweite Möglichkeit der nichtenzymatischen Oxidation von Fettsäuren stellt die Oxidation mittels Singulett Sauerstoff dar. Mit Linol- und Linolensäure als Substrat wurde daher eine Photooxidation durchgeführt. Die Fettsäuren wurden in Methanol gelöst und nach Zugabe des Photosensitizers Methyleneblau wurden die Ansätze unter Hochlicht inkubiert. Zur Unterdrückung der radikalischen Oxidation wurde in einem zweiten Ansatz der Radikalfänger Butylhydroperoxid (BHT) zugegeben. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden die entstandenen Hydroperoxide mittels Triphenylphosphin zu Hydroxyfettsäuren reduziert und analysiert.

Ein Vergleich der Hydroxyfettsäure-Muster in Abbildung II-13 zeigt, dass in den Ansätzen ohne BHT sowohl eine radikalische als auch eine Singulett Sauerstoff vermittelte Oxidation von Linol- und

Linolensäure stattgefunden hat. In beiden Fällen überwogen die radikalischen Produkte. Infolge dessen kam es auch zu einer raschen (innerhalb von 2 h) Akkumulation der Fettsäurefragmente ONA und AZA. In den Oxidationsansätzen mit BHT entstanden die Hydroperoxyfettsäure-Isomere in vergleichbaren Mengen. Selbst hohe Mengen an BHT (0,5 %) konnten die radikalische Oxidation von Linolensäure nicht vollständig unterdrücken. Unter (fast) reinen photooxidativen Bedingungen kam es kaum zur Bildung von Fettsäurefragmenten aus Linol- und Linolensäure. Es konnten nur geringe Mengen an ONA und AZA detektiert werden, die wahrscheinlich durch die verbliebenen freien Radikale generiert werden.

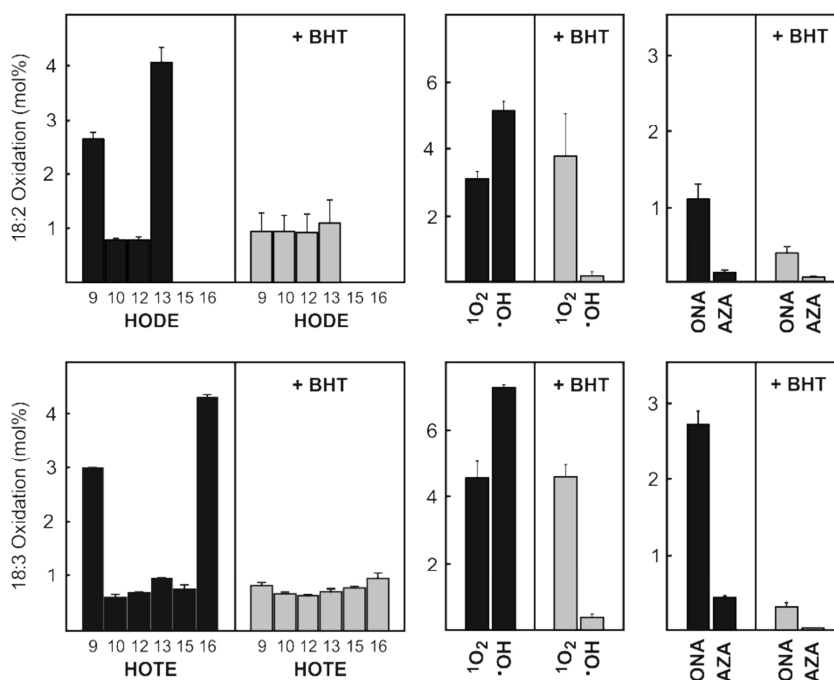


Abbildung II-13: Produkte der Photooxidation von Linol- und Linolensäure. Dargestellt sind die Spiegel an Hydroxyfettsäuren und an den Fettsäurefragmenten ONA und AZA nach 2 Stunden Photooxidation ohne bzw. mit dem Radikalfänger Butylhydroperoxid (BHT). Die Analyse des zugrundeliegenden Oxidationsmechanismus zeigt, dass in den Ansätzen mit BHT eine fast vollständige Oxidation durch Singulett Sauerstoff stattfindet (MW+SD, n=3).

In keinem der *in vitro* Oxidationsansätze konnte, wie erwartet, OHA oder PIM detektiert werden. Diese beiden Fragmente werden vermutlich auf analogem Weg aus zwei- bzw. dreifach ungesättigten C16-Fettsäuren gebildet.



4 OXIDATION VON FETTSÄUREN *IN VIVO*

Der Mechanismus der Lipidperoxidation, der *in vivo* zur Fragmentierung der Fettsäuren führt, sollte anhand der Hydroxyfettsäure-Zusammensetzung in *A. thaliana*, untersucht werden. Hierfür wurde das Muster unter basalen Bedingungen, als auch 24 Stunden nach Infektion mit avirulenten *Pseudomonas* bestimmt. Zusätzlich zu freien HOTE wurden auch veresterte HOTE bestimmt. In diesem Versuch wurde der Wildtyp Col0 und die Mutante *lox2-1* untersucht, da LOX2 die einzig bekannte LOX ist, die komplexe Lipide oxidieren kann (Glauser *et al.* 2009; Seltmann *et al.* 2010).

Wie schon zuvor beschrieben, wurden die behandelten Blätter geerntet und ein Rohextrakt hergestellt. Aus diesem Rohextrakt wurden nach Reduktion der Peroxide die freien Hydroxyfettsäuren bestimmt.

Im oberen Teil der Abbildung II-14 ist zu erkennen, dass unter Kontrollbedingungen nur sehr wenige freie Hydroxyfettsäuren detektiert werden konnten. Im Wildtyp lag die Gesamtmenge bei ca. 1 nmol pro Gramm Trockengewicht. Nach Infektion stiegen die Mengen auf das 20-fache an. In der Mutante *lox2-1* lagen die basalen Werte mit 1,5 nmol/g leicht höher im Vergleich zum Wildtyp. Allerdings kam es hier nach Infektion zu einem deutlich höheren Anstieg der Gesamtmenge (287 nmol) an Hydroxyfettsäuren. Insbesondere 9-HOTE akkumulierte sehr stark.

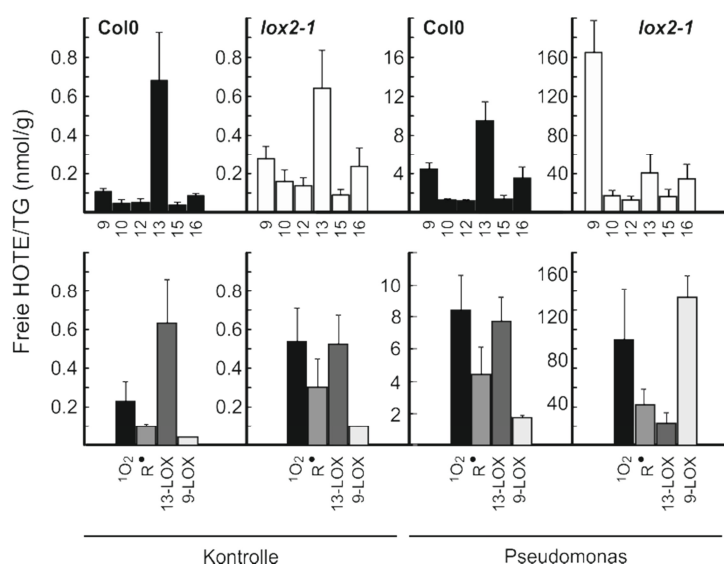


Abbildung II-14: Akkumulation freier Hydroxyfettsäuren im Wildtyp Col0 und in der Mutante *lox2-1*. Dargestellt sind die Spiegel an freien Hydroxyfettsäuren unter basalen Bedingungen und 24 Stunden nach Infiltration mit avirulenten *P. syringae* (MW+SD, n=3). Im unteren Teil der Abbildung ist der zugrundeliegende Oxidationsmechanismus dargestellt.

Die Berechnung des zugrundeliegenden Oxidationsmechanismus (Abbildung II-14, unten) zeigte, dass unter Kontrollbedingungen sowohl in Col0, als auch in *lox2-1*, Singulett Sauerstoff, freie Radikale und 13-LOX an der Lipidperoxidation beteiligt sind. Nach Infektion mit dem Pathogen akkumulierten die Produkte dieser drei Oxidationsmechanismen stark. In der Mutante *lox2-1* kam es zusätzlich zu einem sehr starken Anstieg des 9-LOX Produkts.

Ein Aliquot der zuvor gewonnenen und mit Triphenylphosphin reduzierten Rohextrakte wurde alkalisch hydrolysiert und daraus ebenfalls die Zusammensetzung der Hydroxyfettsäuren analysiert. Durch Subtraktion der freien Hydroxyfettsäuren konnten die Mengen an Hydroxyfettsäuren bestimmt werden, die in komplexen Lipiden verestert vorliegen. Die Spiegel der veresterten HOTE sind in Abbildung II-15 dargestellt.

Im Wildtyp und in der Mutante lagen unter Kontrollbedingungen die einzelnen HOTE Isomere in vergleichbaren Mengen vor. Das Muster entsprach einer reinen Singulett Sauerstoff Oxidation. Insgesamt betrug die Menge der veresterten Hydroxyfettsäuren 490 nmol/g Trockengewicht im Wildtyp bzw. 635 nmol/g in der Mutante. Die freien Spezies machen also weniger als 1% der Gesamtmenge an Hydroxyfettsäuren aus.

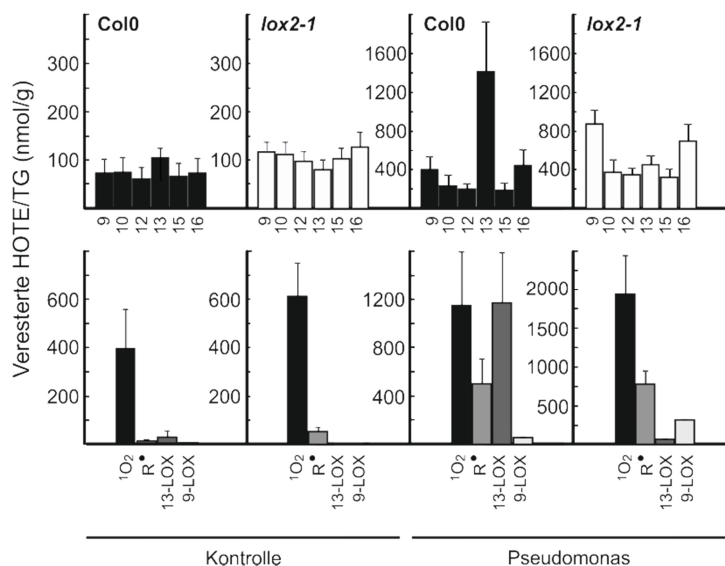


Abbildung II-15: Akkumulation veresteter Hydroxyfettsäuren im Wildtyp Col0 und in der Mutante *lox2-1*. Dargestellt sind die Spiegel an veresterten Hydroxyfettsäuren unter basalen Bedingungen und 24 Stunden nach Infiltration mit avirulenten *P. syringae* (MW+SD, n=3). Im unteren Teil der Abbildung ist der zugrundeliegende Oxidationsmechanismus dargestellt.

Nach Infektion mit *Pseudomonas* stieg die Gesamtmenge im Wildtyp und in der Mutante um das ca. 6-fache an. Alle HOTE-Spezies akkumulierten stark, wobei in Col0 13-HOTE dominiert. In der Mutante *lox2-1* waren die Spiegel an 9- und 16-HOTE deutlich höher als die der restlichen Isomere.

Die Berechnung des zugrundeliegenden Oxidationsmechanismus zeigte, dass nach Infektion mit dem Pathogen im Wildtyp sowohl die Singulett-Sauerstoff Produkte, die radikalischen Produkte als auch 13-LOX Spezies stark zunahm. In *lox2-1* akkumulierten ebenfalls die Singulett-Sauerstoff und radikalischen Produkte stark. Die Mutante besitzt keine 13-LOX und wie erwartet kam es daher zu keiner Akkumulation von 13-LOX Spezies. Interessanterweise akkumulierten bei der Mutante durch 9-LOX gebildeten Produkte.

## 5 OXIDATION VON KOMPLEXEN LIPIDEN

### 5.1 DETEKTION MITTELS UPLC-Q-TOF

Zur Aufklärung oxidierter Lipide wurden Pflanzenextrakte auf komplexe Lipide untersucht, bei denen Hydroperoxide, die putativen Vorläufer der Fettsäurefragmente, verestert vorliegen. Nach der chromatographischen Auftrennung der Extrakte erfolgte die Detektion an einem Quadrupol-Flugzeit-Massenspektrometer (Q-TOF). Die Peroxide wurden im Extrakt zu Hydroxiden reduziert, daher wurde nach „Parent“-Molekülen gesucht, bei denen durch Einwirkung von Kollisionsenergie Fragmente entstehen, die der Masse von Hydroxyfettsäuren (HOTE) entsprechen.

Es konnten vier Klassen an Glycerolipiden identifiziert werden, die veresterte HOTE beinhalten: Galactolipide (MGDG, DGDG), Phosphatidylglycerole (PG), Phosphatidylinositole (PI) und Triacylglycerole (TG). Innerhalb der Klassen der Phosphatidylcholine (PC), Phosphatidylserine (PS) und Phosphoethanolamine (PE) konnten keine HOTE detektiert werden. Die oxidierten Glycerolipide stammen alle von den abundantesten Spezies innerhalb der einzelnen Klassen ab. Um den Oxidationsgrad unter basalen Bedingungen und nach Pathogen-Infektion zu bestimmen, erfolgte die weitere Analyse der verschiedenen Lipidklassen gezielt mittels UPLC-MS/MS.

### 5.2 DETEKTION MITTELS UPLC-MS/MS

Nach der zuvor ungerichteten Suche nach oxidierten komplexen Lipiden, wurde bei dieser Methode gezielt nach nichtoxidierten Glycerolipiden und den korrespondierenden HOTE-Spezies gesucht. Die Detektion der Lipide erfolgte im MRM Modus. Für jede Lipidklasse wurde ein interner Standard verwendet, der eine semiquantitative Bestimmung der einzelnen Analyten ermöglichte.

Neben dem Wildtyp Col0 wurde auch die Mutante *lox2-1* untersucht um eine LOX-Abhängigkeit der einzelnen oxidierten Spezies zu untersuchen. Es wurden jeweils Blattextrakte von Pflanzen unter basalen Bedingungen und 24 Stunden nach Behandlung mit *P. syringae* analysiert. Im Folgenden sind die oxidierten Spezies mit ihrem Masse/Ladungsverhältnis angegeben. *m/z* 293 entspricht hierbei der hydroxylierten 18:3-Fettsäure und *m/z* 265 der hydroxylierten 16:3-Fettsäure.

Zunächst erfolgte eine Analyse der Galactolipide. Die abundantesten Galactolipide sind MGDG bzw. DGDG mit dreifach ungesättigten Fettsäuren. Die Spiegel der einzelnen Galactolipide, sowie den korrespondierende HOTE Spezies sind in Abbildung II-16, Tabelle VII-1 und Tabelle VII-2 zusammengefasst.

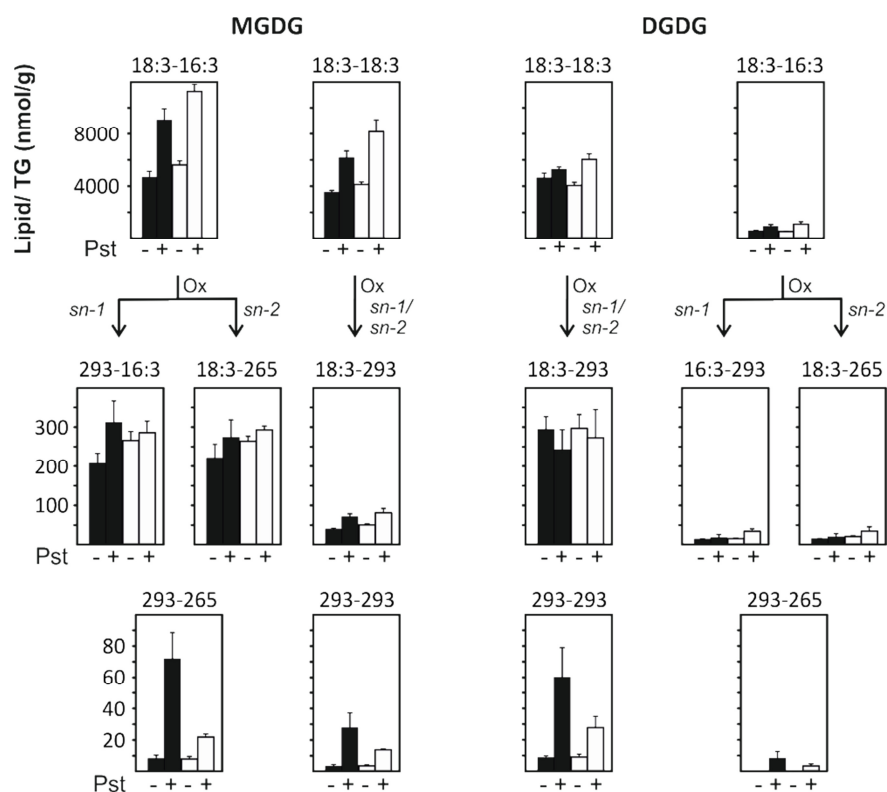


Abbildung II-16: Spiegel verschiedener Galactolipid Spezies im Wildtyp Col0 und in der Mutante *lox2-1*. Dargestellt sind die Spiegel der Hauptspezies MGDG-18:3-16:3, MGDG-18:3-18:3, DGDG-18:3-18:3 und DGDG-18:3-16:3 und Galactolipidspezies, mit einer bzw. zwei Hydroxyfettsäuren in den Acylketten in Col0 (schwarze Balken) und *lox2-1* (weiße Balken) unter basalen Bedingungen und 24 Stunden nach Infiltration mit avirulenten *P. syringae*. (MW+SD, n=3).

Das Hauptspezies MGDG-18:3-16:3 lag unter basalen Bedingungen im Wildtyp mit 4700 nmol/g TG vor, gefolgt von MGDG-18:3-18:3 mit 3500 nmol/g TG. DGDG-18:3-18:3 stellte mit knapp 4600 nmol/g TG die abundanteste Verbindung innerhalb der DGDG-Klasse dar. Das zweithäufigste

Spezies war DGDG-18:3-16:3 mit ca. 620 nmol/g Trockengewicht. In der LOX2 Mutante lagen die Spiegel dieser Hauptverbindungen im selben Größenbereich. Nach Infektion mit *P. syringae* nahm bei beiden Pflanzenlinien die Menge der Haupt-MGDG um das ca. 2-fache zu, während die DGDG-Spiegel schwächer anstiegen (max. 1,5-fach).

Sowohl unter basalen Bedingungen, als auch nach Pathogeninfektion konnten Galactolipidspezies detektiert werden, bei denen Hydroxyfettsäuren verestert vorkommen. Es wurden Moleküle analysiert, bei denen eine (*sn-1* oder *sn-2*) oder beide Acylketten oxidiert vorliegen. Die Spiegel dieser Lipidspezies und der zugehörige Vorstufen sind ebenfalls in Abbildung II-16, Tabelle VII-1 und Tabelle VII-2 gezeigt.

Im Wildtyp lagen die basalen Spiegel an MGDG-18:3-265 und MGDG-16:3-293 bei ca. 200 nmol/g TG, was einem Oxidationsgrad von 4,5 bzw. 4,2 % entspricht. MGDG-18:3-293 war 5-fach niedriger mit 40 nmol/g TG, der Oxidationsgrad betrug 1,1 %. Die Mengen an DGDG-18:3-293 erreichten 300 nmol/g TG was einem Oxidationsgrad von 6 % entspricht. Die oxidierten Formen von DGDG-18:3-16:3 (DGDG-18:3-265 und DGDG-16:3-293) kamen mit etwa 15 nmol/g TG vor und der Oxidationsgrad dieser Verbindungen betrug ~2,4 %. Auch doppelt oxidierte MGDG- und DGDG-Spezies konnten bereits unter basalen Bedingungen, allerdings mit einem niedrigen Oxidationsgrad von 0,1 – 0,2 %, detektiert werden. Die Mengen dieser Verbindungen lagen im Bereich von 3,5 bis 8,9 nmol/g TG.

Nach Infektion mit *P. syringae* kam es bei den einfach oxidierten Spezies zu einem Anstieg (maximal 1,8-fach). Die Mengen der doppelt oxidierten Verbindungen (2x HOTE) stiegen dagegen um das bis zu 8,6-fache an. Da auch die Mengen der Vorstufen stark anstiegen, nahm der Oxidationsgrad nach Infektion im Vergleich zu Kontrollbedingungen nicht zu, sondern sogar ab. Lediglich der Oxidationsgrad der doppelt oxidierten Substanzen nahm leicht zu (max. 1,1 %).

In der LOX2 Mutante konnten Werte der gleichen Größenordnung detektiert werden und die Veränderungen infolge Pathogeninfektion waren analog zum Wildtyp. Ein Unterschied konnte in Bezug auf die doppelt oxidierten Spezies festgestellt werden, da es bei *lox2-1* zu einer schwächeren Akkumulation dieser Spezies (max. 3,8-fach; Col0: max. 8,6-fach) nach Behandlung mit *P. syringae* kam.

In dem ungerichteten „Screen“ nach den putativen Vorstufen der veresterten Hydroxyfettsäuren wurden neben den Galactolipiden auch Phospholipide identifiziert. Folglich wurden Hauptspezies der einzelnen Phospholipidklassen, die eine 18:3 Fettsäure enthalten, gezielt untersucht.

In Phosphatidylcholinen (PC), Phosphoethanolaminen (PE) und Phosphatidylserinen (PS) konnten mit Hilfe dieser Analysetechnik ebenfalls keine Hydroxyfettsäuren detektiert werden. In Abbildung II-17, Tabelle VII-3 und Tabelle VII-4 sind daher lediglich die Werte der Hauptspezies dieser Klassen dargestellt.

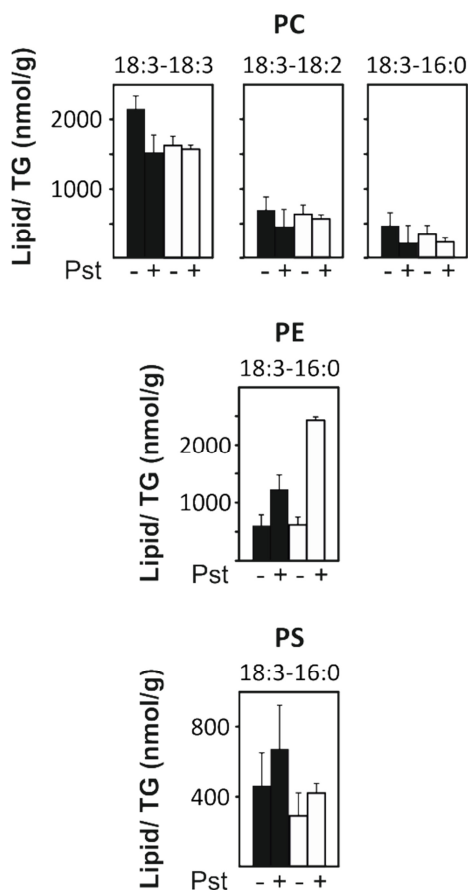


Abbildung II-17: Spiegel verschiedener Phospholipid Hauptspezies im Wildtyp Col0 und in der LOX2 Mutante. Dargestellt sind die Spiegel einiger Hauptspezies aus der Klasse der Phosphatidylcholine (PC), Phosphoethanolamine (PE) und Phosphatidylserine (PS) in Col0 (schwarze Balken) und *lox2-1* (weiße Balken) unter basalen Bedingungen und 24 Stunden nach Infiltration mit avirulenten *P. syringae*. (MW+SD, n=3).

Innerhalb der PC wurden drei verschiedene Moleküle untersucht, die alle Linolensäure enthalten. Das abundanteste Spezies war PC-18:3-18:3, welches im Wildtyp basal mit 2100 nmol/g Trockengewicht vorlag. In der Mutante wurden leicht niedrigere Werte (1600 nmol/g TG) gemessen. Die beiden weiteren Spezies PC-18:3-18:2 und PC-18:3-16:0 lagen in beiden Linien unter Kontrollbedingungen mit ca. 500 nmol/g TG vor. Nach Infektion mit *P. syringae* kam es zu keiner großen Veränderung dieser PC-Spiegel. Lediglich im Wildtyp nahm PC-18:3-18:3 leicht ab, was aufgrund der Standardabweichung nicht von Bedeutung scheint.

Das Molekül mit den Acylketten 18:3 und 16:0 stellt sowohl bei den PE, als auch bei den PS ein Hauptspezies dar. PE-18:3-16:0 lag im Wildtyp und in der Mutante basal mit 600 nmol/g vor. Nach Pathogeninfektion kam es in Col0 zu einem 2-fachen Anstieg dieses Lipids, in *lox2-1* sogar zu einem knapp 4-fachen Anstieg. Für PS-18:3-16:0 konnten basale Werte von 300 (wt) bis 400 (*lox2-1*) nmol/g TG gemessen werden. Nach Behandlung mit *P. syringae* lagen die Werte ebenfalls in diesem Bereich.

Die UPLC-MS/MS Analysen bestätigten, dass es Phosphatidylglycerole (PG) und Phosphatidylinositole (PI) gibt, bei denen Hydroxyfettsäuren verestert vorliegen. Die Spiegel dieser Lipide sowie der zugehörigen Vorstufen bzw. nicht oxidierten Lipide sind in Abbildung II-18, Tabelle VII-3 und Tabelle VII-4 aufgezeigt.

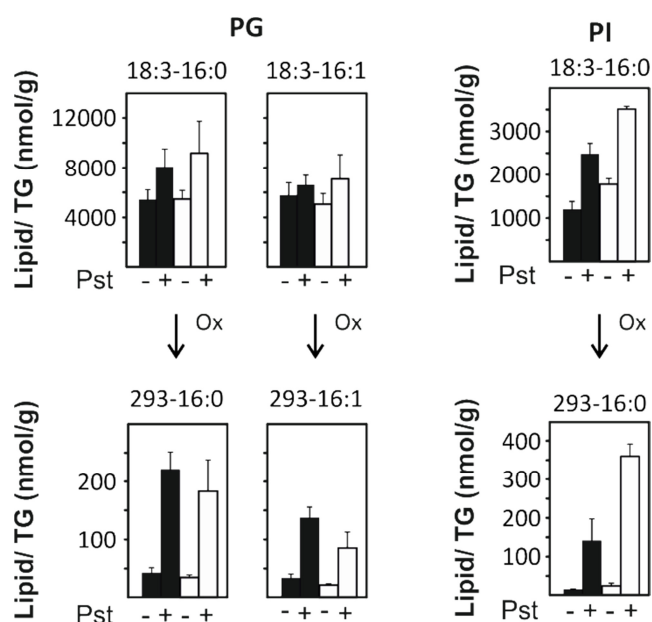


Abbildung II-18: Spiegel weiterer Phospholipide im Wildtyp Col0 und in der LOX2 Mutante. Dargestellt sind die Spiegel einiger Hauptspezies und Phospholipidspezies, mit einer Hydroxyfettsäuren in den Acylketten in Col0 (schwarze Balken) und *lox2-1* (weiße Balken) unter basalen Bedingungen und 24 Stunden nach Infiltration mit avirulenten *P. syringae*. (MW+SD, n=3).

Basal lagen die Spiegel von PG-18:3-16:0 und PG-18:3-16:1 in beiden Pflanzenlinien bei ca. 5500 nmol/g TG. Nach Infektion mit *P. syringae* kam es zu einem 1,5-fachen Anstieg von PG-18:3-16:3, während sich die Spiegel von PG-18:3-16:1 kaum unterschieden.

Schon unter Kontrollbedingungen konnte von diesen beiden PG-Spezies eine oxidierte Form (je eine Hydroxyfettsäure verestert) mit Spiegeln von 30 bis 40 nmol/g TG, detektiert werden. Dies entspricht einem Oxidationsgrad von ca. 0,6 % bezogen auf das entsprechende Vorläufermolekül. Nach

Pathogeninfektion stiegen die Werte der oxidierten Spezies um das 4- bis 5,2-fache an, wodurch ein Oxidationsgrad von bis zu 2,7 % erreicht wurde.

Innerhalb der Klasse der PI wurde das Hauptspezies PI-18:3-16:0 untersucht. Die basalen Werte im Wildtyp lagen bei 1200 nmol/g TG, in der Mutante leicht höher bei 1780 nmol/g TG. In beiden Pflanzenlinien kam es nach Pathogenbehandlung zu einer 2-fach vermehrten Akkumulation dieses Lipids.

Analog der Lipidklasse der PG konnte auch die oxidierte Form von PI-18:3-16:0 bereits unter Kontrollbedingungen mit 15 nmol/g TG detektiert werden, was einem Oxidationsgrad von 1,3 % im Wildtyp bzw. 0,9 % in der Mutante entspricht. Auch hier kam es nach Infektion mit *P. syringae* zu einem starken Anstieg dieses Moleküls um das 5- (Col0) bzw. 4-fache (*lox2-1*). Somit lag nach Pathogenbefall im Wildtyp ein Oxidationsgrad von 4,7 %, in der Mutante von 3,8 % vor.

Die dritte Lipidklasse, die als molekulares Ziel der Oxidation komplexer Lipide identifiziert wurde, stellt die Gruppe der Triglyceride (TG) dar. Auch hier wurden gezielte Analysen von Hauptspezies, die dreifach ungesättigte Fettsäuren enthalten, mittels UPLC-MS/MS durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung II-19, Tabelle VII-3 und Tabelle VII-4 dargestellt.

Die abundantesten Spezies waren TG-18:3-18:3-18:3, TG-18:3-18:3-18:2, TG-16:0-18:3-18:3 und TG-16:0-18:3-18:2. Unter Kontrollbedingungen konnten im Wildtyp Spiegel von 30 (TG-16:0-18:3-18:3) bis 290 (TG-18:3-18:3-18:2) nmol/g TG detektiert werden. In der LOX2 Mutante lagen die Werte in einem vergleichbaren Bereich. Nach Infektion mit *P. syringae* kam es innerhalb dieser Lipidklasse zu einem bemerkenswerten Anstieg der analysierten Spezies. Es fand eine 6,8- (TG-18:3-18:3-18:2) bis 11,3-fache (TG-16:0-18:3-18:3) Akkumulation dieser Lipide statt. Auch in *lox2-1* konnte dieser große Anstieg der Lipide beobachtet werden.

Unter basalen Bedingungen konnten auch von diesen vier Hauptspezies oxidierte Moleküle detektiert werden, bei denen jeweils eine Acylgruppe in Form einer Hydroxyfettsäure vorliegt. Die Spiegel dieser Moleküle lagen im Bereich von 1 nmol/g TG, was einem Oxidationsgrad von 0,3 bis 2 % (TG-16:0-18:3-293) entspricht. Auch bei diesen Spezies kam es nach Infektion mit dem Pathogen zu einer sehr starken Akkumulation. Ein 160- (TG-18:3-18:2-293) bis 454-facher (TG-18:3-18:3-293) Anstieg konnte hier beobachtet werden. Der Oxidationsgrad der einzelnen Spezies lag folglich zwischen 10 und 27 % (TG-16:0-18:3-293).

Weiterhin konnten auch TG-Spezies detektiert werden, bei denen zwei Acylketten in Form von Hydroxyfettsäuren vorliegen (TG-18:3-293-293, TG-18:2-293-293 und TG-16:0-293-293). Die Spiegel



dieser Gruppe an oxidierten Lipiden, die nur nach *P. syringae* Infektion gemessen werden konnte, lagen zwischen 4 und 6,3 nmol/g TG. Dreifach oxidierte TG wurden weder basal noch nach Pathogenbehandlung detektiert.

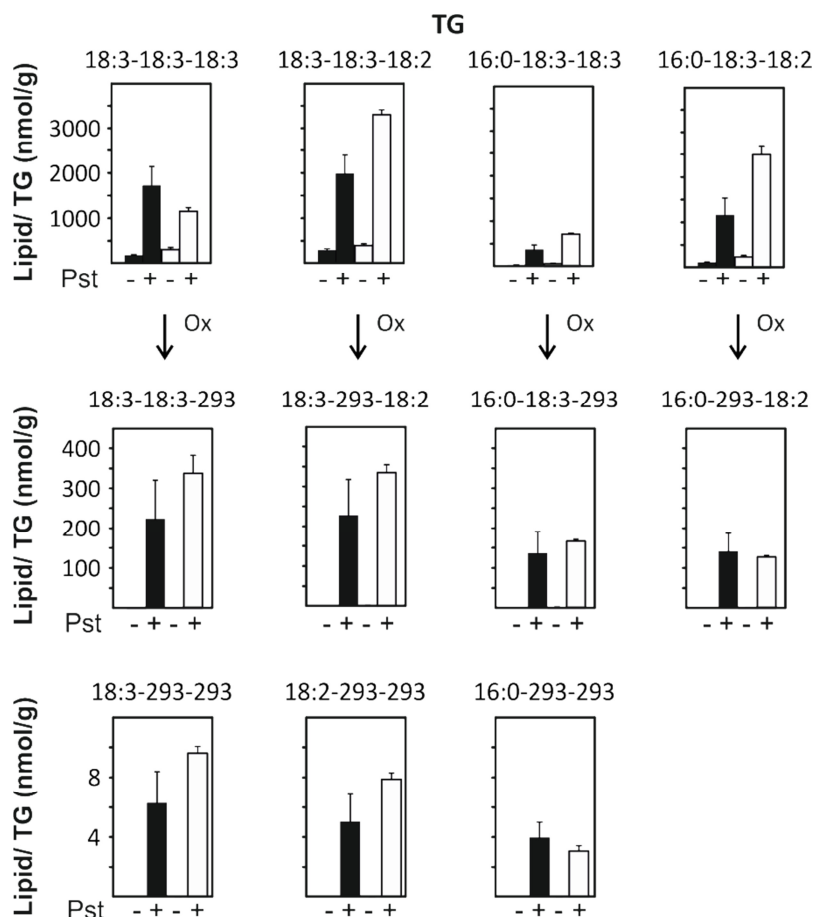


Abbildung II-19: Spiegel an Triacylglycerolen im Wildtyp Col0 und in der LOX2 Mutante. Dargestellt sind die Spiegel einiger Hauptspezies und Triacylglycerolspezies, mit einer bzw. zwei Hydroxyfettsäuren in den Acylketten in Col0 (schwarze Balken) und *lox2-1* (weiße Balken) unter basalen Bedingungen und 24 Stunden nach Infiltration mit avirulenten *P. syringae*. (MW+SD, n=3).

Zusammenfassend betrachtet, konnten sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach Infektion mit *P. syringae* HOTE Spezies in drei großen Gruppen der Glycerolipide gefunden werden: den Galactolipiden, Phospholipiden und den Triglyceriden. Neben einfach oxidierten komplexen Lipiden konnten auch solche detektiert werden, bei denen zwei Acylketten hydroxyliert vorliegen. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass es nach Pathogenbehandlung nicht nur zu einer Akkumulation der oxidierten Spezies, sondern auch der Vorstufen bzw. nicht oxidierten Lipide kam.

## 6 OXIDIERTE FETTSÄUREFRAGMENTE IN KOMPLEXEN LIPIDEN

Die akkumulierten HOTE-Spezies in komplexen Lipiden, stellen einen Pool an Verbindungen dar, der höchst anfällig ist für eine weitere, Radikal-katalysierte Oxidation und Fragmentierung. Es wurden daher weitere gezielte Analysen der komplexen Lipide mittels UPLC-MS/MS durchgeführt. Hierbei wurde nach Acylketten mit  $m/z$  171,  $m/z$  143,  $m/z$  187 bzw.  $m/z$  159 gesucht. Diese Masse/Ladungs Verhältnisse könnten den Aldehyden ONA ( $m/z$  171) und OHA ( $m/z$  143) bzw. den Dicarbonsäuren Azelain- ( $m/z$  187) und Pimelinsäure ( $m/z$  159) entsprechen.

### 6.1 OXIDIERTE FETTSÄUREFRAGMENTE AUSSCHLIEßLICH IN GALACTOLIPIDEN

Die oxidierten Fettsäurefragmente (ONA, OHA, AZA und PIM) konnten nur in Galactolipide verestert nachgewiesen werden. Weder in Phospholipiden (PC, PG, PE, PI bzw. PS), noch in Triglyceriden wurden Spezies mit diesen Acylketten gefunden.

Ausgehend von den Vorstufen MGDG/DGDG-18:3-16:3 konnten je zwei Oxidationsprodukte, bei denen Aldehyde bzw. Säuren verestert waren, detektiert werden: MGDG/DGDG-16:3-171 (oxidiertes Fragment in *sn-1*) und MGDG/DGDG-18:3-143 (oxidiertes Fragment in *sn-2*) bzw. MGDG/DGDG-16:3-187 (*sn-1*) und MGDG/DGDG-18:3-159 (*sn-2*). Ausgehend von MGDG/DGDG-18:3-18:3 konnte jeweils die Verbindung MGDG/DGDG-18:3-171 (*sn-1* / *sn-2*) bzw. MGDG/DGDG-18:3-187 (*sn-1* / *sn-2*) gemessen werden. Andere Kombinationen der Fragmente mit den Fettsäuren wurden nicht detektiert. Im Unterschied zu den HOTE Spezies konnten weiterhin ausschließlich Verbindungen nachgewiesen werden, bei denen nur eine Seitenkette fragmentiert vorliegt. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abbildung II-20, Tabelle VII-1 und Tabelle VII-2 zusammengefasst.

Im Wildtyp konnte unter basalen Bedingungen MGDG-16:3-171 mit 23 nmol/g TG, MGDG-18:3-143 mit 3 nmol/g TG und MGDG-18:3-171 mit 13 nmol/g TG nachgewiesen werden. Die Spiegel der Galactolipide mit veresterten Säuren lagen noch leicht unter diesen Werten: MGDG-16:3-187 mit 1,2 nmol/g TG, MGDG-18:3-159 mit 5,3 nmol/g TG und MGDG-18:3-187 mit 1,9 nmol/g TG. Nach Infektion mit *P. syringae* kam es bei allen sechs Spezies zu einem etwa 2-fachen Anstieg. Da die fragmentierten Galactolipide in diesen geringen Mengen vorkamen, erreichten sie sowohl basal als auch nach Infektion nur einen Oxidationsgrad von maximal 0,5 %.

Innerhalb der Gruppe der DGDG konnten ebenfalls die oben genannten fragmentierten Spezies mit Ausnahme von DGDG-16:3-187 detektiert werden. Die Spiegel lagen in derselben Größenordnung im

Vergleich zu den MGDG. DGDG-16:3-171 konnte basal mit 9,3 nmol/g TG, DGDG-18:3-143 mit 2,7 nmol/g TG, DGDG-18:3-171 mit 26,3 nmol/g TG, DGDG-18:3-159 mit 12,6 nmol/g TG und DGDG-18:3-187 mit 1,2 nmol/g TG nachgewiesen werden. Nach Pathogenbehandlung konnten keine wesentlichen Veränderungen der DGDG-Spiegel beobachtet werden.

Die Analyse von *lox2-1* lieferte im Vergleich zum Wildtyp vergleichbare Ergebnisse. Somit kann eine LOX2-Abhängigkeit der Galactolipide mit oxidierten Fettsäurefragmenten ausgeschlossen werden.

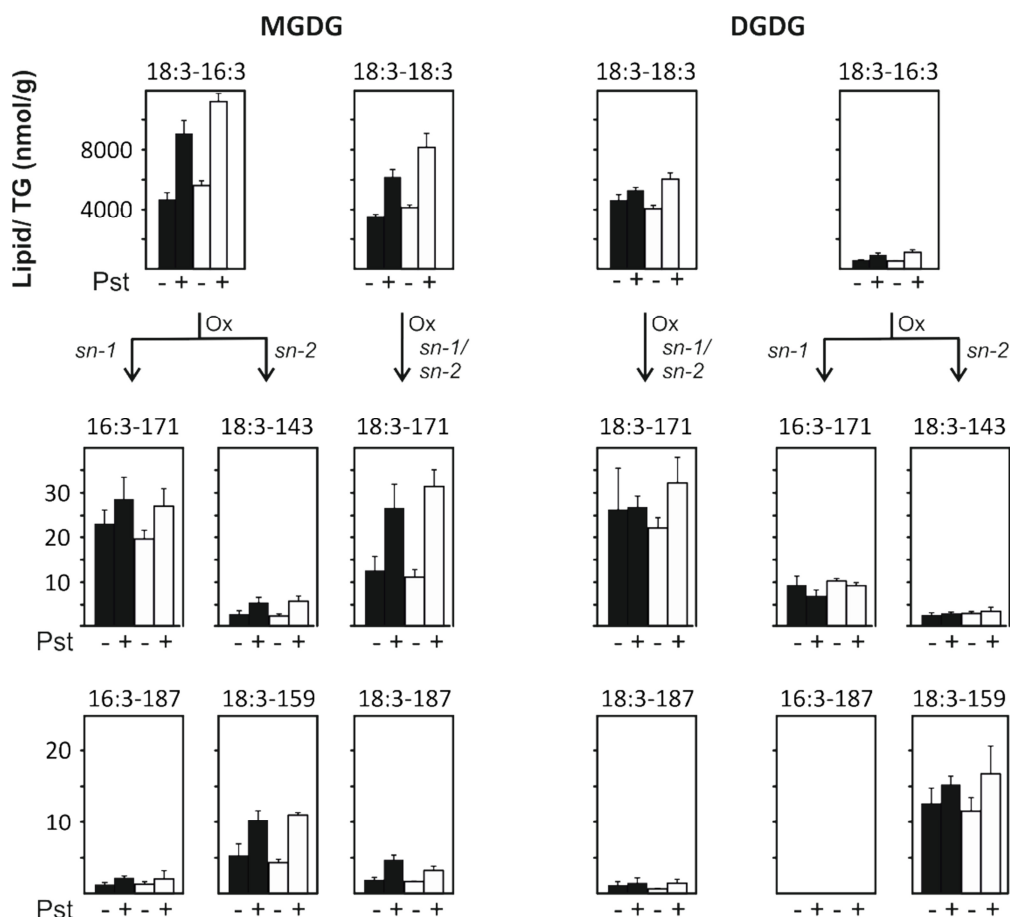


Abbildung II-20: Spiegel verschiedener Galactolipid Spezies im Wildtyp Col0 und in der Mutante *lox2-1*. Dargestellt sind die Spiegel der Hauptspezies und Galactolipidspezies, mit Fettsäurefragmenten in den Acylketten in Col0 (schwarze Balken) und *lox2-1* (weiße Balken) unter basalen Bedingungen und 24 Stunden nach Infiltration mit avirulenten *P. syringae*. (MW+SD, n=3).

## 6.2 IDENTITÄTSNACHWEIS DER OXIDIERTEN FRAGMENTE

Die Detektion der komplexen Lipide im MRM Modus gibt Aufschluss über die Masse des Gesamtmoleküls und der einzelnen Fragmente, den Acylketten. Hinter den detektierten Massen könnten sich unterschiedliche Verbindungen mit gleichem Masse/Ladungs Verhältnis verbergen. Um

nachzuweisen, dass es sich bei den oxidierten Galactolipiden tatsächlich um die veresterten Fettsäurefragmente ONA, OHA, AZA bzw. PIM handelt, wurden Experimente zum Identitätsnachweis durchgeführt.

Mit *A. thaliana* Blattmaterial wurde einer Lipid Extraktion nach Bligh und Dyer (1959) durchgeführt. Da die Galactolipide mit oxidierten Fettsäurefragmenten nur in geringer Menge vorkommen, wurde der Pflanzenextrakt anschließend *in vitro* oxidiert, was zu einer starken Akkumulation der oxidierten und fragmentierten Galactolipide führte. Mit diesem oxidierten Ansatz wurden im Anschluss verschiedene Derivatisierungsreaktionen und eine Hydrolyse von gesammelten Peaks durchgeführt, die dem Identitätsnachweis der fragmentierten Fettsäuren dienen sollten.

### 6.2.1 DERIVATISIERUNG DER ALDEHYDGRUPPE

Aldehydgruppen können mit Methoxyamin zu Oximen derivatisiert werden. Das Produkt welches dabei entsteht ist um 29 Masseneinheiten schwerer und kann mittels Massenspektrometrie vom Ausgangsmolekül unterschieden werden.

Ein Aliquot des oxidierten Pflanzenextrakts wurde mit einer Methoxyamin-Lösung versetzt und für 60 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die chromatographische Auftrennung des derivatisierten Ansatzes im Vergleich zum oxidierten Pflanzenextrakt.

In Abbildung II-21 sind die Chromatogramme zur Derivatisierung von MGDG-16:3-ONA dargestellt. Die beiden oberen Spuren sind spezifisch für MGDG-16:3-ONA. Das Gesamtmolekül mit  $m/z$  639,5 liefert die Fragmente  $m/z$  249 (16:3) und  $m/z$  171 (ONA). In den beiden unteren Spuren wurden die Massen, die nach Derivatisierung entstehen, ausgewählt. Sowohl das „Parent“-Molekül, als auch das ONA-Methoxim-Fragment sind um 29 Masseneinheiten schwerer.

Auf der linken Seite sind die Ergebnisse des oxidierten Extraktes abgebildet. Bei einer Retentionszeit von 5,2 Minuten war der MGDG-16:3-ONA Peak deutlich in beiden spezifischen Spuren erkennbar. In den Spuren der Methoxim-Massen waren keine Peaks vorhanden. Nach Methoxyamin-Behandlung (rechte Seite der Abbildung II-21) verschwanden die MGDG-16:3-ONA Peaks. In den Spuren der Methoxim-Massen tauchten dagegen zu einer Retentionszeit von 6,2 Minuten neue Peaks auf. Da das derivatisierte Molekül lipophiler ist als das Ausgangsmolekül wird es später von der Säule eluiert.

Die Chromatogramme der Derivatisierungsprodukte von MGDG-18:3-OHA und MGDG-18:3-ONA sind der Vollständigkeit wegen im Anhang hinterlegt (Abbildung VII-1 und Abbildung VII-2). Die Ergebnisse waren analog der zuvor beschriebenen Derivatisierung von MGDG-16:3-ONA.

Das Derivatisierungsexperiment hat bestätigt, dass es sich bei  $m/z$  171 und  $m/z$  143 in den Galactolipiden tatsächlich um Aldehyde, also ONA bzw. OHA handelt.

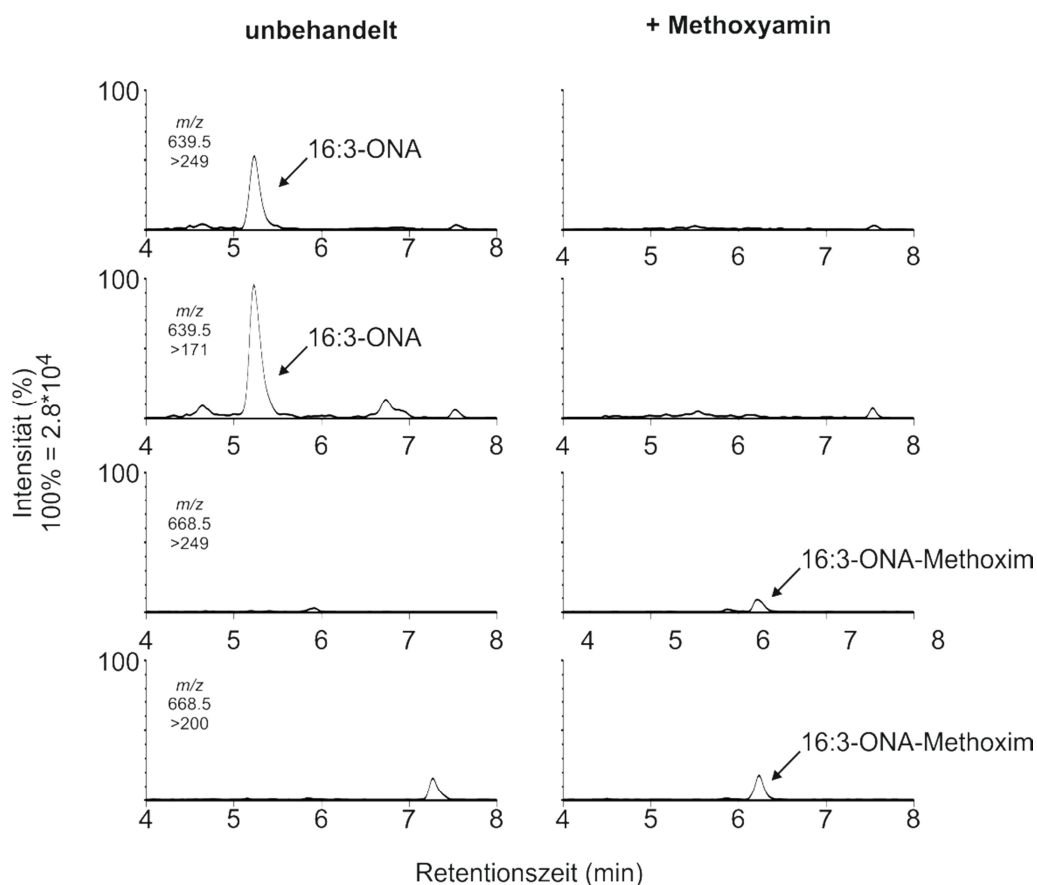


Abbildung II-21: Chromatogramm vor und nach Derivatisierung der Aldehydgruppe in MGDG-16:3-ONA. Nach der chromatographischen Auftrennung des Pflanzenextrakts ist bei einer Retentionszeit von 5,2 Minuten in den beiden charakteristischen Massenspuren für MGDG-16:3-ONA je ein deutlicher Peak erkennbar. Im Chromatogramm des mit Methoxyamin behandelten Extrakts ist in diesen beiden Spuren kein Peak mehr detektierbar. In den Massenspuren, die charakteristisch sind für das Derivatisierungsprodukt tauchen dagegen bei einer Retentionszeit von 6,2 Minuten neue Peaks auf.

### 6.2.2 METHYLIERUNG DER CARBOXYLGRUPPE

Eine Möglichkeit zum Nachweis einer Säuregruppe stellt die Methylierung dieser funktionellen Gruppe dar. Diazomethan, bzw. Trimethylsilyldiazomethan sind starke Methylierungsmittel, die auch aus schwachen Carbonsäuren Methylester generieren.

Ein Aliquot des oxidierten Pflanzenextrakts wurde mit Trimethylsilyldiazomethan versetzt, für 10 Minuten inkubiert und anschließend mittels UPLC-MS/MS vermessen. Zum Vergleich wurde zuvor der oxidierte Pflanzenextrakt gemessen.

Im oxidierten Extrakt konnten MGDG-16:3-AZA, MGDG-18:3-AZA und MGDG-18:3-PIM deutlich detektiert werden. Nach Methylierung nahm die Intensität dieser Verbindungen ab, bzw. die Peaks verschwanden vollständig. In den Methylierungsspuren konnten keine neuen Peaks detektiert werden. Diese Ergebnisse lieferten erste Hinweise darauf, dass es sich bei  $m/z$  187 und  $m/z$  159 um veresterte AZA bzw. PIM handelt.

### 6.2.3 HYDROLYSE ISOLIERTER OXIDIERTER GALACTOLIPIDE

Zusätzlich zu den Derivatisierungsexperimenten erfolgte noch ein weiterer Nachweis, dass es sich bei den oxidierten Galactolipiden tatsächlich um die veresterten Dicarbonsäuren AZA bzw. PIM handelt. Hierzu wurde ein Aliquot des oxidierten Pflanzenextrakts mittels UPLC aufgetrennt. Zur entsprechenden Retentionszeit der Verbindungen wurde das Eluat aufgefangen. Ein Teil dieses gesammelten Eluats wurde mit internem Standard für Galactolipide versehen, erneut mittels UPLC-MS/MS vermessen und die Menge an veresteter AZA und PIM bestimmt. Der Rest des Eluats wurde mit Sebainsäure als internem Standard versetzt und alkalisch hydrolysiert. Anschließend wurde die Menge an freier AZA und PIM mittels UPLC-MS/MS bestimmt.

Die Spiegel der freien Säuren lagen im Bereich der zuvor bestimmten veresterten Mengen. Da auch hier im MRM Modus gemessen wurde und jedes Molekül spezifische Fragmente bildet, konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei den veresterten Verbindungen tatsächlich um AZA und PIM handelt.

### 6.3 LOKALISATION DER BIOSYNTHESE DER OXIDIERTEN FETTSÄUREFRAGMENTE

Nachdem die oxidierten Fettsäurefragmente *in vivo* in freier Form und an Galactolipide verestert nachgewiesen werden konnten, war dennoch unklar, wo die Biosynthesereaktion stattfindet. Zwei Hypothesen können formuliert werden: (1) freie Säuren werden synthetisiert und anschließend in komplexe Lipide (Galactolipide) verestert bzw. (2) es erfolgt eine Oxidation und Fragmentierung der Fettsäuren direkt in den komplexen Lipiden.

Zur Überprüfung dieser Hypothesen wurden Applikationsversuche mit *A. thaliana* Keimlingen durchgeführt. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte im Flüssigmedium, was die Applikation der gewünschten Substanzen deutlich erleichterte. Nach verschiedenen langen Inkubationszeiten wurde der Gehalt an freien Säuren in den Pflanzen bestimmt. Ebenfalls wurden Galactolipide, die oxidierte Fettsäurefragmente enthalten, gemessen.

### 6.3.1 APPLIKATION DER FREIEN SÄURE AZA

Im ersten Versuch erfolgte die Applikation der freien Säure AZA mit einer Endkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  im Medium. Der Versuch sollte zeigen, ob die Keimlinge die applizierte Substanz aufnehmen und ob diese metabolisiert und / oder in Galactolipide verestert wird.

In Abbildung II-22 sind die Ergebnisse des Applikationsversuchs zusammengefasst. Die basalen Werte an AZA und PIM in den Keimlingen lagen bei 3 nmol/g Trockengewicht. Bereits 1,5 Stunden nach Applikation, kam es zu einer starken Akkumulation von AZA (180 nmol/g) und PIM (80 nmol/g) in den Pflanzen. Nach 24 Stunden sank der Gehalt von AZA auf 120 nmol/g. Die Spiegel an PIM stiegen dagegen um das 5,7-fache auf 455 nmol/g an. ONA und OHA wurden weder basal, noch nach Applikation von AZA detektiert.

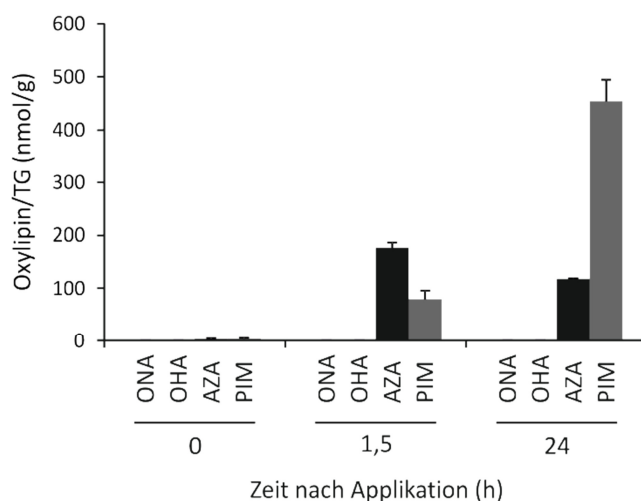


Abbildung II-22: Akkumulation von Fettsäurefragmenten in *Arabidopsis* Keimlingen nach Applikation freier AZA. Dargestellt sind die Spiegel der Fettsäurefragmente ONA, OHA, AZA und PIM in den Keimlingen 0, 1,5 bzw. 24 Stunden nach Applikation freier AZA (MW+SD, n=3).

Nach Applikation von AZA wurde zu beiden Zeitpunkten kein Anstieg der Galactolipide, die veresterte Fettsäurefragmente beinhalten (ONA und AZA), detektiert. Die gemessenen Werte sind in Tabelle VII-5 zusammengefasst.

Mithilfe dieses Experiments konnte nachgewiesen werden, dass AZA von den Keimlingen aufgenommen, allerdings nicht in komplexe Lipide verestert wird.

### 6.3.2 APPLIKATION DEUTERIERTER ONA

In einem zweiten Experiment erfolgte die Applikation deuterierter ONA mit einer Endkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  im Medium. Die Behandlungslösung enthielt 15  $\mu\text{M}$  ONA, 21  $\mu\text{M}$  [D1]-ONA und 64  $\mu\text{M}$  [D2]-ONA. Auch hier sollte gezeigt werden, ob die Substanz metabolisiert und / oder in Galactolipide verestert wird.

Trotz der hohen Konzentration der [D]-ONA-Lösung konnte zu keinem Zeitpunkt deuterierte oder unmarkierte ONA in den Pflanzen detektiert werden (siehe Abbildung II-23). Nach 1,5 Stunden kam es zu einer starken Akkumulation von deuterierter AZA (270 nmol/g) in den Keimlingen, was schlussfolgern lässt, dass es zu einer raschen Oxidation von ONA zu AZA in der Pflanze kommt. Diese Reaktion wird vermutlich durch Aldehyd Dehydrogenasen katalysiert. Auch deuterierte PIM (56 nmol/g) wurde bereits nach 1,5 Stunden gemessen. Nach 24 Stunden lag nur noch eine geringe Menge markierter AZA (17 nmol/g) vor, dies entspricht einer 16-fachen Abnahme im Vergleich zum früheren Zeitpunkt (1,5 Stunden). Die Spiegel markierter PIM stiegen dagegen um ein 4,3-faches auf 240 nmol/g an. *In vivo* kann PIM vermutlich durch  $\beta$ -Oxidation aus AZA entstehen.

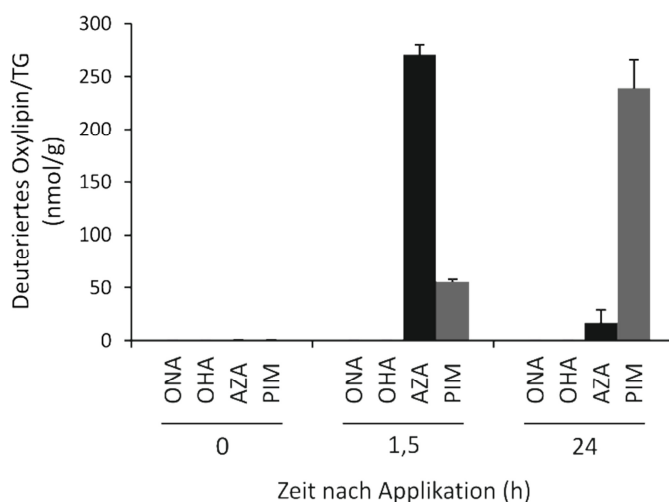


Abbildung II-23: Akkumulation von deuterierten Fettsäurefragmenten in *Arabidopsis* Keimlingen nach Applikation markierter ONA. Dargestellt sind die Spiegel der Fettsäurefragmente ONA, OHA, AZA und PIM in den Keimlingen 0, 1,5 bzw. 24 Stunden nach Applikation deuterierter ONA (MW+SD, n=3).

Auch bei diesem Experiment konnte keine Beeinträchtigung der Galactolipid-Spiegel festgestellt werden. Die gemessenen Werte sind in Tabelle VII-5 aufgeführt. Es wurden keine Galactolipide detektiert, die deuterierte Fettsäurefragmente beinhalten ([D]-ONA, [D-ONA] Alkohol, [D]-AZA). Die Werte der nicht deuterierten AZA- und ONA-Galactolipide blieben ebenfalls konstant.



Demzufolge kommt es zu keiner Veresterung der freien Säuren in komplexe Lipide. Die Oxidation und Fragmentierung der Fettsäuren findet offensichtlich in den Galactolipiden *in situ* statt.

## 7 LOX2-ABHÄNGIGE OXIDIERTE FETTSÄUREN IN GALACTOLIPIDEN

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Biosynthese der oxidierten Fettsäurefragmente nicht abhängig ist von LOX2. Darüber hinaus wurden noch weitere oxidierte Galactolipide analysiert, und es konnte gezeigt werden, dass diese eine LOX2-Abhängigkeit aufweisen. Zur Gruppe dieser oxidierten komplexen Lipide zählen Arabidopside, Ketotrienoate und Ketole. Auch hier wird das Masse/Ladungsverhältnis zur Nomenklatur der einzelnen Verbindungen herangezogen.  $m/z$  291 bzw.  $m/z$  263 entspricht den Ketoverbindungen, die aus 18:3 bzw. 16:3 entstehen. Hinter  $m/z$  309 bzw.  $m/z$  281 stehen zum größten Teil  $\alpha$ -Ketole, wobei ebenfalls Epoxyverbindungen dieses Masse/Ladungsverhältnis aufweisen. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abbildung II-24, Tabelle VII-1 und Tabelle VII-2 zusammengefasst.

Unter basalen Bedingungen lagen im Wildtyp Col0 nur geringe Mengen an Arabidopsiden vor. Nach Infektion mit *P. syringae* hingegen kam es zu einer sehr starken Akkumulation aller Arabidopside (A, B, C, D, E und G). Arabidopsid A und E erreichten mit 1876 nmol/g TG bzw. 1466 nmol/g TG die höchsten Werte. Dies entspricht einem 43- bzw. 69-fachen Anstieg. Insgesamt stieg der Oxidationsgrad der einzelnen Verbindungen von basal unter 1 % auf bis zu 17 % nach Infektion. In der Mutante *lox2-1* konnten weder basal noch nach Infektion Arabidopside detektiert werden.

Ketotrienoate stellen eine weitere Gruppe oxidierter Fettsäuren dar, die in Galactolipide verestert untersucht wurden. Bereits unter Kontrollbedingungen konnten geringe Mengen ( $\leq 5$  nmol/g TG) von einigen dieser Verbindungen sowohl in Col0, als auch in *lox2-1* detektiert werden. Nach Infektion mit *P. syringae* kam es im Wildtyp zu einer starken Akkumulation der Ketotrienoat-MGDG. Die Werte waren um das 21- bis 35-fache erhöht. Die höchsten Spiegel erreichte MGDG-16:3-291 mit 168 nmol/g TG, gefolgt von MGDG-18:2-291 mit 109 nmol/g TG und MGDG-18:3-263 mit 56 nmol/g TG. Nach Pathogenbehandlung akkumulierten in Col0 ebenfalls Ketotrienoat-DGDG. Die Werte lagen für DGDG-18:3-291 bei 71 nmol/g TG, für DGDG-16:3-291 bei 16 nmol/g TG und für DGDG-18:3-263 bei 12 nmol/g TG. In der Mutante *lox2-1* hingegen kam es im Vergleich zum Wildtyp zu einem deutlich schwächeren Anstieg der Ketotrienoat-MGDG. Die Werte waren um das 9- bis 13-fache erhöht, lagen aber mit maximal 18 nmol/g TG (MGDG-16:3-291) deutlich niedriger. Ketotrienoat-DGDG konnten in der Mutante nicht detektiert werden.

Die LOX2-Abhängigkeit der Biosynthese der Ketotrienoate zeigt sich auch im Oxidationsgrad. Während im Wildtyp der Oxidationsgrad der einzelnen Verbindungen von basal 0,1 % auf maximal 1,8 % nach Infektion stieg, betrug er in *lox2-1* nach Infektion maximal 0,2 %.

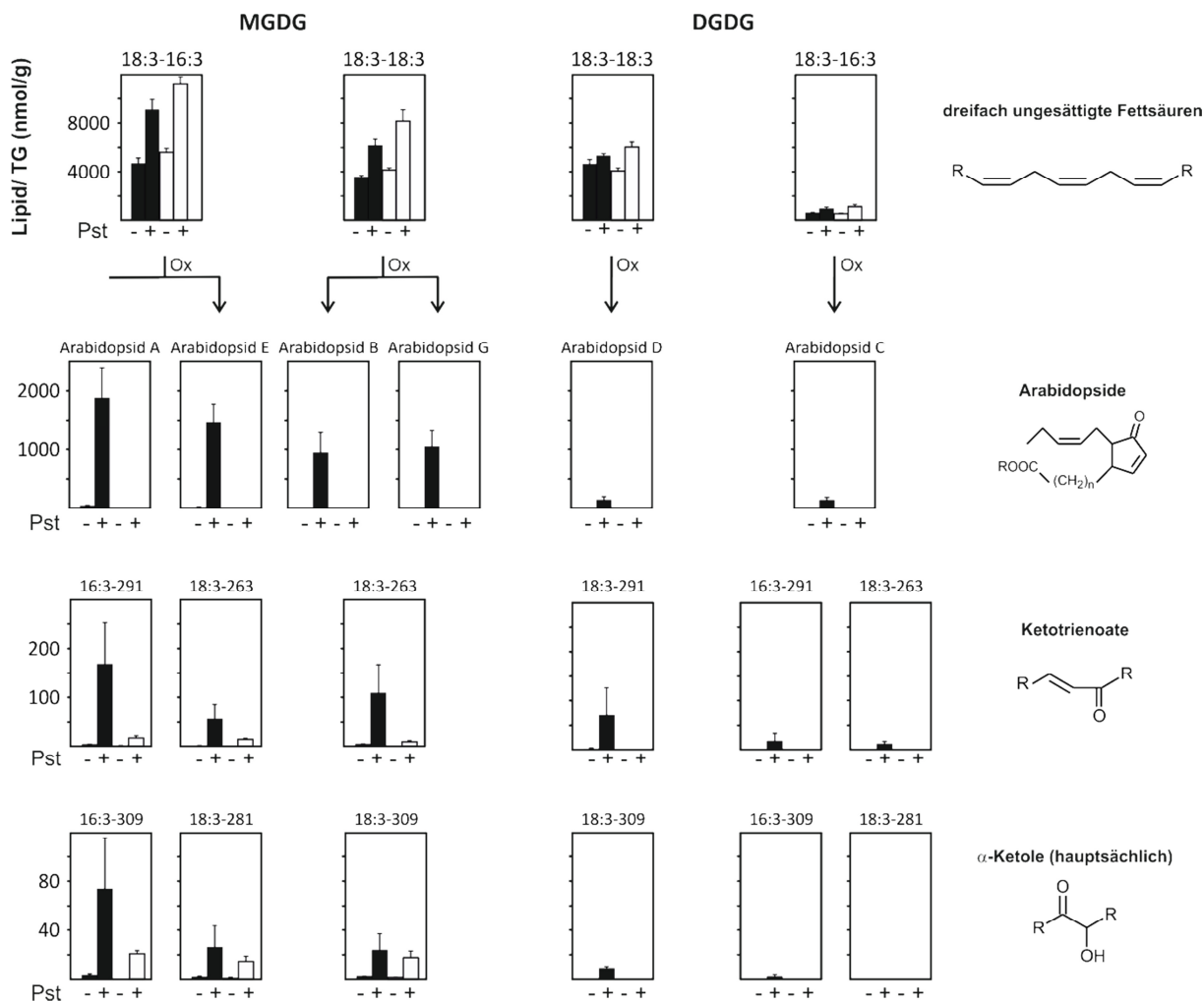


Abbildung II-24: Spiegel verschiedener LOX2-abhängiger oxidierter Galactolipid Spezies im Wildtyp Col0 und in der Mutante *lox2-1*. Dargestellt sind die Spiegel der Hauptspezies und Galactolipide mit verschiedenen Oxidationsprodukten in den Acylketten in Col0 (schwarze Balken) und *lox2-1* (weiße Balken) unter basalen Bedingungen und 24 Stunden nach Infiltration mit avirulenten *P. syringae* (MW+SD, n=3).

Des Weiteren konnte eine Gruppe an oxidierten Galactolipiden mit  $\alpha$ -Ketolen in den Acylketten nachgewiesen werden. Unter Kontrollbedingungen lagen diese Verbindungen im Wildtyp und in der Mutante nur an MGDG verestert in geringen Mengen (Col0  $\leq 4$  nmol/g TG, *lox2-1*  $\leq 2$  nmol/g TG) mit einem Oxidationsgrad von höchstens 0,1 % vor. Infolge der Infektion mit *P. syringae* kam es in Col0 zu einem deutlichen Anstieg (9- bis 20-fach) dieser Verbindungen. Die höchsten Werte erreichte MGDG-16:3-309 mit 74 nmol/g TG, gefolgt von MGDG-18:3-265 mit 26 nmol/g TG und MGDG-18:3-309 mit

24 nmol/g TG. Zusätzlich konnten nach Infektion von Col0 die Spezies DGDG-18:3-309 mit 9 nmol/g TG und DGDG-16:3-309 mit 2,5 nmol/g TG nachgewiesen werden. Auch der Oxidationsgrad der Verbindungen nahm zu, blieb aber unter 1 %. In *lox2-1* kam es ebenfalls zu einer Akkumulation der oxidierten MGDG-Spezies. Die Spiegel an MGDG-16:3-309, MGDG-18:3-309 bzw. MGDG-18:3-281 betragen 21, 18 bzw. 15 nmol/g TG. Der Oxidationsgrad der einzelnen Verbindungen lag bei maximal 0,2 %.

Zusammenfassend betrachtet, ist die Biosynthese dieser drei Gruppen an oxidierten Galactolipiden komplett (Arabidopside) bzw. teilweise (Ketotrienoate,  $\alpha$ -Ketole) LOX2-abhängig. Die Verbindungen konnten sowohl basal als auch nach Infektion mit *P. syringae* nachgewiesen werden. Bei allen Spezies kam es zu einer starken Akkumulation infolge der Infektion mit dem Pathogen.

## 8 ANSTIEG DER GESAMTMENGE DER LIPIDE NACH INFektion MIT *P. SYRINGAE*

Die Analysen der komplexen Lipide haben bereits gezeigt, dass es nach Infektion mit *P. syringae* nicht nur zu einer starken Akkumulation von oxidierten Spezies, sondern auch von Hauptspezies einiger Lipidklassen kommt. In diesem Abschnitt erfolgt daher eine Zusammenfassung und Übersicht über die Summen der detektierten Verbindungen im Wildtyp Col0 und in der Mutante *lox2-1* unter Kontrollbedingungen, sowie nach Pathogeninfektion. Die Summen der einzelnen Lipidklassen sind in Abbildung II-25 und in Tabelle VII-6 dargestellt.

Im oberen Teil der Abbildung sind die Mengen an Galactolipiden zusammengefasst. Unter Kontrollbedingungen lagen im Wildtyp und der Mutante vergleichbare Mengen an nichtoxidierten und oxidierten MGDG bzw. DGDG vor. Auch nach Infektion mit *P. syringae* lagen die Summen an nichtoxidierten MGDG bzw. DGDG in einem ähnlichen Bereich. In beiden Linien kam es zu einem 2-fachen Anstieg der MGDG und zu einem 1,2- (Col0) bzw. 1,6-fachen (*lox2-1*) Anstieg der DGDG. Die Akkumulation der oxidierten Galactolipide in der Mutante unterschied sich allerdings stark im Vergleich zum Wildtyp. In Col0 war ein 10,5-facher Anstieg der oxidierten MGDG zu beobachten, während in der Mutante nur ein 1,4-facher Anstieg zu verzeichnen war. Dies lässt schlussfolgern, dass LOX2 Oxidationsprodukte sehr stark in MGDG akkumulieren. In Bezug auf oxidierte DGDG zeigte der Wildtyp eine 2-fach höhere Akkumulation als die Mutante.

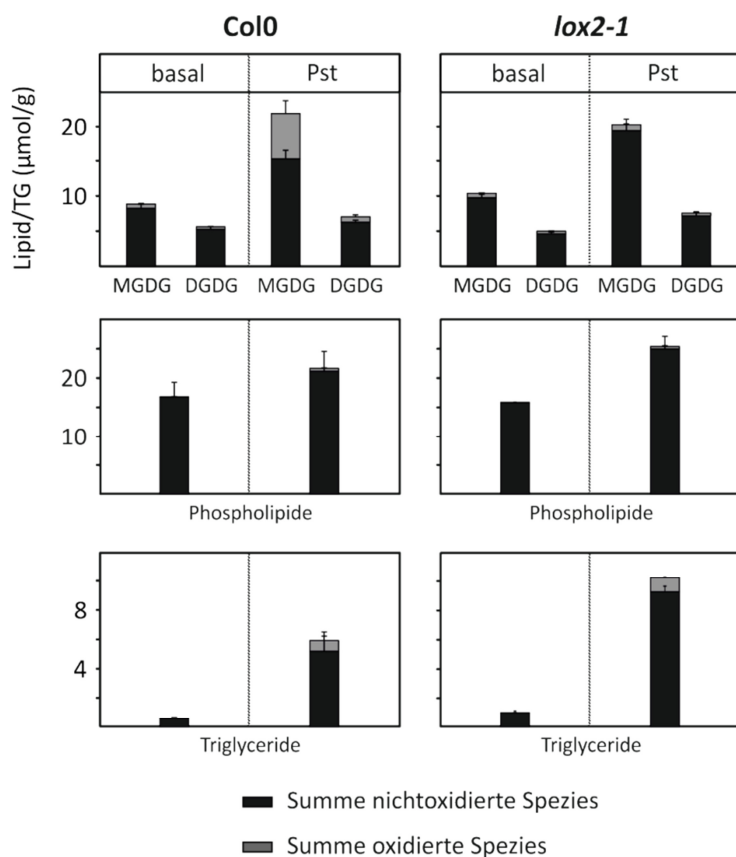


Abbildung II-25: Akkumulation von komplexen Lipiden im Wildtyp Col0 und in der Mutante *lox2-1*. Dargestellt sind die Summen an nichtoxidierten und oxidierten Spezies der komplexen Lipide in Col0 und *lox2-1* unter basalen Bedingungen und 24 Stunden nach Infiltration mit avirulenten *P. syringae* (MW+SD, n=3).

In beiden Pflanzenlinien kam es nach Infektion mit dem Pathogen ebenfalls zu einem leichten Anstieg (1,3- bis 1,6-fach) in der Summe der nichtoxidierten Phospholipidspezies. In Bezug auf oxidierte Phospholipide konnten beim Wildtyp bzw. in der Mutante eine 5,3- bzw. 5,7-fache Akkumulation beobachtet werden. Die gemessenen oxidierten Spezies zeigen folglich keine LOX2-Abhängigkeit.

Innerhalb der Gruppe der Triglyceride konnten die größten Veränderungen infolge der Pathogenbehandlung beobachtet werden. Hier kam es im Wildtyp zu einem 8,5-fachen Anstieg der Summe an nichtoxidierten TG. Diese Lipidakkumulation wurde in Bezug auf oxidierte Spezies noch weit übertroffen, da es hier zu einem 215-fachen Anstieg kam. Die Mutante *lox2-1* unterschied sich nicht im Vergleich zum Wildtyp. Die gemessenen Lipidspezies weisen demnach keine LOX2-Abhängigkeit auf.

## 9 TRANSMISSIONSELEKTRONENMIKROSKOPIE

Zusätzlich zu den quantitativen, analytischen Experimenten wurden *A. thaliana* Blätter mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) qualitativ untersucht. Es wurden Präparate von Blättern angefertigt, die mit Magnesiumsulfat bzw. mit avirulenten *P. syringae* infiltriert wurden. Zur Kontrolle wurden auch Präparate von komplett unbehandelten Blättern angefertigt. Die Chloroplasten wurden in den verschiedenen Präparaten genau betrachtet, um eventuelle Veränderungen infolge der Pathogeninfektion, die z. B. die Größe und Anzahl der Plastoglobuli betreffen, festzustellen.

Die mit Magnesiumsulfat infiltrierte Pflanze zeigte phänotypisch keine Unterschiede im Vergleich zur unbehandelten Pflanze. Auch die Chloroplasten dieser beiden Präparate wiesen keine Veränderungen auf. In Abbildung II-26 ist eine TEM Aufnahme eines Chloroplasten einer unbehandelten Pflanze zu sehen. Die Thylakoidmembranen, sowie die Anordnung zu Grana in einzelnen Bereichen, sind deutlich erkennbar. Die weißen Bereiche kennzeichnen Stärkeansammlungen. Einzelne Plastoglobuli (PG) sind in Form runder, dunkel gefärbter Strukturen erkennbar.

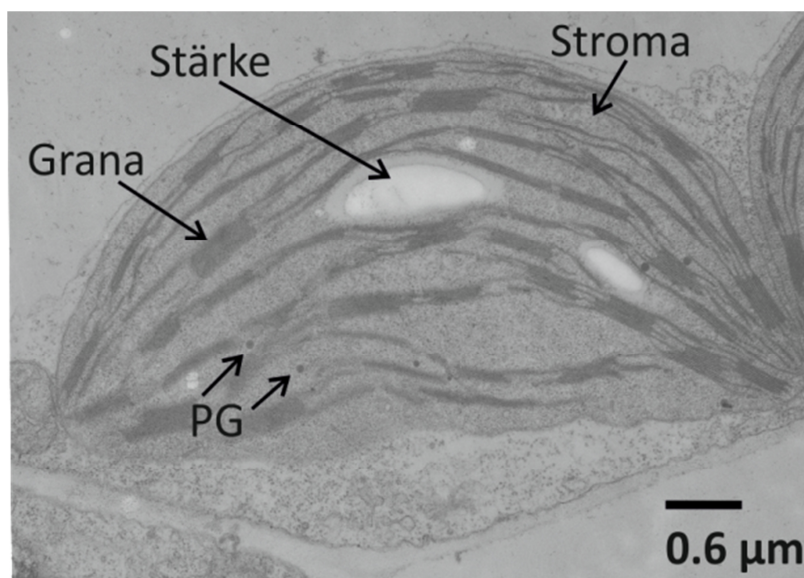


Abbildung II-26: TEM Aufnahme eines Chloroplasten einer unbehandelten Pflanze. Die charakteristischen Strukturen der Chloroplasten, wie Thylakoide, Stärkeansammlungen und Plastoglobuli (PG) sind gut erkennbar.

### 9.1 PLASTOGLOBULI

Beim Vergleich der Chloroplasten aus den Kontrollpräparaten mit den Pathogen-behandelten fielen sofort Veränderungen in Bezug auf die Plastoglobuli auf. Die mikroskopischen Aufnahmen sind in Abbildung II-27 hinterlegt. Nach Infektion mit *Pseudomonas* nahm sowohl die Anzahl, als auch die Größe der PG deutlich zu.

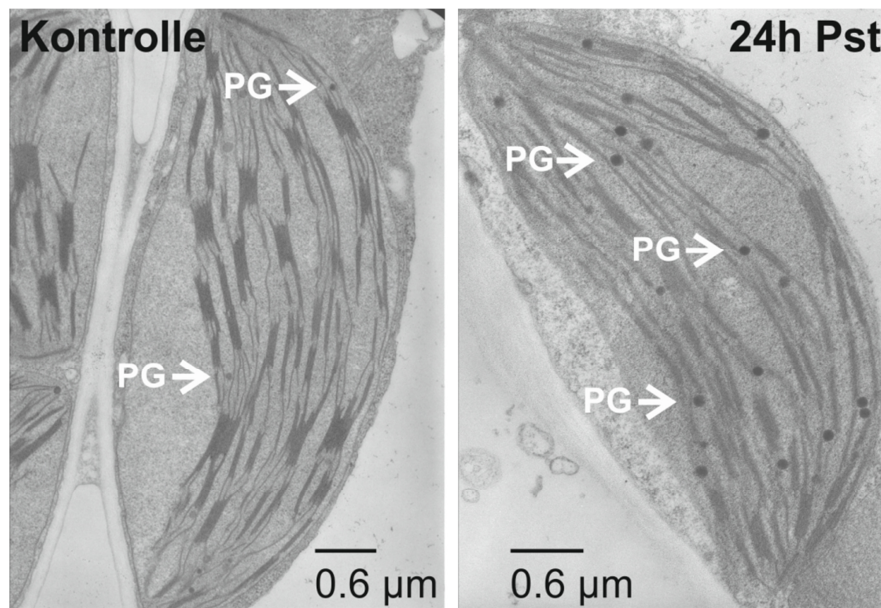


Abbildung II-27: TEM Aufnahmen von Chloroplasten 24 Stunden nach Infiltration mit Magnesiumsulfat bzw. *P. syringae* (Pst). Im Vergleich zur Kontrolle nimmt nach Pathogenbehandlung sowohl die Zahl als auch die Größe der Plastoglobuli (PG) deutlich zu.

Zur Bestätigung dieser Beobachtung wurde die Anzahl der Plastoglobuli pro Chloroplast sowohl in den Kontrollen, als auch nach Infektion bestimmt. Dazu wurden die Plastoglobuli von über 100 Chloroplasten je Behandlung ausgezählt. Es wurden immer drei verschiedenen Positionen bzw. Blattstückchen zum Auswerten berücksichtigt, so dass anschließend der Mittelwert mit Standardfehler bestimmt werden konnte. Die Ergebnisse sind in Abbildung II-28 dargestellt.

In den Kontrollen lagen im Durchschnitt 8,8 Plastoglobuli pro Chloroplast vor. Nach Infektion mit avirulenten *Pseudomonas* stieg die Anzahl um das ca. 1,5-fache auf 12,9 PG pro Chloroplast.

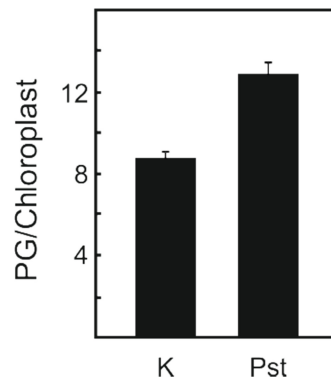


Abbildung II-28: Anzahl der Plastoglobuli (PG) pro Chloroplast in der Kontrolle (K) bzw. 24 h nach Infektion mit *Pseudomonas* (Pst). Die Zahl der Plastoglobuli nimmt nach Pathogenbehandlung zu (MW+SE, n=105).

## 9.2 PROLAMELLARKÖRPER

Im Zuge der Mikroskopie konnte eine Struktur beobachtet werden, die ausschließlich in den Präparaten der infizierten Blätter zu finden war. Es handelt sich hierbei um traubenartige Gebilde im Randbereich der Chloroplasten. Detaillierte Aufnahmen dieser Strukturen sind in Abbildung II-29 zu sehen.

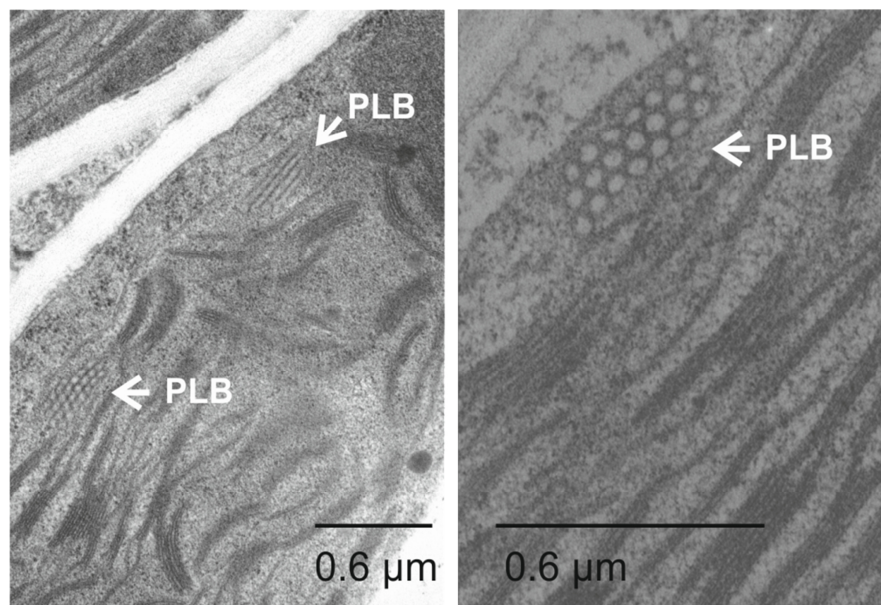


Abbildung II-29: TEM Aufnahmen von Prolamellarkörper. In einigen Präparaten der *Pseudomonas* infiltrierten Blätter kann die charakteristische Struktur des Prolamellarkörpers (PLB) beobachtet werden.

Überwiegend konnte eine dieser Formationen pro Chloroplast, ganz vereinzelt zwei, beobachtet werden. Der Aufbau der Struktur besteht aus bis zu vier Reihen von bis zu acht kleinen, hohl aussehenden Bläschen. Jede Reihe ist hierbei um eine dieser Hohlkugeln versetzt im Vergleich zu der angrenzenden Reihe. Vermutlich handelt es sich bei diesen Strukturen um Prolamellarkörper (engl.: prolamellar bodies, PLB). PLB wurden bisher nur in Etioplasten und in Chloroplasten von jungen, sich während der Dunkelheit entwickelnden Blättern, beobachtet. Obwohl die Funktion der PLB noch nicht vollständig aufgeklärt ist, wird vermutet, dass sie eine Rolle im Differenzierungsprozess von Chloroplasten spielen (Blomqvist *et al.* 2008).

Über 230 Chloroplasten pro Behandlung wurden auf das Vorhandensein eines Prolamellarkörpers untersucht. Anschließend wurde aus den Werten von drei verschiedenen Positionen bzw. Blattstückchen der Mittelwert mit Standardabweichung berechnet und in Abbildung II-30 dargestellt. In den Kontrollen konnte in keinem einzigen Fall diese Struktur beobachtet werden. Nach Infektion mit *Pseudomonas* war in 22,5 % der Chloroplasten ein Prolamellarkörper vorhanden.

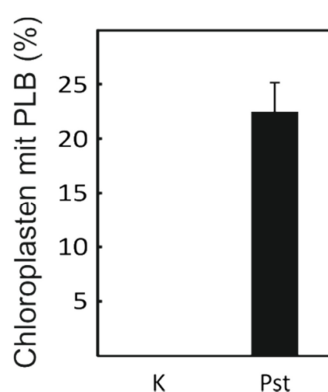


Abbildung II-30: Anteil der Chloroplasten mit Prolamellarkörper. Der Prolamellarkörper (PLB) wurde ausschließlich in Präparaten von infizierten Blättern detektiert (MW+SD, n=3).



### III DISKUSSION

#### 1 BIOSYNTHESE DER DICARBONSÄUREN AZELAIN- UND PIMELINSÄURE

In einigen Pflanzen kann AZA auf enzymatischem Weg aus Linolensäure gebildet werden. Die Enzyme 9-LOX, 9-HPL und Aldehyd Dehydrogenasen sind bei diesem Biosyntheseweg von essentieller Bedeutung (Mukhtarova *et al.* 2011). *A. thaliana* exprimiert keine 9-HPL, der Wildtyp Col0 ist darüber hinaus eine natürliche 13-HPL Mutante (Matsui 2006; Chehab *et al.* 2008). In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass in *Arabidopsis* die zwei bekannten cytosolischen 9-LOX (LOX1 und LOX5) nicht an der Biosynthese von AZA beteiligt sind. Die Biosynthese von AZA kann in *Arabidopsis* folglich nicht auf dem bekannten enzymatischen Weg stattfinden.

Eine Hock Fragmentierung des 9-Hydroperoxids stellt eine weitere Möglichkeit zur Biosynthese von AZA dar. Dieser Prozess wird durch starke Säuren bzw. hohe Temperaturen katalysiert (Schneider *et al.* 2008b). Beide Parameter liegen unter den physiologischen Bedingungen der Pflanzen nicht vor. Es konnte gezeigt werden, dass *in vitro* durch Radikal-katalysierte Oxidation und Fragmentierung nicht nur aus dem 9-Hydroperoxid ONA bzw. AZA entstehen, sondern auch aus dem 13-Hydroperoxid. Würde der Mechanismus analog des Hock Mechanismus verlaufen, könnten aus dem 13-Hydroperoxid nicht die Fragmente ONA bzw. AZA generiert werden.

Im tierischen System wurde publiziert, dass durch einen Radikal-katalysierten Prozess aus oxidierten Phospholipiden, die Hydroperoxide von mehrfach ungesättigten Fettsäuren beinhalten, Phospholipide mit oxidierten Fettsäurefragmenten, wie ONA, OHA, AZA bzw. PIM, entstehen (Podrez *et al.* 2002a; Podrez *et al.* 2002b; Hazen 2008). In *Arabidopsis* konnten weder unter basalen Bedingungen, noch nach Infektion mit *Pseudomonas*, Phospholipide mit veresterten oxidierten Fettsäurefragmenten nachgewiesen werden. ONA, OHA, AZA und PIM konnten allerdings in veresterter Form, basal und nach Pathogenbehandlung, in Galactolipiden detektiert werden. Applikationsexperimente mit freier AZA und markierter (deuterierter) ONA zeigten, dass die freien Fettsäurefragmente aufgenommen, aber nicht in Galactolipide verestert werden. Die Behandlung mit markierter ONA lässt schlussfolgern, dass der Aldehyd sofort zu AZA oxidiert wird. Dies erklärt, warum ONA bzw. OHA nie in freier, sondern nur in veresterter Form *in vivo* detektiert werden konnte. AZA wiederum kann durch  $\beta$ -Oxidation zu PIM metabolisiert werden. Die Oxidation und Fragmentierung der Fettsäuren findet in den Galactolipiden *in situ* statt. Freie AZA und PIM könnten daher ihren Ursprung in einer Lipase-vermittelte Freisetzung aus den komplexen Lipiden haben. Möglich wäre auch, dass ONA und OHA durch Lipasen aus der Membran freigesetzt werden und anschließend durch Stress-induzierte Aldehyd Dehydrogenasen zu AZA bzw. PIM oxidiert werden (Kirch *et al.* 2005). Nach Infektion mit *Pseudomonas* konnte ein 2- bis 2,5-facher Anstieg der fragmentierten

Galactolipide beobachtet werden. Die Menge der freien oxidierten Fettsäuren steigt im Vergleich dazu stärker an (3- bis 4-fach).

Die Plastiden stellen in Pflanzen eine der Hauptquellen an ROS, hauptsächlich an Singulett Sauerstoff, dar. Tatsächlich sind in komplexe Lipide veresterte Hydroxyfettsäuren fast ausschließlich Produkte der Singulett Sauerstoff vermittelten Oxidation. Die kurze Halbwertszeit von  $^1\text{O}_2$  bedingt, dass dieser mit Lipiden reagiert, die nahe an dem Ort, an dem er entsteht, lokalisiert sind, also dem Photosystem II (Triantaphylides *et al.* 2008). In ungezielten und gezielten Analysen konnte gezeigt werden, dass unter basalen Bedingungen drei Galactolipid Hauptspezies (MGDG-18:3-16:3, DGDG-18:3-18:3 und DGDG-18:3-16:3) hoch oxidiert in einem Bereich von 5 bis 9 Mol-%, relativ zur jeweiligen Vorstufe, vorliegen. MGDG-18:3-18:3, ebenso wie PG-, PI- und TG-Hydroxyfettsäurespezies liegen basal mit unter 2 Mol-% vor. Nach Infektion mit *Pseudomonas* ändert sich der Oxidationsgrad der Hydroxyfettsäuren in den Galactolipiden kaum. Innerhalb der TG kommt es allerdings zu einem dramatischen Anstieg der oxidierten Spezies, die nun in einem Bereich von 12 bis 38 Mol-% vorliegen.

## 2 FETTSÄURE FRAGMENTIERUNGSMECHANISMUS: DIMER-HYPOTHESE

Es wurde gezeigt, dass oxidativer Stress in Tieren eine Akkumulation von Phosphatidylcholinen mit veresterten Hydroperoxiden induziert. Diese komplexen Lipide können im Anschluss nichtenzymatisch oxidiert und fragmentiert werden. Die oxidierten Phosphatidylcholine (oxPC) beinhalten zum größten Teil Linol- und Arachidonsäurefragmente. Die typischen Acylketten in Phosphatidylcholinen, die aus Linolsäure entstehen sind der Aldehyd ONA und die Dicarbonsäure AZA (Podrez *et al.* 2002a). Weitere Aldehyde und die korrespondierenden Dicarbonsäuren wurden in den Acylketten identifiziert (Chen *et al.* 2008).

Der Fragmentierungsmechanismus von oxidierten, mehrfach ungesättigten Fettsäuren wurde kürzlich sehr detailliert von Schneider, Porter, Brash und weiteren Kollegen untersucht (Schneider *et al.* 2008a; Schneider *et al.* 2008b; Liu *et al.* 2011). In ihren Studien konnten sie zeigen, dass die Bildung von Fettsäurehydroperoxiden mit einem konjugierten Dien ein erster und essentieller Schritt im Fragmentierungsprozess ist, der allerdings nicht ausreicht. Die Aufklärung des Fragmentierungsmechanismus wurde mit der Erkenntnis vorangetrieben, dass Fettsäureperoxy-Radikale eine Bindung mit einem konjugierten Dien von Hydroperoxiden einer Reaktion mit einer nichtoxidierten Fettsäure bevorzugen (Schneider *et al.* 2008a; Schneider *et al.* 2008b).

Bereits in den 1970ern wurde in Autoxidationsansätzen Fettsäureperoxid-Dimere gefunden. Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesen Dimeren um potente Moleküle handelt, die die Lipidperoxidation vorantreiben (Morita und Fujimaki 1973a; Morita und Fujimaki 1973b).

Die Dimer-Hypothese zum Biosyntheseweg von AZA und PIM ist in Abbildung III-1 dargestellt. Durch die Addition eines Peroxylradikals an ein Fettsäurehydroperoxid kommt es zur Dimerbildung. Dieses instabile Zwischenprodukt zerfällt spontan in zwei Aldehyd-Fragmente, ein Alkoxyradikal und ein Hydroxylradikal. Bemerkenswert ist hierbei, dass durch die Fragmentierung des Dimers weitere Radikale entstehen. Das Dimermolekül stellt folglich eine *de novo* Quelle von Radikalen dar, was zu einer Vervielfachung der Radikale führt.

Die Dimerbildung und Fragmentierung der Fettsäuren wird in einer Umgebung in der ungesättigte Fettsäureacyl sehr eng und flächendeckend nebeneinander vorkommen erleichtert. Dies ist bei Glycerolipiden von Membranen der Fall.

Liu *et al.* (2011) konnten den Mechanismus der Dimer-Fragmentierung durch Studien an Cardiolipinen nach Tetrachlorkohlenstoff Behandlung in der Rattenleber bestätigen.

Der erläuterte Fragmentierungsmechanismus stimmt mit den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit überein. Ein konzentrierter Pool an mehrfach ungesättigten Lipidperoxiden, der in Galactolipiden identifiziert wurde, ist prädestiniert für eine Radikal-katalysierte Fettsäurefragmentierung. Die Lipidperoxide stellen eine große Quelle für eine *de novo* Bildung von Radikalen dar.

Wie schon erläutert, sind bereits unter basalen Bedingungen die Hauptspezies der MGDG und DGDG in *Arabidopsis* hoch oxidiert. Die Oxidation erfolgt fast komplett durch Einwirkung von Singulett Sauerstoff. Unter oxidativem Stress, wie zum Beispiel nach Infektion mit *Pseudomonas*, können Spuren an freien Radikalen die Dimerisierung der Lipidperoxide katalysieren, wodurch es zur Fragmentierung von Fettsäureacylresten und Amplifikation der Radikale kommt. Die Einwirkung der freien Radikale, ebenso wie die Stress-induzierte Bildung von Singulett Sauerstoff und das Enzym LOX2, führen zu einer starken Zunahme des Pools an oxidierten Galactolipiden.

Obwohl die Mutante *fad3,7,8* keine dreifach ungesättigten Fettsäuren besitzt, ist die Biosynthese von AZA und PIM nicht beeinträchtigt. In der Mutante sind dreifach ungesättigte Fettsäuren quantitativ durch zweifach ungesättigte ersetzt (McConn und Browse 1996). Folglich stellen die zweifach ungesättigten Fettsäuren ähnlich gute Substrate für den nichtenzymatischen Fragmentierungsmechanismus dar. *In vitro* Oxidationen von 18:2 führten ebenfalls zur Bildung von ONA und AZA.

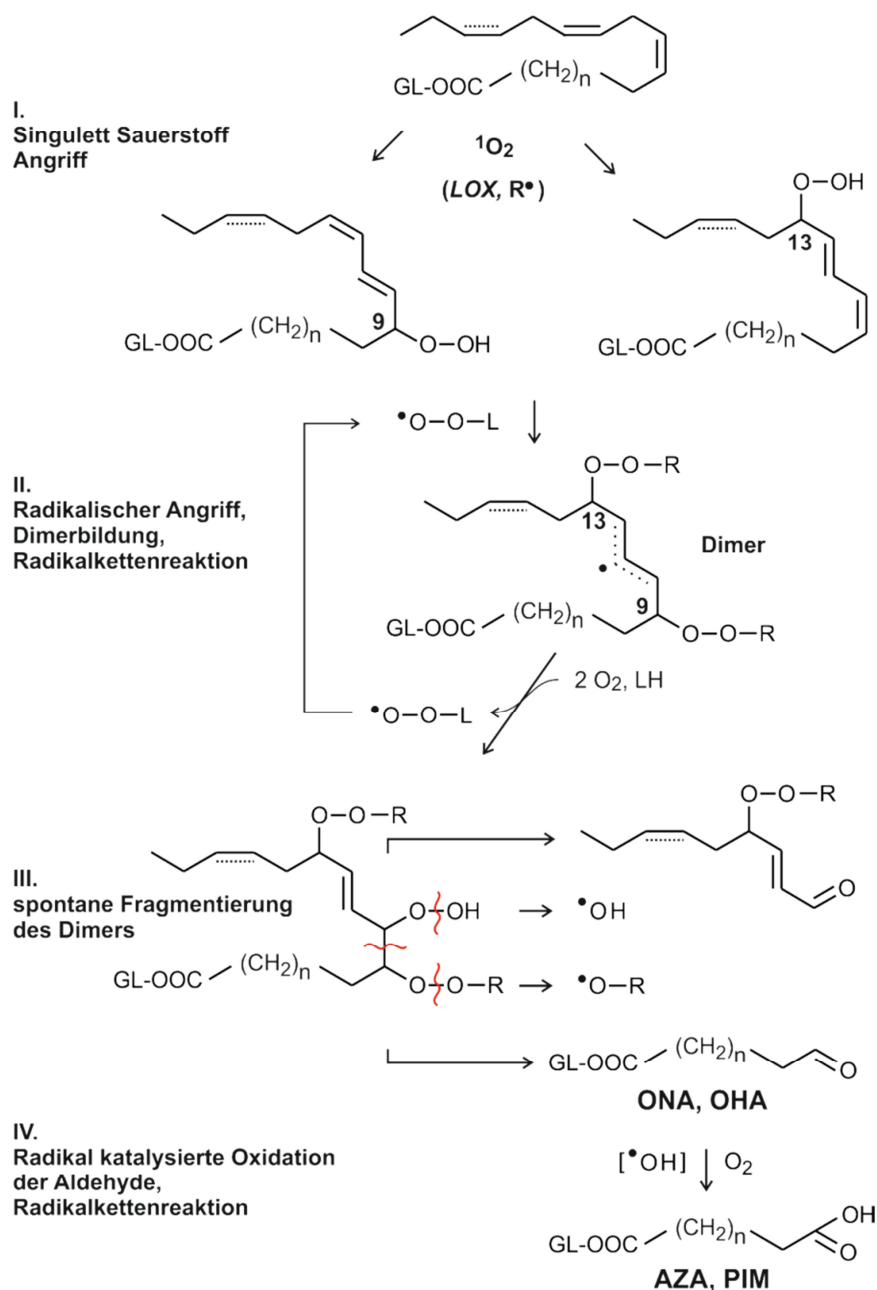


Abbildung III-1: Dimer-Hypothese zur Biosynthese von AZA und PIM. Ausgehend von zwei- bzw. dreifach ungesättigten Fettsäuren in Galactolipiden entstehen durch Singulett Sauerstoff, Lipoxygenasen oder frei Radikale Hydroperoxide, die durch einen weiteren radikalischen Angriff eine Dimerstruktur ausbilden. Der Dimer ist instabil und zerfällt spontan. Die unter anderem entstandenen Aldehydfragmente können anschließend zu Dicarbonsäuren oxidiert werden.

Zusätzlich zu den Galactolipiden liegen unter basalen Bedingungen auch zum Teil Phospholipide und Triacylglycerole in oxidierter Form vor. Der Oxidationsgrad ist im Vergleich zu den Galactolipiden um einiges niedriger und es konnten keine fragmentierten Fettsäuren in diesen Lipidklassen identifiziert werden.

Tiere besitzen keine Plastiden als Hauptquelle für ROS und akkumulieren keine durch Singulett Sauerstoff oxidierten Galactolipide. Der Grad der Oxidation der MGDG ist in Pflanzen um einige Größenordnungen höher als in Phosphatidylcholinen von Tieren. Unter basalen Bedingungen beträgt das Verhältnis von MGDG-ONA-16:3 zu MGDG-18:3-16:3 in *Arabidopsis* 0,5 Mol-%, während in der Aorta von Mäusen das Verhältnis von PC-ONA-16:0 zu PC-18:2-16:0 bei 0,0002 Mol-% liegt (Chen *et al.* 2008).

### 3 BEDEUTUNG DER AZA UND PIM BIOSYNTHESE

Es werden verschiedene physiologische Funktionen für PIM und AZA postuliert. Eine essentielle Funktion für die Entwicklung und Physiologie von Pflanzen spielt PIM in der Rolle als Substrat der Biotin Biosynthese. Unter basalen Bedingungen beträgt die Gesamtmenge von PIM und den Vorläufermolekülen OHA, ONA und AZA verestert in Galactolipide 99 nmol/g TG. Die Spiegel an freier PIM liegen in einem Bereich von 2-4 nmol/g TG. In *A. thaliana* Blättern beträgt die Menge an Biotin weniger als 1 nmol/g TG (berechnet aus Shellhammer und Meinke (1990)). Das bedeutet, dass die nichtenzymatische Fragmentierung der Galactolipide und eine Lipase-vermittelte Freisetzung der fragmentierten Fettsäuren einen theoretisch ausreichenden Weg darstellen, um PIM für den Biotin Biosyntheseweg zur Verfügung zu stellen. Es kann allerdings nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass es bisher unbekannte enzymatische Wege für die Biosynthese von AZA und PIM in *Arabidopsis* und anderen Pflanzen gibt. Bakterien, die generell keine mehrfach ungesättigten Fettsäuren besitzen (Nichols und McMeekin 2002), können PIM nicht auf dem nichtenzymatischen Dimer-Weg synthetisieren. In *E. coli* und *B. subtilis* wurden jedoch bereits enzymatische Wege aufgeklärt, mittels derer PIM aus gesättigten Fettsäuren entstehen kann (Lin und Cronan 2011).

Die Funktion der Lipidfragmente wie ONA und AZA ist noch nicht vollständig klar. In einigen Pflanzen werden diese Fragmente enzymatisch über einen 9-HPL Syntheseweg gebildet (Mukhtarova *et al.* 2011). Vermutlich entstehen sie in allen Pflanzen durch nichtenzymatische Oxidation der ungesättigten Fettsäuren in Membranen. Antimikrobielle Funktionen, ebenso wie eine Bedeutung im Signalmechanismus wurden für verschiedene Fettsäurefragmente postuliert (Matsui 2006). Jung *et al.* (2009) publizierten, dass freie AZA durch „Priming“ in *Arabidopsis* eine lokale und systemische Resistenz gegenüber dem Pathogen *Pseudomonas* induziert.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass freie AZA nach Infektion mit dem avirulenten Stamm von *Pseudomonas* infolge der hypersensitiven Reaktion (HR) lokal in den Blättern von *Arabidopsis* akkumuliert. Die HR ist charakterisiert durch eine oxidativen Burst, der durch NADPH Oxidasen in der Zellmembran initiiert wird, welche Superoxidation-Radikale produzieren. Obwohl das

Superoxidation-Radikal ebenso wie das Dismutationsprodukt Wasserstoffperoxid die Lipide nicht direkt oxidieren können, treiben diese ROS vermutlich eine Fragmentierung des Pools an zuvor oxidierten Galactolipiden an. Diese Reaktion stellt eine neue große Quelle an freien Radikalen in den Plastiden während der HR dar. Infolgedessen findet eine durch freie Radikale katalysierte Oxidation der Lipide statt, was ebenfalls ein gut untersuchtes Merkmal der HR ist. Parallel zu diesen Prozessen kommt es zu einer Re-Modellierung der Plastidenmembranen. Es konnte eine massive Biosynthese von komplexen Lipiden, vor allem innerhalb der Klassen der MGDG und Triacylglycerole beobachtet werden. Neben dem Anstieg der nichtoxidierten Spezies dieser beiden Klassen kann vor allem eine Akkumulation von LOX2-abhängigen Oxidationsprodukten innerhalb der MGDG beobachtet werden. In Tieren wurde gezeigt, dass die Oxidation der Zellmembran Lipide einen physischen Kontakt zwischen Rezeptoren (z. B. Toll-like Rezeptoren) und den entsprechenden molekularen Liganden ermöglicht. Außerdem gibt es spezifische Reparatur-Lipasen, die eine Substratspezifität für oxidierte Glycerolipide aufweisen. Vermutlich besteht ein molekulares Mimikry zwischen oxidierten Membranlipiden mit charakteristischen Strukturmotiven (z. B. AZA und ONA) und den Lipiden auf der Oberfläche von Pathogenen, was zu einer Aktivierung von spezifischen Rezeptoren des Immunsystems von Säugern führt. Demzufolge induziert endogener oxidativer Stress das Immunsystem auf ähnliche Weise wie Pathogene (Binder *et al.* 2002; Binder *et al.* 2003; Hazen 2008). In Pflanzen sind weder Rezeptoren noch spezifische Reparatur-Lipasen bekannt, die oxidierte Glycerolipide erkennen. Weiterhin wurde die Funktion von oxidierten Glycerolipiden in Pflanzen, mit Ausnahme von Arabidopsiden, noch nicht untersucht. Arabidopside akkumulieren sehr stark nach Infektion mit avirulenten *Pseudomonas*. Sie dienen entweder als Speichermoleküle für OPDA oder agieren selbst als antimikrobielle Sekundärmetaboliten (Kourtchenko *et al.* 2007). Da die Oxidation von Membranen einen konstitutiven Prozess darstellt, ist es sehr wahrscheinlich dass Lipasen existieren, die oxidierte und fragmentierte Fettsäuren freisetzen. Für viele freie oxidierte oder fragmentierte Fettsäuren, die aus oxidierten Membranen stammen, konnten biologische Aktivitäten bzw. eine Rolle in der Pathogenantwort von Pflanzen, nachgewiesen werden. Einige Beispiele hierfür sind AZA (Jung *et al.* 2009), Malondialdehyd (Weber *et al.* 2004), Hydroxyfettsäuren (Vellosillo *et al.* 2007), Phytoprostane und OPDA (Mueller *et al.* 2008).

#### 4 LOKALISATION DER LIPIDE

Nach Infektion mit *Pseudomonas* kommt es zu einer dramatischen Akkumulation von Lipiden in *Arabidopsis* Blättern. Die Spiegel an Galactolipiden, Triglyceriden und einigen Phospholipiden nehmen zu. Der größte Anstieg in der Summe der Lipide ist bei den Triglyceriden mit einer 8,5-fachen

Zunahme zu beobachten. Diese Beobachtung geht einher mit der Zunahme der Größe und Anzahl der Plastoglobuli in den Chloroplasten. Plastoglobuli sind von einer einfachen Lipidschicht umgeben. Diese Schicht ist mit der dem Stroma zugewandten äußeren Lipidschicht der Thylakoidmembran verbunden, wodurch ein Austausch an Lipiden zwischen der Thylakoidmembran und den Plastoglobuli stattfinden kann (Austin *et al.* 2006). Plastoglobuli fungieren als Speicher für Lipide in den Plastiden (Kessler und Vidi 2007) und sie sind involviert in verschiedenen metabolischen Synthesewegen, z. B. von Vitamin K, Tocopherol und Carotinoiden (Besagni *et al.* 2011). Größe und Anzahl der Plastoglobuli variieren als Reaktion auf verschiedene Umweltbedingungen. Bei Seneszenz steigen die Zahl und Größe der Plastoglobuli deutlich an (Kaup *et al.* 2002). Oxidativer Stress, bedingt durch eine Vielzahl an abiotischen oder biotischen Faktoren, trägt ebenfalls zu einer Veränderung der Plastoglobuli Zahl bzw. Größe bei. Einige Beispiele hierfür sind Trockenstress (Rey *et al.* 2000), hohe Salzkonzentrationen (Locy *et al.* 1996), Stickstoffmangel (Bondada und Syvertsen 2003), Pilz- und Virusinfektionen (Coulomb *et al.* 1996; Hernandez *et al.* 2004). Die Funktion der Plastoglobuli in der Pflanze Pathogen Interaktionen ist allerdings noch nicht klar. Möglicherweise stellen Plastoglobuli ein Reservoir für Thylakoidmembranlipide dar.

Neben der starken Akkumulation der Triglyceride in den Plastoglobuli konnte ebenfalls eine Zunahme der Galactolipide, insbesondere der MGDG (2-fach) infolge der Pathogeninfektion beobachtet werden. MGDG, ebenso wie höher oxidierte Lipide stellen aufgrund ihrer Struktur Lipide dar, die in reiner Form keine Lipid-Doppelschicht ausbilden können. MGDG können nur in Gegenwart ausreichender Mengen „Bilayer“-bildender Lipide, wie DGDG und PC, Membranen bilden. Nach Infektion mit *Pseudomonas*, konnten mittels Transmissionselektronenmikroskopie Prolamellarkörper (PLB) in den Chloroplasten identifiziert werden, die reich an MGDG sind (Gunning 2001). Bisher wurden PLB nur in Etioplasten und in Chloroplasten von jungen, sich während der Dunkelheit entwickelnden Blättern gefunden. Die Funktion der PLB ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Vermutlich spielen sie als Vorläufer bzw. Abbaustrukturen von Thylakoidmembranen eine Rolle im Differenzierungsprozess von Chloroplasten (Blomqvist *et al.* 2008). Das vorherrschende Protein in den PLB ist das Enzym NADPH:Protochlorophyllid Oxidoreduktase (POR), welches die Licht-abhängige Reduktion von Protochlorophyllid (Pchlid) zu Chlorophyllid (Chlid) in höheren Pflanzen katalysiert (Murakami und Ikeuchi 1982; Ryberg und Sundqvist 1982; Lindsten *et al.* 1993). Die PLB spielen eine wichtige Rolle für die schnelle Verfügbarkeit der photosynthetischen Aktivität nach Einwirkung von Licht, da Pchlid schnell reduziert und zu Chlorophyll verestert wird (Ruediger *et al.* 1980; Ryberg und Sundqvist 1988). Es wurde auch gezeigt, dass Pchlid, welches nicht durch POR reduziert wird, als Photosensitizer fungiert. Folglich kann es zur Bildung von Singulett Sauerstoff und zu photooxidativen Schäden kommen (Reinbothe *et al.* 1996; Sperling *et al.* 1997; Sperling *et al.* 1998). Die dominierende

Lipidklasse in den PLB sind MGDG (Gunning 2001). Das Verhältnis von Lipiden zu Proteinen ist in PLB im Vergleich zu Thylakoiden höher (Selstam und Sandelius 1984). Es wird vermutet, dass die Interaktion von POR und MGDG die PLB-Struktur stabilisiert (Klement *et al.* 1999; Engdahl *et al.* 2001; Selstam *et al.* 2002). Die Speicherung der Lipide ermöglicht die schnelle Bildung von Thylakoiden der Chloroplasten, wenn eine Pflanze normalen Lichtbedingungen ausgesetzt wird (Solymosi *et al.* 2007; Blomqvist *et al.* 2008). PLB beinhalten eine große Membranoberfläche, in welcher bis zu  $50 \mu\text{m}^2$  Membran in einen Kubikmikrometer verpackt sind (Gunning 2001). Dies entspricht vermutlich der höchsten Packungsdichte einer Membran, die in der Zelle erreicht werden kann. Diese „gepackten“ PLB können dann als vorgefertigtes Substrat für die Umwandlung in Thylakoide dienen. Es wurde postuliert, dass der hohe Gehalt an MGDG, welche eine kegelförmige Form aufweisen, zur ausgeprägten Struktur der PLB führt. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass MGDG hexagonale, röhrenförmige Mizellen formen (Gunning 2001). Die Entstehung der PLB nach Pathogeninfektion könnte eine Folge der massiven Akkumulation von Lipiden sein, die nicht an der Ausbildung einer Lipiddoppelschicht beteiligt sind, wie MGDG und oxidierte komplexe Lipide.

Die oxidierten Acylketten von komplexen Lipiden können aufgrund ihrer hohen Polarität nicht mehr der inneren Seite der Lipid Doppelschicht zugewandt sein. Folglich sind die oxidierten Ketten der äußeren, wässrigen Phase zugewandt, wodurch es zu einer Zerstörung der Barriere-Funktion der Membran kommen kann. Die oxidierten Fettsäuren von Glycerolipiden ragen wie Haare aus der Membran heraus und bilden sogenannte „Whisker“, entsprechend dem „Lipid Whisker Modell“ (Greenberg *et al.* 2008). Während des Oxidationsprozesses wird Sauerstoff an die hydrophobe Seitenkette der Lipide addiert, wodurch es zu einer Umorientierung der Acylkette kommt. Die nun deutlich polarere Seitenkette ist nicht mehr in die Membran eingebettet, sondern ragt in das wässrige Kompartiment hinein. NMR Daten der Konformation von oxidierten Phosphatidylcholinen zeigen, dass die Addition von nur einem Sauerstoff (z. B. Hydroxyfettsäuren) nicht ausreichend ist, um diese Umlagerung der Acylkette zu bewirken. Veresterte oxidierte Fettsäure-Fragmente, wie z. B. ONA und AZA ragen allerdings aus der Doppelmembran heraus, da sie deutlich polarer sind (Li *et al.* 2007). Auch zyklische Lipide in Pflanzen, wie OPDA und Phytoprostane ragen vermutlich aufgrund ihrer hohen Polarität (ähnlich wie Isoprostane, für die ein solches Verhalten ebenfalls beschrieben wurde) aus der Zellmembran heraus. Es ist sehr unwahrscheinlich, dass Arabidopside mit zwei oxidierten zyklischen Acylketten in die Thylakoid Doppelmembran integriert werden können. Dieser Verlust der Lipide muss durch eine *de novo* Lipid Biosynthese kompensiert werden.

In Tieren ermöglicht die Konformationsänderung oxidierter Glycerolipide der Zellmembran einen physischen Zugang der oxidierten Fettsäure zu Rezeptoren auf den Zelloberflächen von z. B. Makrophagen und auch zu spezifischen Phospholipasen, die eine Substratspezifität gegenüber



---

oxidierten Glycerolipiden aufweisen (Hazen 2008). Eine selektive Abspaltung der oxidierten Glycerolipide könnte eine Erkennung durch das Immunsystems verhindern und erlaubt eine Reparatur der Membran durch Re-Veresterung und Re-Modellierung. In Pflanzen sind allerdings bisher keine Rezeptoren oder Reparatur-Lipasen bekannt. Ob oxidierte Glycerolipide in Pflanzen ebenfalls eine Immunantwort auslösen ist bisher jedoch noch nicht untersucht worden.

## IV MATERIAL

## 1 CHEMIKALIEN

Bezeichnung	Lieferant
9-Oxononanoic Acid (ONA) 97 %	Larodan (Malmö, Schweden)
Murashige & Skoog (MS) Salze	Duchefa (Haarlem, NL)
Pioloform	Plano (Wetzlar)
MGDG-18:0-18:0 (1,2-distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-monogalactosyl)	Matreya LLC (Pleasant Gap, USA)
DGDG-18:0-18:0 (1,2-distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-digalactosyl)	Matreya LLC (Pleasant Gap, USA)
PC-17:0-17:0 (1,2-diheptadecanoly- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine)	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
TG-10:0-10:0-10:0, Tricaprin (Tridecanoin)	Larodan (Malmö, Schweden)
PG-17:0-17:0 (1,2-diheptadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-(1'- <i>rac</i> -glycerol) (sodium salt))	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
PI-16:0-16:0 (1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-(1'- <i>myo</i> -inositol) (ammonium salt))	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
PS-17:0-17:0 (1,2-diheptadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-L-serine (sodium salt))	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
PE-18:0-18:0 (1,2-distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine)	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
15-HEDE (15-Hydroxyeicosadienoic acid)	C. Triantaphylidès (Commissariat à l'Énergie Atomique (CEA), Cadarache, Frankreich)

Nicht aufgelistete Chemikalien wurden in der entsprechenden Reinheit von folgenden Herstellern bezogen: AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Fluka (Neu-Ulm), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Deisenhofen).

Die verwendeten Lösungsmittel von technischem Reinheitsgrad wurden von der Firma Roth (Karlsruhe) bezogen; Lösungsmittel von p.a.- bzw. HPLC-Qualität (gradient-grade) von Merck (Darmstadt). Laufmittel für die UPLC-TOF-MS-Analyse stammten von der Firma Biosolve (Valkenswaard, Niederlande) und hatten ULC/MS-Qualität.

**2 VERBRAUCHSMATERIAL**

<b>Artikel</b>	<b>Lieferant</b>
24 well-Multischalen (128 x 86 mm)	Nunc (Wiesbaden)
Cellstar Tubes (50 ml)	Greiner bio one (Frickenhausen)
Einmalspritzen (1 ml)	Dispomed (Geinhausen)
Electron Image Film SO-163	Kodak (Rochester, USA)
HPLC-Vials (0,3 ml)	Chromacol (Welwyn Garden City, UK)
Kupfernetz mit Kohle bedampft (300 Mash)	Plano (Wetzlar)
Kupfernetz mit Lochblende (75 Mash)	Plano (Wetzlar)
Mira cloth	Merck (Darmstadt)
Parafilm	A. Hartenstein (Versbach)
Pasteurpipetten	A. Hartenstein (Versbach)
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt (Nümbrecht)
Proben-Gläschen (2 ml)	A. Hartenstein (Versbach)
Pyrex-Reagenzgläser mit Schraubverschluss (10 ml)	Corning (Corning, USA)
Reagenzgläser (10 ml)	A. Hartenstein (Versbach)
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Rollrandgläser (5 ml)	A. Hartenstein (Versbach)
Schraubreaktionsgefäße (2 ml)	A. Hartenstein (Versbach)

### 3 PFLANZENMATERIAL

Alle *in vivo* Versuche wurden mit Hilfe der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* durchgeführt. Verwendet wurden die Wildtyp Ecotypen Columbia (Col0) und Wassilewskija (Ws), ebenso wie mehrere Mutantenlinien. Die Lipoxygenasemutanten *lox2-1*, *lox1*, *lox5* und *lox1,5* wurden freundlicherweise von E. Farmer (Glaser *et al.* 2009) zur Verfügung gestellt. Die Triple Mutante *fad3-2 fad7-2 fad8-1* (*fad3,7,8*) konnte von J. Browse (McConn und Browse 1996) bezogen werden. Die Mutantenlinien *dir1* und *azi1* wurden vom Nottingham Arabidopsis Stock Centre ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)) erworben.

### 4 MEDIUM ZUR PFLANZENANZUCHT

Zur Anzucht von Arabidopsis-Keimlingen wurde Wachstumsmedium nach Murashige & Skoog verwendet:

#### MS - Medium

Saccharose	30 g/l
MS-Salze (+ MES)	4,8 g/l
myo-Inositol	0,1 g/l
B5 Vitamine (1000x)	1 ml/l
ddH <sub>2</sub> O	ad 1 l
pH 5,7 (mit KOH eingestellt)	

#### B5 Vitamine (1000x)

myo-Inositol	100 mg/ml
Thiamine/HCl	10 mg/ml
Nicotinsäure	1 mg/ml
Pyridoxin/HCl	1 mg/ml

Das Medium wurde nach der Herstellung autoklaviert.

**5 BAKTERIEN FÜR INFILTRATION**

*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 – virulenter und avirulenter Stamm

**6 MEDIEN FÜR INFILTRATION VON *A. THALIANA* MIT *P. SYRINGAE*****LB-Medium**

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 1 l

Das Medium wurde abschließend autoklaviert.

Für Agarplatten wurden 12,4 g Agar pro Liter Medium hinzugefügt.

**Magnesiumsulfat-Lösung**

Magnesiumsulfat	10 mM
ddH <sub>2</sub> O	ad 1 l

Der Puffer wurde abschließend autoklaviert.

**Magnesiumsulfat bzw. Dikaliumhydrogenphosphat-Lösung für Bakterienmedium**

MgSO <sub>4</sub> bzw. K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1 g/ml
ddH <sub>2</sub> O	ad 1 l

Die Lösungen wurden abschließend mit Hilfe von Sterilfiltern sterilisiert.

**7 LÖSUNGEN FÜR DIE TRANSMISSIONSELEKTRONENMIKROSKOPIE****Lösung zur Fixierung von Chloroplasten im Gewebe**

Glutaraldehyd	5%
Cacodylat	0,1 M
pH 7,2 (eingestellt mit HCl)	

**Waschlösung zur Fixierung von Chloroplasten im Gewebe**

Saccharose	70mg/ml
Cacodylat	0,1 M

**Nachfixierlösung zur Fixierung von Chloroplasten im Gewebe**

Osmiumtetroxid	2%
Cacodylat	0,1 M

**Kontrastierungslösung nach Reynolds für die Transmissionselektronenmikroskopie**

Natriumcitrat	120 mM
Bleinitrat	80 mM
Natronlauge	pH 12,0, 8 ml, 1N
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 ml

**8 LABORGERÄTE**

<b>Autoklav</b>	Tuttnauer Systec 5075ELV (NY,USA)
<b>Klimaschrank</b>	Percival, CLF Plant Climatics (Emersacker) Intellus environmental controller, Percival Scientific (Perry, USA)
<b>Kühl- und Gefrierschränke</b>	+4 °C-Kühlschrank, Comfort, Liebherr (Ochsenhausen) -20 °C-Gefrierschrank, Liebherr (Ochsenhausen) -80 °C-Gefrierschrank, New Brunswick Scientific (Nürtingen)
<b>Massenspektrometer</b>	Quattro Premier Triple Quadrupol, Waters (Milford, USA) Time of Flight MS: SYNAPT G2 HDMS, Waters (Milford, USA)
<b>Messen/Wiegen</b>	0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl Einkanalpipetten, Eppendorf Research Variabel (Hamburg) Analysenwaage Sartorius BP211D Laborwaage Sartorius PE 1600 (Göttingen) AT 200 FACT, Mettler Toledo (Giessen)

---

	Sartorius BP3100P, DWS (Elk Grove, USA)
<b>Mikroskop</b>	EM 900 TEM, Zeiss (Oberkochen) EM 10 TEM, Zeiss (Oberkochen)
<b>pH Messung</b>	HI 9321 Microprocessor pH-Meter, Hanna Instruments (Portugal)
<b>Probenaufschluss</b>	Ultraschallstab Sonifier Cell disruptor B15, Branson (Schwäbisch Gmünd) Ultraschallbad Sonorex TK52, Bandelin (Berlin) Kugelmühle MM301, Retsch (Haan)
<b>Probenkonzentrierung</b>	Rotationsvakuumkonzentrator RVC 2-18 und RVC 2-25, Heraeus-Christ (Osterode) jeweils mit Membranvakuumpumpe MZ 2C, Vakuubrand (Wertheim) Rotavapor R 110, Büchi (Flawil, Schweiz)
<b>Rühren/Durchmischen</b>	Diverse Magnetrührer Vortex Genie 2, Scientific Industries (USA) REAX 2000, Heidolph (Schwabach)
<b>Schütteln</b>	Kreisschüttler 3015, GFL (Burgwedel) Multitron Standard, Infors HT (Bottmingen)
<b>Ultramikrotom</b>	MT-7000, Boeckeler (Tucson, USA)
<b>UPLC-Anlage</b>	Acquity-UPLC-System: Acquity Binary HPLC Pump, Waters (Milford, USA) Acquity Autosampler, Waters (Milford, USA) Acquity UPLC Säulenofen, Waters (Milford, USA)
<b>UPLC-Säulen</b>	Acquity UPLC BEH C18 Column, 2,1 x 50 mm, 1,7 µm, Waters (Milford, USA) Acquity UPLC BEH C8 Column, 2,1 x 50 mm, 1,7 µm, Waters (Milford, USA) Acquity UPLC BEH C18 Column, 2,1 x 100 mm, 1,7 µm, Waters (Milford, USA) Acquity BEH C18 VanGuard, 2,1 x 5 mm, 1,7 µm, Waters (Milford, USA) Acquity BEH C8 VanGuard, 2,1 x 5 mm, 1,7 µm, Waters (Milford, USA)
<b>Wasserbad</b>	Thermomix MM, B.Braun (Melsungen)

**Zentrifugieren**

Minifuge RF, Heraeus Sepatech (Osterode)

Zentrifuge 5415C, Eppendorf (Hamburg)

Zentrifuge 5804R, Eppendorf (Hamburg)



## V METHODEN

### 1 ANZUCHT DER PFLANZEN

#### 1.1 ANZUCHT AUF ERDE

Samen von *Arabidopsis thaliana* Col0 wurden auf Anzuchterde ausgesät und anschließend in einem Klimaschrank (Temperatur 22 °C, tägliche Lichtdauer 9 Stunden, Lichtintensität 120  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) angezogen. Nach zwei Wochen wurden die Keimlinge pikiert und für weitere vier Wochen im Klimaschrank herangezogen. Für alle Experimente wurden sechs Wochen alte Pflanzen verwendet.

#### 1.2 ANZUCHT STERILER KEIMLINGE

*Arabidopsis* Samen wurden für 2 min mit 700  $\mu\text{l}$  70%igem Ethanol behandelt. Nachdem der Alkohol entfernt wurde, erfolgte die Zugabe von 700  $\mu\text{l}$  einer Natriumhypochloridlösung (5 ml 15%iges Natriumhypochlorit, 2,5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  und 10  $\mu\text{l}$  10%iges Tween 20). In dieser Sterilisationslösung fand eine Inkubation der Samen für 10 min statt. Anschließend wurde die Flüssigkeit abgenommen und Reste der Natriumhypochloridlösung durch fünfmaliges Waschen mit 700  $\mu\text{l}$  sterilem Wasser entfernt.

Acht bis zehn der sterilen *Arabidopsis* Samen wurden zusammen mit je 1 ml MS-Medium in eine 24 Loch-Platte (128 x 86 mm) gegeben. Die Kultivierung der Platten erfolgte für 10 Tage im Klimaschrank auf einem Schüttler ( $\sim 200$  rpm) bei 22°C und einer Lichtdauer von 9 Stunden (180  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  oder  $\mu\text{E}$ ). Nach 7 Tagen fand ein Austausch des Wachstumsmediums gegen 1 ml frisches MS-Medium statt.

### 2 BEHANDLUNG DER PFLANZEN

#### 2.1 INFILTRATION VON *A. THALIANA* MIT *P. SYRINGAE*

Zu 100 ml LB-Medium wurden 1 ml  $\text{MgSO}_4$  (10%ige Lösung) und 1 ml  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (10%ige Lösung) zugefügt und mit den entsprechenden Antibiotika versetzt. Dieses Medium wurde mit *Pseudomonas syringae* pathovar *tomato* DC3000 angeimpft. Der Kolben wurde über Nacht bei 28 °C auf einem Schüttler inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Bakteriensuspension zentrifugiert (4 °C, 3000 rpm, 10 min), der Überstand abgekippt und das Pellet mit 40 ml einer 10 mM  $\text{MgSO}_4$ -Lösung gewaschen.

Nach erneuter Zentrifugation (4 °C, 3000 rpm, 10 min) wurde das Pellet in MgSO<sub>4</sub> bis zu einer Zelldichte von 0,2 (OD<sub>600</sub>=0,2) resuspendiert. Dies entspricht einer Bakterienkonzentration von 10<sup>8</sup> Kolonien-bildenden Einheiten pro ml Suspension. Mit dieser Infiltrationssuspension wurden sechs Wochen alte *A. thaliana*-Pflanzen infiltriert, indem die Suspension mit Hilfe einer 1 ml-Spritze durch die Spaltöffnungen der Blattunterseite von gut entwickelten Rosettenblättern gepresst wurde. Die Pflanzen wurden dann im Klimaschrank unter einer Haube, die zu starke Austrocknung vermeiden sollte, inkubiert. Zur Kontrolle wurde die gleiche Anzahl an Pflanzen mit MgSO<sub>4</sub>-Lösung infiltriert und ebenso kultiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die infiltrierten Blätter geerntet und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bei einigen Experimenten wurden nicht nur die infiltrierten Blätter, sondern auch systemische Blätter einer infiltrierten Pflanze geerntet. Bis zur Verwendung des Pflanzenmaterials wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

## 2.2 VERWUNDUNG VON *A. THALIANA* BLÄTTERN

Einzelne Blätter von sechs Wochen alten *A. thaliana*-Pflanzen wurden mit Hilfe einer Pinzette jeweils drei Mal pro Hälfte einer Blattspreite gequetscht. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden die verletzten Blätter geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

## 2.3 HOCHLICHT BEHANDLUNG VON *A. THALIANA*

Freundlicherweise wurde uns Pflanzenmaterial von der Arbeitsgruppe um Christian Triantaphylides (Commissariat à l'Énergie Atomique, CEA, Cadarache, Frankreich) zur Verfügung gestellt, welches aus einem Hochlicht-Experiment stammt. *Arabidopsis* Col0 Wildtyp Pflanzen wurden einer Hochlicht-Behandlung (1500 µE) ausgesetzt. Nach 0, 50 und 74 Stunden wurden die Blätter geerntet und in Stickstoff schockgefroren. Um ein Auftauen der Proben zu vermeiden, wurden sie uns auf Trockeneis zugeschickt. Anschließend erfolgte die Standardextraktion und Lipidanalyse in unserem Labor.

## 2.4 KUPFERSULFAT BEHANDLUNG VON *A. THALIANA* KEIMLINGEN

Sterile *A. thaliana* Col0 Keimlinge wurden 10 Tage auf einem Schüttler angezogen. 24 Stunden vor der Kupfersulfat Behandlung wurde das Wachstumsmedium gegen Wasser ausgetauscht. Am folgenden Tag wurde Kupfersulfat mit einer Endkonzentration von 500 µM appliziert. Die Platten

wurden anschließend im Klimaschrank auf dem Schüttler für 1,5 bzw. 24 Stunden inkubiert. Als Kontrolle wurde zu den Zeitpunkten 0, 1,5 und 24 Stunden Keimlinge geerntet, bei denen nur der Austausch des Mediums gegen Wasser stattgefunden hat. Die kompletten Pflanzen wurden mit Hilfe einer Pinzette vorsichtig aus der Flüssigkeit genommen, kurz auf einem Zellstofftuch abgetropft und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Alle Keimlinge aus den 24 Vertiefungen einer Platte wurden gepoolt und stellten eine Probe dar. Es erfolgte die Extraktion und Lipidanalyse gemäß den zuvor beschriebenen Methoden.

### 3 EXTRAKTION VON PFLANZENMATERIAL ZUR LIPIDANALYSE

#### 3.1 STANDARDAUFARBEITUNG ZUR ANALYSE FREIER UND KOMPLEXER LIPIDE

Blätter von *A. thaliana* wurden geerntet und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurde das gefrorene Blattmaterial in einer Reibschale mit einem Pistill zerkleinert. Das Mörsern erfolgte unter Zugabe von flüssigem Stickstoff, da das Material zu keinem Zeitpunkt auftauen sollte um enzymatische als auch nichtenzymatische Veränderungen zu verhindern. Bis zur Verwendung wurde das Pflanzenmaterial bei -80 °C gelagert.

Etwa 300 mg Pflanzenmaterial wurden in ein zwei ml Schraubdeckelgefäß eingewogen. Danach erfolgte die Zugabe von 1 ml Isopropanol sowie der Antioxidantien Triphenylphosphin (5 mg) und Butylhydroperoxid (1,5 mg) um eine Oxidation der Analyten während der Aufarbeitung zu verhindern. Die Proben wurden anschließend für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend erfolgte die Zugabe der internen Standards:

MGDG-18:0-18:0 und DGDG-18:0-18:0: je 5 µg;

TG-10:0-10:0-10:0: 100 ng;

PG-17:0- 17:0: 1 µg;

PI-16:0-16:0: 1 µg;

PS-17:0-17:0: 1 µg;

PE-18:0-18:0: 1 µg;

PC-17:0-17:0: 2 µg;

15-HEDE: 300 ng;

Dihydro-Jasmonsäure: 100 ng

Sebainsäure: 100 ng.

Die Proben wurden zur besseren Extraktion 5 Minuten mit Ultraschall behandelt und anschließend 10 Minuten bei 14.000 rpm bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Reagenzglas überführt.

Der Rückstand wurde noch zwei weitere Male mit folgenden Lösungsmitteln extrahiert: 1,5 ml Chloroform / Isopropanol (1:2, v/v) und 1,5 ml Chloroform / Methanol (2:1, v/v). Die Proben wurden mit den entsprechenden Lösungsmitteln durchmischt, 5 min mit Ultraschall behandelt und 10 min bei 14.000 rpm bei RT zentrifugiert. Die Überstände wurden im Reagenzglas vereinigt und bei 40 °C im Wasserbad eingengt. Der getrocknete Rückstand wurde zweimal in 1 ml Methanol gelöst, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 60 °C im Vakuumverdampfer zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 100 µl Methanol (1 mM Ammoniumacetat) resuspendiert und 10 min bei 14.000 rpm bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde in HPLC-Probengefäße überführt.

Ein Aliquot der Probe wurde einer alkalischen Hydrolyse unterzogen. Hierbei wurde zu einem Teil der Probe in einem Pyrexglas 20%ige Natronlauge zugegeben. Es folgte eine Inkubation im Wasserbad bei 60 °C für eine Stunde. Anschließend wurde der pH-Wert der Probe überprüft und mit 1 M Citronensäure auf einen Wert von 3 eingestellt. Die wässrige Phase wurde drei Mal mit je 1 ml Diethylether ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vereinigt und zwischendurch mittels Druckluft eingengt. Der Rückstand wurde anschließend in Acetonitril gelöst, für 10 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und in HPLC-Probengefäße überführt.

### 3.2 EXTRAKTION NACH BLIGH UND DYER

Es handelt sich bei dieser von Bligh und Dyer entwickelten Methode um eine Flüssig-flüssig Extraktion, die der schnellen Extraktion und Aufreinigung aller Lipide aus verschiedenem Probenmaterial dient (Bligh und Dyer 1959).

Blätter von *A. thaliana* wurden geerntet und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Mit Hilfe eines Mörsers wurde das Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff homogenisiert. Zur Aufarbeitung wurden 5 g Pflanzenmaterial in ein 50 ml Röhrchen eingewogen. Anschließend wurden 20 ml Methanol und 8 ml Chloroform hinzugefügt und der Ansatz sofort durchmischt und für 5 min im Ultraschallbad inkubiert. Durch die Mischung von Methanol, Chloroform und dem wässrigen Pflanzenmaterial entsteht ein Ein-Phasen-System mit dem sowohl polare als auch unpolare Lipide extrahiert werden. Da die komplexen Lipide oft amphiphil sind, eignet sich dieses Extraktionssystem sehr gut. Nach dem Zentrifugieren des Extraktes für 10 min bei 3000 rpm, wurde der Überstand abgenommen und der Rückstand mit 8 ml Chloroform reextrahiert. Nach einem erneuten Zentrifugations-Schritt wurden die Überstände vereinigt und durch Zugabe von 8 ml KCl-Lösung (1M) ein Zwei-Phasen-System hergestellt. Die organische Phase wurde abgenommen und mit Hilfe eines Rotationsverdampfers eingengt. Der Rückstand wurde anschließend in 2 ml Chloroform

aufgenommen. Die Extraktion wurde zweimal mit je 5 g Pflanzenmaterial durchgeführt, die gewonnenen Extrakte am Ende vereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### 4 *IN VITRO* OXIDATION VERSCHIEDENER FETTSÄUREN

##### 4.1 DÜNNFILM OXIDATION

Es wurde eine Dünnfilm-Oxidation, d.h. eine durch freie Radikale katalysierte Oxidation mit verschiedenen Fettsäuren (18:3, 18:2, 18:1, 9-HOO-18:3 und 13-HOO-18:3) durchgeführt.

Hierfür wurden 10 mg der jeweiligen Fettsäure mit 250 µl Diethylether in einem 250 ml Rundkolben als dünner Film verteilt. Die Inkubation erfolgte anschließend für ein bis sieben Tage bei Raumtemperatur und unter Ausschluss von Licht. Anschließend wurde der Rückstand im Kolben drei Mal mit je 500 µl Methanol in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zugabe von 3,5 ml Wasser und 10 mg Zinnchlorid wurde die Probe 30 Minuten auf Eis inkubiert. Während dieser Inkubation erfolgte die Reduktion der Peroxide durch das Zinnchlorid. Anschließend wurde der pH-Wert der Probe überprüft und falls nötig mit 1 M Citronensäure auf einen Wert von 3 eingestellt. Die wässrige Phase wurde zwei Mal mit je 3 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden im Reagenzglas vereinigt und mittels Druckluft eingeeengt. Der Rückstand wurde mit Diethylether in ein 1,5 ml HPLC-Vial überführt, mittels Druckluft eingedampft und anschließend in 200 µl Acetonitril gelöst. Somit erhielt man eine Konzentration von 50 mg Ausgangssubstanz pro ml Lösung. Zur Analyse mittels UPLC-MS/MS wurden 10 µl dieser Stocklösung mit internem Standard (300 ng 15-HEDE, 50 ng [<sup>18</sup>O]<sub>2</sub>-PPE, 250 ng [<sup>18</sup>O]<sub>2</sub>-PPF und 50 ng Sebainsäure) versetzt. Anschließend konnte die Menge an Hydroxyfettsäuren, Phytosteranen (18:3) und den Oxidationsfragmenten ONA und AZA bestimmt werden.

##### 4.2 PHOTOOXIDATION

Die zweite Möglichkeit der *in vitro* Oxidation von Fettsäuren stellt die Oxidation mittels Singulett Sauerstoff, die sogenannte Photooxidation dar.

Hierfür wurden 10 mg Fettsäure (18:3 bzw. 18:2) in 1 ml Methanol in einem 50 ml Rundkolben gelöst. Es erfolgte die Zugabe von 3 ml Wasser und 0,1 mM Methylenblau. Methylenblau dient bei dieser Reaktion analog dem Chlorophyll in der Pflanze als Photosensitizer. Durch Licht wird das Molekül in einen angeregten Zustand versetzt. Wenn es in den ursprünglichen Zustand zurückfällt,

wird diese Energie frei und an andere Moleküle weitergegeben. Somit entsteht aus Sauerstoff der hochreaktive Singulett Sauerstoff.

In einem zweiten Ansatz erfolgte die Zugabe von 0,5 % (w/v) Butylhydroxytoluol (BHT). BHT dient als Radikalfänger; die Zugabe gewährleistet so eine reine Photooxidation der Fettsäure. Die Ansätze wurden für zwei Stunden unter einer Hochlichtlampe bei  $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  inkubiert. Anschließend wurde die Oxidationsreaktion durch Zugabe von 10 mg Zinnchlorid gestoppt. Nachdem der Ansatz 30 Minuten reduzieren konnte, wurde der pH-Wert überprüft und falls nötig mit 1 M Citronensäure auf einen Wert von 3 eingestellt. Die wässrige Phase wurde zwei Mal mit je 2 ml Diethylether ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden im Reagenzglas vereinigt und mittels Druckluft eingengt. Der Rückstand wurde in 1 ml Methanol gelöst und in ein 1,5 ml HPLC-Vial überführt. Somit erhielt man eine Konzentration von 10 mg Ausgangssubstanz pro ml Lösung. Zur Analyse mittels UPLC-MS/MS wurden 10  $\mu\text{l}$  dieser Stocklösung mit internem Standard (300 ng 15-HEDE und 50 ng Sebainsäure) versetzt. Anschließend konnte die Menge an Hydroxyfettsäuren und den Oxidationsfragmenten ONA und AZA bestimmt werden.

## 5 LIPIDANALYTIK

### 5.1 LIPIDANALYSE MITTELS HPLC-MS/MS

Die chromatographische Auftrennung der Proben erfolgte an einem Acquity-UPLC<sup>TM</sup>-System der Firma Waters. Für die verschiedenen Lipidklassen wurden geeignete Auftrennungsmethoden entwickelt bzw. von anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe entwickelte Verfahren übernommen. Hierbei wurde mit unterschiedlichen Säulen, Lösemitteln und Gradienten gearbeitet. Die Methoden sind im folgenden Abschnitt aufgelistet.

Da es sich bei fast allen Proben um Rohextrakte handelt, wurde zum Schutz der jeweiligen Säule ein 0,2  $\mu\text{m}$  Partikelfilter und eine entsprechende Vorsäule (Acquity BEH C18 VanGuard, 2,1 x 5 mm, 1,7  $\mu\text{m}$  bzw. Acquity BEH C8 VanGuard, 2,1 x 5 mm, 1,7  $\mu\text{m}$ ) vorgeschaltet.

#### 5.1.1 HPLC METHODEN

##### Galactolipide

Zur chromatographischen Auftrennung der Galactolipide wurde eine Acquity UPLC BEH C8 Säule mit einem Durchmesser von 2,1 mm, einer Länge von 50 mm und einer Partikelgröße von 1,7  $\mu\text{m}$  verwendet. Die Säulentemperatur betrug 30 °C. Der Gradient startete mit einem Lösemittelverhältnis

von 25:75 (v/v) einer 1 mM Ammoniumacetatlösung in Wasser bzw. Methanol für eine Minute. Anschließend änderte sich die Zusammensetzung der Lösemittel linear bis 0:100 (v/v) in zehn Minuten. Es wurde einer Flussrate von 0,3 ml/min verwendet.

### **Phospholipide**

Die chromatographische Auftrennung der Phospholipide erfolgte mit Hilfe einer Acquity UPLC BEH C18 Säule mit einem Durchmesser von 2,1 mm, einer Länge von 50 mm und einer Partikelgröße von 1,7 µm. Die Säulentemperatur betrug 40 °C. Der lineare Gradient startete mit einem Lösemittelverhältnis von 25:75 (v/v) einer 1 mM Ammoniumacetatlösung in Wasser bzw. Methanol bis 0:100 (v/v) in zehn Minuten. Es wurde einer Flussrate von 0,3 ml/min verwendet.

### **Triglyceride**

Die Triglyceride wurden mit Hilfe einer Acquity UPLC BEH C8 Säule (2,1 x 50 mm; 1,7 µm) chromatographisch aufgetrennt. Die Säulentemperatur betrug 40 °C. Der lineare Gradient startete mit einem Lösemittelverhältnis von 10:90 (v/v) einer 1 mM Ammoniumacetatlösung in Wasser bzw. Methanol bis 0:100 (v/v) in zehn Minuten. Es wurde einer Flussrate von 0,3 ml/min verwendet.

### **Hydroxyfettsäuren**

Die chromatographische Auftrennung der Hydroxyfettsäuren erfolgte mit Hilfe einer Acquity UPLC BEH C18 Säule (2,1 x 50 mm; 1,7 µm). Die Säulentemperatur betrug 40 °C. Als Laufmittel wurden Wasser (1 mM Ammoniumacetat) und Acetonitril verwendet. Der lineare Gradient startete mit einem Lösemittelverhältnis von 65:35 (v/v) bis 30:70 (v/v) in sechs Minuten. Es wurde einer Flussrate von 0,25 ml/min verwendet.

### **Azelainsäure**

Für Azelainsäure und andere kurzkettige oxidierte Fettsäuren erfolgte die chromatographische Auftrennung an einer Acquity UPLC BEH C18 Säule (2,1 x 50 mm; 1,7 µm). Die Säulentemperatur betrug 40 °C. Als Laufmittel wurden Wasser (0,1 % Essigsäure) und Methanol (0,1 % Essigsäure) verwendet. Der lineare Gradient startete mit einem Lösemittelverhältnis von 95:5 (v/v) bis 0:100 (v/v) in zehn Minuten. Es wurde einer Flussrate von 0,25 ml/min verwendet.

### **Jasmonate**

Die Auftrennung der Jasmonate erfolgte an einer Acquity UPLC BEH C18 Säule (2,1 x 30 mm; 1,7 µm). Die Säulentemperatur betrug 30 °C. Als Laufmittel wurden Wasser (1 mM Ammoniumacetat) und

Acetonitril verwendet. Der lineare Gradient startet mit einem Lösemittelverhältnis von 95:5 (v/v) bis 40:60 (v/v) in drei Minuten. Es wurde eine Flussrate von 0,3 ml/min verwendet.

### 5.1.2 MS METHODEN

Die Detektion der chromatographisch aufgetrennten Analyten erfolgte an einem Quattro Premier Triple Quadrupol Massenspektrometer der Firma Waters. Hierbei erfolgte eine Elektrospray-Ionisierung sowohl im negativen (ESI<sup>-</sup>) als auch im positiven (ESI<sup>+</sup>) Modus. Als Desolvatisierungs- und Konusgas wurde Stickstoff verwendet. Die Detektion der Analyten erfolgte im „multiple reaction monitoring“ (MRM) Modus. Im MRM-Modus werden zunächst die gewünschten Molekül-Ionen („Parent“-Ionen) anhand ihres Masse/Ladungs-Verhältnisses ( $m/z$ ) im ersten Quadrupol des Massenspektrometers selektiert. In der Kollisionszelle werden diese Ionen anschließend durch Reaktion mit Argon fragmentiert. Im dritten Quadrupol werden in diesem Modus ausschließlich die spezifischen Fragmente isoliert und im Detektor registriert. Somit ist ein sehr selektiver und spezifischer Nachweis der einzelnen Analyten möglich. Für die verschiedenen Lipidklassen wurden unterschiedliche Geräteparameter gewählt. Die wesentlichen Einstellungen, ebenso wie die spezifischen Massenübergänge der einzelnen Analyten sind im Folgenden aufgelistet.

#### Galactolipide

Die Detektion der Verbindungen erfolgte im negativen Elektrospray-Modus (ESI<sup>-</sup>). Die Kapillarspannung betrug 2,23 kV und die Konusspannung 40 V. Die Quelltemperatur wurde auf 120 °C eingestellt. Zur Desolvatisierung wurde Stickstoff mit einer Flussrate von 850 l/h und einer Temperatur von 450 °C sowie zusätzlich Stickstoff als Konusgas mit einem Fluss von 50 l/h verwendet.

Tabelle V-1: Spezifische Massenübergänge ( $m/z$ ) der MGDG Molekül- und Fragmentionen und die verwendeten Kollisionsenergien.

	Molekül-Ion [M - H] <sup>-</sup>	Fragment-Ionen [FS] <sup>-</sup>		Kollisionsenergie (V)
<b>MGDG-18:0-18:0 (IS)</b>	785,6	283,3		26
<b>MGDG-18:3-16:3</b>	745,5	277,2	249,2	26
<b>MGDG-18:3-18:3</b>	773,5	277,2		26
<b>MGDG-18:3-265</b>	761,5	277,2	265,2	26
<b>MGDG-16:3-293</b>	761,5	249,2	293,2	26
<b>MGDG-18:3-293</b>	789,5	277,2	293,2	26



<b>MGDG-293-265</b>	777,5	293,2	265,2	26
<b>MGDG-293-293</b>	805,5	293,2		26
<b>MGDG-16:3-171</b>	639,4	249,2	171,1	26
<b>MGDG-18:3-171</b>	667,4	277,2	171,1	26
<b>MGDG-18:3-143</b>	639,4	277,2	143,1	26
<b>MGDG-16:3-187</b>	655,4	249,2	187,1	26
<b>MGDG-18:3-187</b>	683,4	277,2	187,1	26
<b>MGDG-18:3-159</b>	655,4	277,2	159,1	26
<b>MGDG-171-171</b>	561,3	171,1		26
<b>MGDG-171-143</b>	533,3	171,1	143,1	26
<b>MGDG-187-187</b>	593,3	187,1		26
<b>MGDG-187-159</b>	565,3	187,1	159,1	26
<b>Arabidopsid A</b>	773,5	291,2	263,2	26
<b>Arabidopsid B</b>	801,5	291,2		26
<b>Arabidopsid E</b>	1047,5	291,2		26
<b>Arabidopsid G</b>	1075,5	291,2		26
<b>MGDG-18:3-263</b>	759,5	277,2	263,2	26
<b>MGDG-16:3-291</b>	759,5	249,2	291,2	26
<b>MGDG-18:3-291</b>	787,5	277,2	291,2	26
<b>MGDG-18:3-281</b>	777,5	277,2	281,2	26
<b>MGDG-16:3-309</b>	777,5	249,2	309,2	26
<b>MGDG-18:3-309</b>	805,5	277,2	309,2	26

Tabelle V-2: Spezifische Massenübergänge ( $m/z$ ) der DGDG Molekül- und Fragmentionen und die verwendeten Kollisionsenergien.

	<b>Molekül-Ion [M - H]<sup>-</sup></b>	<b>Fragment-Ionen [FS]<sup>-</sup></b>		<b>Kollisionsenergie (V)</b>
<b>DGDG-18:0-18:0 (IS)</b>	947,7	283,3		26
<b>DGDG-18:3-16:3</b>	907,5	277,2	249,2	26
<b>DGDG-18:3-18:3</b>	935,6	277,2		26
<b>DGDG-18:3-265</b>	923,5	277,2	265,2	26
<b>DGDG-16:3-293</b>	923,5	249,2	293,2	26
<b>DGDG-18:3-293</b>	951,6	277,2	293,2	26
<b>DGDG-293-265</b>	939,5	293,2	265,2	26
<b>DGDG-293-293</b>	967,6	293,2		26
<b>DGDG-16:3-171</b>	801,4	249,2	171,1	26
<b>DGDG-18:3-171</b>	829,5	277,2	171,1	26
<b>DGDG-18:3-143</b>	801,4	277,2	143,1	26
<b>DGDG-16:3-187</b>	817,4	249,2	187,1	26
<b>DGDG-18:3-187</b>	845,5	277,2	187,1	26
<b>DGDG-18:3-159</b>	817,4	277,2	159,1	26
<b>DGDG-171-171</b>	723,3	171,1		26
<b>DGDG-171-143</b>	695,3	171,1	143,1	26

<b>DGDG-187-187</b>	755,3	187,1		26
<b>DGDG-187-159</b>	727,3	187,1	159,1	26
<b>Arabidopsid C</b>	935,5	291,2	263,2	26
<b>Arabidopsid D</b>	963,5	291,2		26
<b>DGDG-18:3-291</b>	949,6	277,2	291,2	26
<b>DGDG-18:3-263</b>	921,5	277,2	263,2	26
<b>DGDG-16:3-291</b>	921,5	249,2	291,2	26
<b>DGDG-18:3-309</b>	967,6	277,2	309,2	26
<b>DGDG-18:3-281</b>	939,5	277,2	281,2	26
<b>DGDG-16:3-309</b>	939,5	249,2	309,2	26

### Phospholipide

Die Detektion der Verbindungen erfolgte im negativen (PG, PI, PS, PC) bzw. im positiven (PE) Elektrospray-Modus (ESI- bzw. ESI+). Die Kapillarspannung betrug 3,25 kV und die Konusspannung 40 V. Die Quelltemperatur wurde auf 120 °C eingestellt. Zur Desolvatisierung wurde Stickstoff mit einer Flussrate von 800 l/h und einer Temperatur von 400 °C sowie zusätzlich Stickstoff als Konusgas mit einem Fluss von 50 l/h verwendet.

Tabelle V-3: Spezifische Massenübergänge ( $m/z$ ) der Phospholipid Molekül- und Fragmentionen und die verwendeten Kollisionsenergien.

	Molekül-Ion [M - H] <sup>-</sup>	Fragment-Ionen [FS] <sup>-</sup>		Kollisionsenergie (V)
<b>17:0-17:0-PG (IS)</b>	749,5	269,0		40
<b>PG-18:3-16:1</b>	741,5	277,2	253,2	40
<b>PG-293-16:1</b>	757,5	293,2	253,2	40
<b>PG-18:3-16:0</b>	743,5	277,2	255,2	40
<b>PG-293-16:0</b>	759,5	293,2	255,2	40
<b>16:0-16:0-PI (IS)</b>	809,5	255,0		42
<b>PI-18:3-16:0</b>	831,5	277,2	255,2	42
<b>PI-293-16:0</b>	847,5	293,2	255,2	42
<b>17:0-17:0-PS (IS)</b>	762,5	269,0		42
<b>PS-18:3-16:0</b>	756,5	277,2	255,2	42
<b>PS-293-16:0</b>	772,5	293,2	255,2	42
	Molekül-Ion [M + AcO] <sup>-</sup>	Fragment-Ionen [FS] <sup>-</sup>		Kollisionsenergie (V)
<b>17:0-17:0-PC (IS)</b>	820,5	269,0		26
<b>PC-18:3-18:2</b>	778,5	277,2	279,2	26
<b>PC-293-18:2</b>	794,5	293,2	279,2	26
<b>PC-18:3-293</b>	792,5	277,2	293,2	26

<b>PC-18:3-16:0</b>	754,5	277,2	255,2	26
<b>PC-293-16:0</b>	770,5	293,2	255,2	26
	<b>Molekül-Ion [M + H]<sup>+</sup></b>	<b>Fragment-Ion [M + H]<sup>+</sup> - [P - EA]</b>	<b>Kollisionsenergie (V)</b>	
<b>18:0-18:0-PE (IS)</b>	748,5	607,5	22	
<b>PE-18:3-16:0</b>	714,5	573,5	22	
<b>PE-293-16:0</b>	730,5	589,5	22	

### Triglyceride

Die Detektion der Verbindungen erfolgte im positiven Elektrospray-Modus (ESI+). Die Kapillarspannung betrug 3 kV und die Konusspannung 10 V. Die Quelltemperatur wurde auf 120 °C eingestellt. Zur Desolvatisierung wurde Stickstoff mit einer Flussrate von 800 l/h und einer Temperatur von 450 °C sowie zusätzlich Stickstoff als Konusgas mit einem Fluss von 50 l/h verwendet.

Tabelle V-4: Spezifische Massenübergänge ( $m/z$ ) der Triglycerid Molekül- und Fragmentionen und die verwendeten Kollisionsenergien.

	<b>Molekül-Ion [M+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>]<sup>+</sup></b>	<b>Fragment-Ionen [M+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>]<sup>+</sup> - [FS-NH<sub>4</sub>]</b>			<b>Kollisionsenergie (V)</b>
<b>TG-10:0-10:0-10:0 (IS)</b>	572,4	383,3			25
<b>TG-18:3-18:3-18:3</b>	890,7	595,4			25
<b>TG-18:3-18:3-293</b>	906,7	611,5	595,5		25
<b>TG-18:3-293-293</b>	922,7	627,5	611,5		25
<b>TG-293-293-293</b>	938,7	627,5			25
<b>TG-18:3-18:3-18:2</b>	892,7	597,5	595,5		25
<b>TG-18:3-293-18:2</b>	908,7	613,5	597,5	611,5	25
<b>TG-293-293-18:2</b>	924,7	613,5	627,5		25
<b>TG-16:0-18:3-18:2</b>	870,8	597,5	575,5	573,5	25
<b>TG-16:0-293-18:2</b>	886,7	613,4	575,5	589,4	25
<b>TG-16:0-18:3-18:3</b>	868,7	595,4	573,4		25
<b>TG-16:0-18:3-293</b>	884,7	611,5	589,5	573,4	25
<b>TG-16:0-293-293</b>	900,7	627,5	589,5		25

### Hydroxyfettsäuren

Die Detektion der Verbindungen erfolgte im negativen Elektrospray-Modus (ESI-). Die Kapillarspannung betrug 3 kV und die Konusspannung 26 V. Die Quelltemperatur wurde auf 120 °C eingestellt. Zur Desolvatisierung wurde Stickstoff mit einer Flussrate von 800 l/h und einer

Temperatur von 350 °C sowie zusätzlich Stickstoff als Konusgas mit einem Fluss von 50 l/h verwendet.

Tabelle V-5: Spezifische Massenübergänge ( $m/z$ ) der HOTE und HODE Molekül- und Fragmentionen und die verwendeten Kollisionsenergien.

	Molekül-Ion [M - H] <sup>-</sup>	Fragment-Ion [FS] <sup>-</sup>	Kollisionsenergie (V)
<b>15-HEDE (IS)</b>	323,1	223	20
<b>9-HOTE</b>	293,1	171	20
<b>10-HOTE</b>	293,1	155	20
<b>12-HOTE</b>	293,1	211	20
<b>13-HOTE</b>	293,1	195	20
<b>15-HOTE</b>	293,1	223	20
<b>16-HOTE</b>	293,1	235	20
<b>9-HODE</b>	295,1	171	20
<b>10-HODE</b>	295,1	155	20
<b>12-HODE</b>	295,1	211	20
<b>13-HODE</b>	295,1	195	20

#### Azelainsäure

Die Detektion der Verbindungen erfolgte im negativen Elektrospray-Modus (ESI<sup>-</sup>). Die Kapillarspannung betrug 3,25 kV und die Konusspannung 20 V. Die Quelltemperatur wurde auf 120 °C eingestellt. Zur Desolvatisierung wurde Stickstoff mit einer Flussrate von 800 l/h und einer Temperatur von 420 °C sowie zusätzlich Stickstoff als Konusgas mit einem Fluss von 50 l/h verwendet.

Tabelle V-6: Spezifische Massenübergänge ( $m/z$ ) der AZA Molekül- und Fragmentionen und die verwendeten Kollisionsenergien.

	Molekül-Ion [M - H] <sup>-</sup>	Fragment-Ion [FS] <sup>-</sup>	Kollisionsenergie (V)
<b>Sebainsäure (IS)</b>	201	139	14
<b>AZA</b>	187	125	14
<b>ONA</b>	171	127	12
<b>PIM</b>	159	97	14
<b>OHA</b>	143	125	12

### Jasmonate

Die Detektion der Verbindungen erfolgte im negativen Elektrospray-Modus (ESI-). Die Kapillarspannung betrug 3 kV und die Konusspannung 20 V. Die Quelltemperatur wurde auf 120 °C eingestellt. Zur Desolvatisierung wurde Stickstoff mit einer Flussrate von 800 l/h und einer Temperatur von 400 °C sowie zusätzlich Stickstoff als Konusgas mit einem Fluss von 50 l/h verwendet.

Tabelle V-7: Spezifische Massenübergänge ( $m/z$ ) der Jasmonat Molekül- und Fragmentionen und die verwendeten Kollisionsenergien.

	Molekül-Ion [M - H] <sup>-</sup>	Fragment-Ion [FS] <sup>-</sup>	Kollisionsenergie (V)
<b>dihydro-JA (IS)</b>	211	59	17
<b>JA</b>	209	59	17
<b>OPDA</b>	291	165	26

#### 5.1.3 QUANTIFIZIERUNG DER ANALYTEN

Die Detektion der Analyten erfolgte im „multiple reaction monitoring“ (MRM) Modus. Bei diesem Modus werden zunächst die gewünschten Molekül-Ionen („Parent“-Ionen) anhand ihres Masse/Ladungs-Verhältnisses ( $m/z$ ) im ersten Quadrupol des Massenspektrometers selektiert. In der Kollisionszelle werden diese Ionen anschließend durch Reaktion mit Argon fragmentiert. Im dritten Quadrupol werden ausschließlich die spezifischen Fragmente isoliert und im Detektor registriert. Somit ist ein differenzierter Nachweis der einzelnen Analyten möglich.

Eine Quantifizierung der Analyten erfolgte durch Flächenvergleich (AUC) der Analyten mit dem entsprechenden internen Standard. Die Integration der Peaks erfolgte durch die Software QuanLynx (Waters) gefolgt von einer manuellen Korrektur. Im Falle der komplexen Lipide wurden anschließend die Flächen beider Fragment-Ionen addiert und mit der Fläche des internen Standards verrechnet.

Aufgrund der unterschiedlichen Empfindlichkeit des Detektors für die einzelnen Analyten im Vergleich zur Standardverbindung muss jeweils ein eigener Responsefaktor ermittelt werden. Im Falle der komplexen Lipide war dies aufgrund mangelnder Referenzverbindungen nicht möglich. Für die freien Lipide wurden die in Tabelle V-8 hinterlegten Responsefaktoren ermittelt und zur Quantifizierung verwendet.

Tabelle V-8: Responsefaktoren zur Quantifizierung der freien Lipide

	<b>Responsefaktor</b>
<b>9-HOTE gegen 15-HEDE</b>	1,47
<b>10-HOTE gegen 15-HEDE</b>	4,09
<b>12-HOTE gegen 15-HEDE</b>	2,39
<b>13-HOTE gegen 15-HEDE</b>	1,85
<b>15-HOTE gegen 15-HEDE</b>	0,66
<b>16-HOTE gegen 15-HEDE</b>	2,13
<b>9-HODE gegen 15-HEDE</b>	0,73
<b>10-HODE gegen 15-HEDE</b>	5,12
<b>12-HODE gegen 15-HEDE</b>	34,69
<b>13-HODE gegen 15-HEDE</b>	1,01
<b>AZA gegen Sebainsäure</b>	1,11
<b>9-ONA gegen Sebainsäure</b>	27,04
<b>7-OHA gegen Sebainsäure</b>	1,00
<b>PIM gegen Sebainsäure</b>	1,76
<b>JA gegen dh-JA</b>	1,07
<b>OPDA gegen dh-JA</b>	0,53

## 5.2 ANALYSE PER DIREKTINFUSION

Zur Bestimmung des Markierungsgrades fand eine Analyse per Direktinfusion mittels UPLC-ESI-MS statt. Die zu testende Lösung wurde direkt mittels Spritzenpumpe dem HPLC-Eluenten zudosiert. Der Fluss der Spritzenpumpe betrug 25  $\mu\text{l}/\text{min}$  bei einem HPLC-Fluss von 200  $\mu\text{l}/\text{min}$  mit einer Zusammensetzung der Eluenten von 50 % Ammoniumacetat(1 mM) und 50% Acetonitril. Die Detektion der Verbindungen erfolgte mit einem Waters Micromass Quattro Premier-Massenspektrometer im negativen Elektrospray-Modus (ESI<sup>-</sup>). Die Kapillarspannung betrug 3 kV und die Konusspannung 20 V, die Quelltemperatur wurde auf 120 °C eingestellt. Zur Desolvatisierung wurde Stickstoff mit einer Flussrate von 800 l/h und einer Temperatur von 350 °C sowie zusätzlich Stickstoff als Konusgas mit einem Fluss von 50 l/h verwendet. Detektiert wurden negativ geladene Ionen im Fullscan-Modus in einem Masse/Ladungs-Bereich von m/z 100 – 400 bei einer Scan-Rate von 0,5 Scans/s. Eine Quantifizierung erfolgte relativ durch Flächenvergleich (AUC) der Analyten.

### 5.3 LIPIDANALYSE MITTELS UPLC-QTOF

#### 5.3.1 HPLC METHODE

Zur chromatographischen Auftrennung wurde eine Acquity UPLC BEH C18 Säule mit einem Durchmesser von 2,1 mm, einer Länge von 100 mm und einer Partikelgröße von 1,7  $\mu\text{m}$  verwendet. Die Säulentemperatur betrug 60 °C. Der Gradient startete mit einem Lösemittelverhältnis von 70:30 (v/v) einer 10 mM Ammoniumacetatlösung in Wasser/Acetonitril 40:60 (v/v) bzw. Acetonitril/Isopropanol 10:90 (v/v). Anschließend änderte sich die Zusammensetzung der Lösemittel linear bis 1:99 (v/v) in zehn Minuten. Es wurde einer Flussrate von 0,3 ml/min verwendet.

#### 5.3.2 MS METHODE

Die Detektion der chromatographisch aufgetrennten Analyten erfolgte an einem Flugzeit Massenspektrometer der Firma Waters (SYNAPT HDMS G2). Hierbei erfolgte eine Elektrospray-Ionisierung sowohl im negativen (ESI<sup>-</sup>) als auch im positiven (ESI<sup>+</sup>) Modus. Die Kapillarspannung betrug 0,8 kV, die Quellenspannung 25 V, die Quellentemperatur 120 °C, die Desolvationstemperatur 400 °C und der Desolvationsgasfluss lag bei 800 l/h. Spektren wurden im Breitbandmodus erworben und das Massenspektrometer wurde extern mit Hilfe von Natriumformiatclustern (0,5 mM) innerhalb des benötigten Massenbereiches (50-2000 Da) im Sensitivitäts-Modus kalibriert. Der Massenfehler der erhaltenen Peaks war somit stets kleiner als 1 ppm. Während der Messung fand eine interne Kalibrierung mittels externer Ionisierungs-Quelle (LockSpray) statt. Bei der Referenzkomponente handelte es sich um Leucin-Enkephalin (LeuEnk) bei einer Konzentration von 2 ng/ $\mu\text{l}$ . Die Ionen-Intensität von LeuEnk wurde alle 30 s unter Verwendung eines Baffles gemessen und die Massengenauigkeit automatisch korrigiert.

Das Massenspektrometer wurde in zwei Modi simultan betätigt: (1) im MS-Modus, der auch als Low-Energy-Funktion (LE) bezeichnet wird, und (2) im MSe-Modus, der auch High-Energy-Funktion (HE) genannt wird. Im MS-Modus wurde eine Kollisionsenergie von 4 V verwendet, wohingegen diese im MSe-Modus in einem Ramping von 15 bis zu 35 V anstieg. Dies ermöglichte die Fragmentierung der Analyten im MSe-Modus. In beiden Modi wurde Argon innerhalb der Kollisions-Zelle verwendet. Der Scan erfolgte alle 0,15 s im Fall beider Modi und die Massenspektren wurden im Kontinuum-Modus aufgenommen.

Zur Bedienung des LC-MS-Systems und zum Erhalt der Daten diente das Programm MassLynx 4.1 (Waters). Die Daten-Interpretation erfolgte unter Verwendung einiger kommerziell verfügbarer

Programme von Waters (MSe-Data-Viewer, ChromaLynx) sowie einiger, auf Excel basierender, selbstentwickelter Programme.

## 6 BERECHNUNGEN ZUM OXIDATIONSMECHANISMUS

Nach Quantifizierung der einzelnen Hydroxyfettsäurespezies wurde der zugrunde liegende Oxidationsmechanismus berechnet. Grundlage hierzu war das Verteilungsmuster der einzelnen Hydroxyfettsäuren nach radikalischer Oxidation bzw. nach Photooxidation (Frankel 1998). Die Berechnungen wurden nach dem in Tabelle V-9 hinterlegten Schema durchgeführt.

Bei der Oxidation von 18:3 durch Singulett-Sauerstoff entstehen sechs HOTE-Isomere in gleichen Mengen (9-, 10-, 12-, 13-, 15- und 16-HOTE), da der Angriff an jeder Position einer Doppelbindung gleichberechtigt erfolgt. Die radikalische Oxidation von 18:3 liefert die Produkte 9-, 12-, 13- und 16-HOTE mit ungleicher Verteilung: 9-HOTE 30,6 %, 12-HOTE 10,1 %, 13-HOTE 10,8 % und 16-HOTE 48,6 %.

Zuerst erfolgte die Kalkulation der Summe an HOTE, die durch Singulett Sauerstoff Oxidation entstehen. Hierzu wurde die Menge an 15-HOTE (entsteht ausschließlich durch Singulett Sauerstoff) mit dem Faktor 6 multipliziert. Der Faktor 6 ergibt sich, da bei der Photooxidation alle sechs HOTE-Spezies in gleichen Mengen entstehen.

16-HOTE kann ausschließlich durch einen Radikal-katalysierten Mechanismus generiert werden. Die Menge dieses Isomers wurde zur Berechnung der Summe aller durch Radikale entstanden HOTE herangezogen. Zunächst muss der Singulett Sauerstoff Anteil subtrahiert werden (16-HOTE - 15-HOTE), danach wird mit dem Faktor 2,05 multipliziert. Der Faktor 2,05 ergibt sich aus dem Anteil von 16-HOTE an den radikalischen Produkten. Die Daten aus der Literatur belegen, dass 16-HOTE zu 48,6 % in einem radikalischen Ansatz entsteht ( $100\% / 48,6\% = 2,05$ ).

Zur Berechnung der durch 9- bzw. 13-LOX entstanden Mengen erfolgt zuerst die Kalkulation der 9- bzw. 13-Singulett-Produkte und 9- bzw. 13-Radikal-Produkte. Bei den Singulett-Produkten muss die kalkulierte Gesamtmenge mit dem Faktor 0,16 ( $=1/6$ ) multipliziert werden. Die Kalkulation der radikalischen Produkte erfolgt erneut mit Hilfe der Literaturwerte. 13-LOX entsteht in einem radikalischen Ansatz zu 10,8 %, daher Faktor 0,108; 9-LOX zu 30,6 %, daher Faktor 0,306.

Anschließend kann durch Subtraktion die Menge der 13-LOX bzw. 9-LOX Produkte berechnet werden. Ein Vergleich der tatsächlich gefundenen Summe an HOTE mit der kalkulierten Summe zeigte, dass die Berechnung stets sehr reproduzierbar ist.



Tabelle V-9: Schema zur Berechnung des zugrundeliegenden Oxidationsmechanismus der Hydroxyfettsäuren

Singulett total	= 15-HOTE *6
Radikal total	= (16-HOTE - 15-HOTE)*2,05
13-LOX	= 13-HOTE - 13-HOTE (Singulett) - 13-HOTE (Radikal)
9-LOX	= 9-HOTE - 9-HOTE (Singulett) - 9-HOTE (Radikal)
13-Singulett	= Singulett total *0,16
13-Radikal	= Radikal total *0,108
9-Singulett	= Singulett total *0,16
9-Radikal	= Radikal total *0,306
Summe gefundenen HOTE	
Summe kalkulierte HOTE	= Singulett total + Radikal total + 13-LOX + 9-LOX
Singulett (%)	= Singulett total / Summe kalkulierte HOTE *100
Radikal (%)	= Radikal total / Summe kalkulierte HOTE *100
13-LOX (%)	= 13-LOX / Summe kalkulierte HOTE *100
9-LOX (%)	= 9-LOX / Summe kalkulierte HOTE *100

## 7 IDENTITÄTSNACHWEIS DER VERESTERTEN FETTSÄUREFRAGMENTE

Die Detektion der komplexen Lipide im MRM Modus gibt Aufschluss über die Masse des Gesamtmoleküls und der einzelnen Acylketten. Hinter den detektierten Massen können sich unterschiedliche Verbindungen mit gleichem Masse/Ladungs Verhältnis verbergen. Um nachzuweisen, dass es sich bei den oxidierten Galactolipiden tatsächlich um die veresterten Fettsäurefragmente ONA, OHA, AZA bzw. PIM handelt, wurden Experimente zum Identitätsnachweis durchgeführt.

Aus *A. thaliana* Pflanzenmaterial wurde ein Bligh und Dyer Extrakt hergestellt (siehe Methoden 3.1). Da die Galactolipide mit oxidierten Fettsäurefragmenten nur in geringer Menge vorkommen, wurde der Extrakt *in vitro* oxidiert, was zu einer starken Akkumulation der oxidierten Galactolipide führte. Mit diesem oxidierten Ansatz wurden im Anschluss verschiedene Derivatisierungsreaktionen und eine Hydrolyse der gesammelten Peaks durchgeführt, die dem Identitätsnachweis der fragmentierten Fettsäuren dienen sollten.

### 7.1 OXIDATION DES PFLANZENEXTRAKTS

Von dem zuvor gewonnen Pflanzenextrakt wurden 800 µl (dies entspricht 2 g Ausgangsmaterial) abgenommen, eingengt und in 100 µl Methanol gelöst. Nach der Zugabe je einer Spatelspitze Eisen(II)-sulfat und Ascorbat, sowie 100 µl Wasser und 100 µl Wasserstoffperoxid erfolgte eine

Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur. Die Oxidation wurde durch Zugabe von 500 µl einer Zinnchlorid-Suspension (50 mg/ml) abgestoppt. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit zur Reduktion, wurde der Ansatz zweimal gegen je 750 µl Chloroform ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden vereinigt, bis zur Trockne eingeeengt und in 500 µl Methanol aufgenommen. Mittels UPLC-MS/MS wurde der Oxidationserfolg überprüft.

## **7.2 DERIVATISIERUNG**

### **7.2.1 DERIVATISIERUNG DER ALDEHYDGRUPPEN**

Die Derivatisierung der Aldehydgruppe sollte mittels Methoxyamin durchgeführt werden. Hierzu wurden 50 µl der oxidierten Probe eingeeengt und anschließend in 20 µl einer Methoxyamin-Lösung (1mg/10µl in DMF) gelöst. Nach der Inkubation für 1 h bei 40 °C wurde die Probe mit Hilfe eines Rotations-Vakuum-Konzentrators bei 60 °C eingeeengt, in 50 µl Methanol gelöst, zentrifugiert (10 min, 14.000 rpm) und mittels UPLC-MS/MS analysiert.

### **7.2.2 METHYLIERUNG DER CARBOXYLGRUPPEN**

Trimethylsilyldiazomethan kann als Methylierungsmittel von Carboxylgruppen eingesetzt werden und stellt aufgrund seiner geringeren Flüchtigkeit eine weniger bedenkliche Alternative im Vergleich zu Diazomethan dar.

Zur Methylierung wurden 50 µl einer oxidierten Probe mittels Druckluft eingeeengt und 40 µl Trimethylsilyldiazomethan (2 M in Hexan) hinzugefügt. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur, wurde die Probe unter Druckluft zur Trockne eingeeengt, in 50 µl Methanol gelöst, zentrifugiert (10 min, 14.000 rpm) und mittels UPLC-MS/MS analysiert.

## **7.3 AUFREINIGUNG UND HYDROLYSE OXIDIERTER GALACTOLIPIDE**

Eine weitere Möglichkeit des Identitätsnachweises der oxidierten Fettsäurefragmente in Galactolipiden stellte das Auffangen der entsprechenden Peaks mit anschließender Hydrolyse und Analyse der freien Säuren dar.

Hierzu wurde der oxidierte Pflanzenextrakt mittels UPLC aufgetrennt. Zu entsprechender Retentionszeit wurde das Eluat in einem Probengefäß gesammelt. Insgesamt wurde das Eluat aus 10

HPLC-Läufen vereint und zur Trockne eingedampft. Ein Aliquot wurde mit internem Standard für Galactolipide versehen, erneut mittels UPLC-MS/MS vermessen und die Menge an veresterter AZA und PIM bestimmt. Ein weiteres Aliquot wurde mit Sebainsäure als internem Standard versetzt und alkalisch hydrolysiert. Anschließend wurde die Menge an freier AZA und PIM mittels UPLC-MS/MS bestimmt.

## 8 APPLIKATIONSVERSUCHE

Es wurden Applikationsversuche mit freier AZA und deuterierter ONA durchgeführt, die Aufschluss über den Verbleib der Säuren in Pflanzen geben sollten. Hierzu wurden sterile *A. thaliana* Keimlinge (wie unter Methoden 1.2 beschrieben) des Wildtyps Landsberg erecta (Ler) angezogen. 24 Stunden vor Applikation der gewünschten Substanzen wurde das Medium gegen Wasser ausgetauscht. Am folgenden Tag wurde die freie Säure AZA bzw. deuterierte ONA appliziert. Die Endkonzentration der Behandlungssubstanzen betrug 100 µM mit 1 Vol-% Methanol, da die Säuren in Methanol gelöst waren. Die Platten wurden anschließend im Klimaschrank auf dem Schüttler für 1,5 bzw. 24 Stunden inkubiert. Als Kontrolle wurde zu den Zeitpunkten 0, 1,5 und 24 Stunden Keimlinge geerntet, bei denen nur der Austausch des Mediums gegen Wasser stattgefunden hat. Zur Ernte wurden die kompletten Pflanzen mit Hilfe einer Pinzette vorsichtig aus der Flüssigkeit genommen, kurz auf einem Zellstofftuch abgetropft und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Alle Keimlinge aus den 24 Vertiefungen einer Platte wurden gepoolt und stellten eine Probe dar. Es erfolgte die Extraktion und Lipidanalyse gemäß den zuvor beschriebenen Methoden.

### 8.1 HERSTELLUNG DEUTERIERTER ONA

Zur Herstellung deuterierter ONA wurden 5 mg ONA in zwei Ansätzen mit je 2,5 mg umgesetzt. Hierzu wurden 250 µl einer Stocklösung (10 mg/ml ONA in Methanol) in einem 300 µl Schraubglasgefäß mit konischem Einsatz (HPLC-Vial) bei 60 °C im Rotationsvakuumkonzentrator zur Trockne eingengt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 250 µl einer Mischung von deuteriertem Wasser und Methanol (D<sub>2</sub>O/CD<sub>3</sub>OD, 1:1, v/v) mit 1 % Natriummethanolat. Der Ansatz wurde sofort mit Argon begast, das Gefäß verschlossen und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 50 µl Essigsäure (100 %) wurde die Umsetzung abgestoppt. Anschließend wurde dreimal gegen 250 µl Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organischen Überstände wurden in einem HPLC-Vial vereinigt und bei 60 °C im Vakuumkonzentrator eingengt. Der Rückstand wurde in 250 µl Methanol

resuspendiert. Die Ansätze wurden nach dem Vereinigen bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die Markierung des Aldehyds beruht darauf, dass ONA zwei Wasserstoffatome am  $\beta$ -C-Atom besitzt, die bei der Reaktion durch Deuterium ausgetauscht werden können. Folglich können [D1]- und [D2]-ONA entstehen. Das Verhältnis von unmarkierter zu ein- bzw. zweifach markierter ONA wurde per Direktinfusion mit UPLC-MS/MS (Methoden 5.2) bestimmt. Die hergestellte Lösung hatte folgende Zusammensetzung: 15 Mol-% ONA, 21 Mol-% [D1]-ONA und 64 Mol-% [D2]-ONA.

Der Applikationsversuch läuft in einer wässrigen Lösung ab, es könnte daher sein, dass es zu einem Rücktausch der Wasserstoffatome in der deuterierten ONA kommt. Daher wurde die [D]-ONA-Lösung vorab auf Stabilität in der Versuchsdurchführung getestet. Eine 100  $\mu$ M [D]-ONA-Lösung wurde in Wasser mit 1 Vol-% Methanol in einer 24-well-Platte für 0, 1,5 bzw. 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Medium per Direktinfusion überprüft. Die Zusammensetzung der Lösung unterlag keinen deutlichen Änderungen während des Versuchszeitraums. Es kann also davon ausgegangen werden, dass sich der Markierungsgrad der [D]-ONA-Lösung während des Applikationsversuches nicht ändert.

## 9 TRANSMISSIONSELEKTRONENMIKROSKOPIE

### 9.1 FIXIERUNG VON CHLOROPLASTEN IM GEWEBE UND MIKROSKOPIE

Um den Einfluss der Infektion von *A. thaliana* mit *P. syringae* zu untersuchen, wurden Chloroplasten im Gewebe fixiert und anschließend mikroskopiert.

Es wurden Blätter einer Kontrollpflanze und der mit Magnesiumsulfat bzw. *Pseudomonas* infiltrierten Pflanzen auf ein mit Fixierlösung angefeuchtetes Filterpapier gelegt und mittels Rasierklinge in mehrere Blattstückchen (1 mm x 1 mm) zerschnitten. Danach wurden die Blattstückchen in Fixierlösung eingelegt und für 90 min auf Eis inkubiert. Die Fixierlösung enthält unter anderem Glutaraldehyd, welches Proteine quervernetzt und damit eine Verhärtung der Probe herbeiführt. Die Blattstückchen wurden anschließend dreimal je 10 min mit einer Waschlösung und zweimal je 10 min mit 0,1 M Cacodylatpuffer gewaschen. Anschließend erfolgte eine Nachfixierung mit Osmiumtetroxid, welches Lipide fixiert und schwarz färbt für 2 Stunden.

Nach dreimaligem Waschen mit 0,05 M Cacodylatpuffer folgte eine Entwässerung mit Ethanol nach folgendem Schema:

---

30 % Ethanol	15 min
40 % Ethanol	15 min
50 % Ethanol	90 min
60 % Ethanol	30 min
75 % Ethanol	30 min
90 % Ethanol	60 min
100 % Ethanol	über Nacht
100 % Ethanol	60 min
100 % Propylenoxid	60 min
100 % Propylenoxid	60 min

Die anschließende Einbettung in Spurr wurde freundlicherweise von Frau Daniela Bunsen und Frau Claudia Gehrig, technische Assistentinnen von Herrn Prof. Dr. Krohne (Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie, Universität Würzburg), nach folgendem Prinzip übernommen:

25 % Spurr/ 75 % Propylenoxid	6 h
50 % Spurr/ 50 % Propylenoxid	über Nacht
75 % Spurr/ 25 % Propylenoxid	8 h
100 % Spurr	über Nacht
100 % Spurr	4 h

Die Polymerisation erfolgte innerhalb von 48 h bei 60 °C im Wärmeschrank. Mittels Diamantmesser (Ultramikrotom MT-7000, RMC) wurden mehrere Ultradünnschnitte (ca. 60-90 nm) angefertigt, auf Kupfernetze (75 Mash) übertragen, kontrastiert und mikroskopiert. Damit die Schnitte auf den Netzchen haften konnten, musste vor dem Auflegen der Schnitte ein Film einer 0,4 %igen Pioloformlösung in Chloroform aufgebracht werden. Zur Kontrastierung wurden die Kupfernetze für 15-20 min mit einer methanolischen 2 %igen Uranylacetatlösung sowie für 10 min mit Reynolds-Bleicitratlösung (Reynolds 1963) behandelt und abschließend mit destilliertem Wasser gespült. Durch diese Behandlung erfolgt eine Negativkontrastierung, bei der Schwermetallsalze das Objekt umgeben, Elektronen absorbieren und dadurch das Objekt heller erscheinen lassen. Die Präparate wurden dann am Transmissionselektronenmikroskop EM 900 (Zeiss) bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV betrachtet und die belichteten Filme vom institutseigenen Fotolabor entwickelt.

## VI LITERATURVERZEICHNIS

- Andersson M. X., Hamberg M., Kourtchenko O., Brunnstrom A., McPhail K. L., Gerwick W. H., Gobel C., Feussner I. and Ellerstrom M.** (2006). "Oxylipin profiling of the hypersensitive response in *Arabidopsis thaliana*. Formation of a novel oxo-phytyldienoic acid-containing galactolipid, arabidopside E." *J Biol Chem* 281: 31528-31537.
- Austin J. R., 2nd, Frost E., Vidi P. A., Kessler F. and Staehelin L. A.** (2006). "Plastoglobules are lipoprotein subcompartments of the chloroplast that are permanently coupled to thylakoid membranes and contain biosynthetic enzymes." *Plant Cell* 18: 1693-1703.
- Bannenberg G., Martinez M., Hamberg M. and Castresana C.** (2009). "Diversity of the Enzymatic Activity in the Lipoxygenase Gene Family of *Arabidopsis thaliana*." *Lipids* 44: 85-95.
- Bell E., Creelman R. A. and Mullet J. E.** (1995). "A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 8675-8679.
- Berger S., Weichert H., Porzel A., Wasternack C., Kuhn H. and Feussner I.** (2001). "Enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation in leaf development." *Biochim Biophys Acta* 1533: 266-276.
- Berliner J. A., Leitinger N. and Tsimikas S.** (2009). "The role of oxidized phospholipids in atherosclerosis." *J Lipid Res* 50 Suppl: S207-212.
- Besagni C., Piller L. E. and Brehelin C.** (2011). "Preparation of plastoglobules from *Arabidopsis* plastids for proteomic analysis and other studies." *Methods Mol Biol* 775: 223-239.
- Binder C. J., Chang M. K., Shaw P. X., Miller Y. I., Hartvigsen K., Dewan A. and Witztum J. L.** (2002). "Innate and acquired immunity in atherogenesis." *Nat Med* 8: 1218-1226.
- Binder C. J., Horkko S., Dewan A., Chang M. K., Kieu E. P., Goodyear C. S., Shaw P. X., Palinski W., Witztum J. L. and Silverman G. J.** (2003). "Pneumococcal vaccination decreases atherosclerotic lesion formation: molecular mimicry between *Streptococcus pneumoniae* and oxidized LDL." *Nat Med* 9: 736-743.
- Blee E.** (1998). "Phytooxylipins and plant defense reactions." *Prog Lipid Res* 37: 33-72.
- Blee E.** (2002). "Impact of phyto-oxylipins in plant defense." *Trends Plant Sci* 7: 315-322.
- Bligh E. G. and Dyer W. J.** (1959). "A rapid method of total lipid extraction and purification." *Can J Biochem Physiol* 37: 911-917.
- Blomqvist L. A., Ryberg M. and Sundqvist C.** (2008). "Proteomic analysis of highly purified prolamellar bodies reveals their significance in chloroplast development." *Photosynth Res* 96: 37-50.
- Boettcher C. and Weiler E. W.** (2007). "cyclo-Oxylipin-galactolipids in plants: occurrence and dynamics." *Planta* 226: 629-637.
- Bondada B. R. and Syvertsen J. P.** (2003). "Leaf chlorophyll, net gas exchange and chloroplast ultrastructure in citrus leaves of different nitrogen status." *Tree Physiol* 23: 553-559.
- Bower S., Perkins J. B., Yocum R. R., Howitt C. L., Rahaim P. and Pero J.** (1996). "Cloning, sequencing, and characterization of the *Bacillus subtilis* biotin biosynthetic operon." *J Bacteriol* 178: 4122-4130.
- Broberg A., Jacobsson K., Strom K. and Schnurer J.** (2007). "Metabolite profiles of lactic acid bacteria in grass silage." *Appl Environ Microbiol* 73: 5547-5552.
- Browse J. and Somerville C.** (1994). *Arabidopsis*. Meyerowitz, E. M. Cold Spring Harbor Monograph Series, Cold Spring Harbor Press, NY: 881-912.
- Buseman C. M., Tamura P., Sparks A. A., Baughman E. J., Maatta S., Zhao J., Roth M. R., Esch S. W., Shah J., Williams T. D. and Welti R.** (2006). "Wounding stimulates the

- accumulation of glycerolipids containing oxophytodienoic acid and dinor-oxophytodienoic acid in Arabidopsis leaves." *Plant Physiol* 142: 28-39.
- Chaturvedi R., Krothapalli K., Makandar R., Nandi A., Sparks A. A., Roth M. R., Welti R. and Shah J.** (2008). "Plastid omega3-fatty acid desaturase-dependent accumulation of a systemic acquired resistance inducing activity in petiole exudates of Arabidopsis thaliana is independent of jasmonic acid." *Plant J* 54: 106-117.
- Chehab E. W., Kaspi R., Savchenko T., Rowe H., Negre-Zakharov F., Kliebenstein D. and Dehesh K.** (2008). "Distinct roles of jasmonates and aldehydes in plant-defense responses." *PLoS ONE* 3: e1904.
- Chen X., Zhang W., Laird J., Hazen S. L. and Salomon R. G.** (2008). "Polyunsaturated phospholipids promote the oxidation and fragmentation of gamma-hydroxyalkenals: formation and reactions of oxidatively truncated ether phospholipids." *J Lipid Res* 49: 832-846.
- Coulomb C., Polian C., Lizzi Y. and Coulomb P. J.** (1996). "Ultrastructural changes concerning the photosynthetic apparatus during *Phytophthora capsici* infection of susceptible and induced pepper leaves." *Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Iii-Sciences De La Vie-Life Sciences* 319: 893-899.
- Cronan J. E. and Lin S.** (2011). "Synthesis of the alpha,omega-dicarboxylic acid precursor of biotin by the canonical fatty acid biosynthetic pathway." *Curr Opin Chem Biol* 15: 407-413.
- Dat J., Vandenabeele S., Vranova E., Van Montagu M., Inze D. and Van Breusegem F.** (2000). "Dual action of the active oxygen species during plant stress responses." *Cell Mol Life Sci* 57: 779-795.
- Daviet L. and McGregor J. L.** (1997). "Vascular biology of CD36: roles of this new adhesion molecule family in different disease states." *Thromb Haemost* 78: 65-69.
- Douce R. and Joyard J.** (1982). "Plants galactolipids." *The Biochemistry of Plants* 331-332.
- Engdahl S., Aronsson H., Sundqvist C., Timko M. P. and Dahlin C.** (2001). "Association of the NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase (POR) with isolated etioplast inner membranes from wheat." *Plant J* 27: 297-304.
- Falcone D. L., Ogas J. P. and Somerville C. R.** (2004). "Regulation of membrane fatty acid composition by temperature in mutants of Arabidopsis with alterations in membrane lipid composition." *BMC Plant Biol* 4: 17.
- Febbraio M., Abumrad N. A., Hajjar D. P., Sharma K., Cheng W., Pearce S. F. and Silverstein R. L.** (1999). "A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism." *J Biol Chem* 274: 19055-19062.
- Feussner I. and Wasternack C.** (2002). "The lipoxygenase pathway." *Annu Rev Plant Biol* 53: 275-297.
- Fitton A. and Goa K. L.** (1991). "Azelaic acid. A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in acne and hyperpigmentary skin disorders." *Drugs* 41: 780-798.
- Fleischer A. B., Jr.** (2011). "Inflammation in rosacea and acne: Implications for patient care." *J Drugs Dermatol* 10: 614-620.
- Flor H. H.** (1971). "Current status of the gene-for-gene concept." *Ann. Rev. Phytopathol.* 9: 275-296.
- Frankel E. N.** (1998). *Lipid Oxidation*, The Oily Press LTD: 13-77.
- Fruhvirth G. O., Loidl A. and Hermetter A.** (2007). "Oxidized phospholipids: from molecular properties to disease." *Biochim Biophys Acta* 1772: 718-736.
- Fu P. and Birukov K. G.** (2009). "Oxidized phospholipids in control of inflammation and endothelial barrier." *Transl Res* 153: 166-176.

- Gallagher R. S., Ananth R., Granger K., Bradley B., Anderson J. V. and Fuerst E. P.** (2010). "Phenolic and short-chained aliphatic organic acid constituents of wild oat (*Avena fatua* L.) seeds." *J Agric Food Chem* 58: 218-225.
- Glauser G., Dubugnon L., Mousavi S. A., Rudaz S., Wolfender J. L. and Farmer E. E.** (2009). "Velocity estimates for signal propagation leading to systemic jasmonic acid accumulation in wounded *Arabidopsis*." *J Biol Chem*.
- Greenberg M. E., Li X. M., Gugiu B. G., Gu X., Qin J., Salomon R. G. and Hazen S. L.** (2008). "The lipid whisker model of the structure of oxidized cell membranes." *J Biol Chem* 283: 2385-2396.
- Gunning B. E.** (2001). "Membrane geometry of "open" prolamellar bodies." *Protoplasma* 215: 4-15.
- Haertel H., Dormann P. and Benning C.** (2000). "DGD1-independent biosynthesis of extraplastidic galactolipids after phosphate deprivation in *Arabidopsis*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10649-10654.
- Hamberg M.** (1999). "An epoxy alcohol synthase pathway in higher plants: biosynthesis of antifungal trihydroxy oxylipins in leaves of potato." *Lipids* 34: 1131-1142.
- Hamberg M., Ponce de Leon I., Sanz A. and Castresana C.** (2002). "Fatty acid alpha-dioxygenases." *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69: 363-374.
- Hancock J. T., Desikan R. and Neill S. J.** (2001). "Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways." *Biochem Soc Trans* 29: 345-350.
- Harwood J. L.** (1982). *The Biochemistry of Plants: A comprehensive treatise.* Stumpf, E. C., Academic Press. 4: 1-55.
- Hazen S. L.** (2008). "Oxidized phospholipids as endogenous pattern recognition ligands in innate immunity." *J Biol Chem* 283: 15527-15531.
- Hernandez J. A., Rubio M., Olmos E., Ros-Barcelo A. and Martinez-Gomez P.** (2004). "Oxidative stress induced by long-term plum pox virus infection in peach (*Prunus persica*)." *Physiologia Plantarum* 122: 486-495.
- Hisamatsu Y., Goto N., Hasegawa K. and Shigemori H.** (2003). "Arabidopsides A and B, two new oxylipins from *Arabidopsis thaliana*." *Tetrahedron Letters* 44: 5553-5556.
- Hisamatsu Y., Goto N., Sekiguchi M., Hasegawa K. and Shigemori H.** (2005). "Oxylipins arabidopsides C and D from *Arabidopsis thaliana*." *J Nat Prod* 68: 600-603.
- Huh H. Y., Pearce S. F., Yesner L. M., Schindler J. L. and Silverstein R. L.** (1996). "Regulated expression of CD36 during monocyte-to-macrophage differentiation: potential role of CD36 in foam cell formation." *Blood* 87: 2020-2028.
- Imbusch R. and Mueller M. J.** (2000a). "Formation of isoprostane F(2)-like compounds (phytoprostanes F(1)) from alpha-linolenic acid in plants." *Free Radic Biol Med* 28: 720-726.
- Imbusch R. and Mueller M. J.** (2000b). "Analysis of oxidative stress and wound-inducible dinor isoprostanes F(1) (phytoprostanes F(1)) in plants." *Plant Physiol* 124: 1293-1304.
- Itoh A. and Howe G. A.** (2001). "Molecular cloning of a divinyl ether synthase. Identification as a CYP74 cytochrome P-450." *J Biol Chem* 276: 3620-3627.
- Janota-Bassalik L. and Wright L. D.** (1964). "Azelaic Acid Utilization by a *Pseudomonas*." *J Gen Microbiol* 36: 405-414.
- Jardines D., Correa T., Ledea O., Zamora Z., Rosado A. and Molerio J.** (2003). "Gas chromatography-mass spectrometry profile of urinary organic acids of Wistar rats orally treated with ozonized unsaturated triglycerides and ozonized sunflower oil." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 783: 517-525.
- Jimenez B., Volpert O. V., Crawford S. E., Febbraio M., Silverstein R. L. and Bouck N.** (2000). "Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1." *Nat Med* 6: 41-48.



- Jung H. W., Tschaplinski T. J., Wang L., Glazebrook J. and Greenberg J. T.** (2009). "Priming in systemic plant immunity." *Science* 324: 89-91.
- Kaup M. T., Froese C. D. and Thompson J. E.** (2002). "A role for diacylglycerol acyltransferase during leaf senescence." *Plant Physiol* 129: 1616-1626.
- Kessler F. and Vidi P. A.** (2007). "Plastoglobule lipid bodies: their functions in chloroplasts and their potential for applications." *Adv Biochem Eng Biotechnol* 107: 153-172.
- King M. D., Rennie A. R., Thompson K. C., Fisher F. N., Dong C. C., Thomas R. K., Pfrang C. and Hughes A. V.** (2009). "Oxidation of oleic acid at the air-water interface and its potential effects on cloud critical supersaturations." *Phys Chem Chem Phys* 11: 7699-7707.
- Kirch H. H., Schlingensiepen S., Kotchoni S., Sunkar R. and Bartels D.** (2005). "Detailed expression analysis of selected genes of the aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily in *Arabidopsis thaliana*." *Plant Mol Biol* 57: 315-332.
- Klement H., Helfrich M., Oster U., Schoch S. and Rudiger W.** (1999). "Pigment-free NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase from *Avena sativa* L. Purification and substrate specificity." *Eur J Biochem* 265: 862-874.
- Kourtchenko O., Andersson M. X., Hamberg M., Brunnstrom A., Gobel C., McPhail K. L., Gerwick W. H., Feussner I. and Ellerstrom M.** (2007). "Oxo-phytodienoic acid-containing galactolipids in *Arabidopsis*: jasmonate signaling dependence." *Plant Physiol* 145: 1658-1669.
- Laloi C., Apel K. and Danon A.** (2004). "Reactive oxygen signalling: the latest news." *Curr Opin Plant Biol* 7: 323-328.
- Li X. M., Salomon R. G., Qin J. and Hazen S. L.** (2007). "Conformation of an endogenous ligand in a membrane bilayer for the macrophage scavenger receptor CD36." *Biochemistry* 46: 5009-5017.
- Lin S. and Cronan J. E.** (2011). "Closing in on complete pathways of biotin biosynthesis." *Mol Biosyst* 7: 1811-1821.
- Lin S., Hanson R. E. and Cronan J. E.** (2010). "Biotin synthesis begins by hijacking the fatty acid synthetic pathway." *Nat Chem Biol* 6: 682-688.
- Lindsten A., Wiktorsson B., Ryberg M. and Sundqvist C.** (1993). "Chlorophyll Synthetase-Activity Is Relocated from Transforming Prolamellar Bodies to Developing Thylakoids during Irradiation of Dark-Grown Wheat." *Physiologia Plantarum* 88: 29-36.
- Liu W., Porter N. A., Schneider C., Brash A. R. and Yin H.** (2011). "Formation of 4-hydroxynonenal from cardiolipin oxidation: Intramolecular peroxy radical addition and decomposition." *Free Radic Biol Med* 50: 166-178.
- Locy R. D., Chang C. C., Nielsen B. L. and Singh N. K.** (1996). "Photosynthesis in Salt-Adapted Heterotrophic Tobacco Cells and Regenerated Plants." *Plant Physiol* 110: 321-328.
- Low P. S. and Merida J. R.** (1996). "The oxidative burst in plant defense: Function and signal transduction." *Physiol Plant* 96: 533-542.
- Maldonado A. M., Doerner P., Dixon R. A., Lamb C. J. and Cameron R. K.** (2002). "A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in *Arabidopsis*." *Nature* 419: 399-403.
- Matsui K.** (2006). "Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism." *Curr Opin Plant Biol* 9: 274-280.
- McConn M. and Browse J.** (1996). "The Critical Requirement for Linolenic Acid Is Pollen Development, Not Photosynthesis, in an *Arabidopsis* Mutant." *Plant Cell* 8: 403-416.
- McConn M., Creelman R. A., Bell E., Mullet J. E. and Browse J.** (1997). "Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 5473-5477.
- Mehler A. H.** (1951). "Studies on reactions of illuminated chloroplasts. II. Stimulation and inhibition of the reaction with molecular oxygen." *Arch Biochem* 34: 339-351.

- Memelink J.** (2009). "Regulation of gene expression by jasmonate hormones." *Phytochemistry* 70: 1560-1570.
- Mene-Saffrane L., Dubugnon L., Chetelat A., Stolz S., Gouhier-Darimont C. and Farmer E. E.** (2008). "Non-enzymatic oxidation of trienoic fatty acids contributes to reactive oxygen species management in Arabidopsis." *J Biol Chem.*
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M. and Van Breusegem F.** (2004). "Reactive oxygen gene network of plants." *Trends Plant Sci* 9: 490-498.
- Miyashita K., Fujimoto K. and Kaneda T.** (1982a). "Formation of Dimers during the Initial-Stage of Autoxidation in Methyl Linoleate." *Agricultural and Biological Chemistry* 46: 751-755.
- Miyashita K., Fujimoto K. and Kaneda T.** (1982b). "Structures of Dimers Produced from Methyl Linoleate during Initial-Stage of Autoxidation." *Agricultural and Biological Chemistry* 46: 2293-2297.
- Miyashita K., Fujimoto K. and Kaneda T.** (1984). "Structural Studies of Polar Dimers in Autoxidized Methyl Linoleate during the Initial-Stages of Autoxidation." *Agricultural and Biological Chemistry* 48: 2511-2515.
- Miyashita K., Hara N., Fujimoto K. and Kaneda T.** (1985a). "Decomposition Products of Dimers Arising from Secondary Oxidation of Methyl Linoleate Hydroperoxides." *Agricultural and Biological Chemistry* 49: 2633-2640.
- Miyashita K., Hara N., Fujimoto K. and Kaneda T.** (1985b). "Dimers Formed in Oxygenated Methyl Linoleate Hydroperoxides." *Lipids* 20: 578-587.
- Montillet J. L., Cacas J. L., Garnier L., Montane M. H., Douki T., Bessoule J. J., Polkowska-Kowalczyk L., Maciejewska U., Agnel J. P., Vial A. and Triantaphylides C.** (2004). "The upstream oxylipin profile of Arabidopsis thaliana: a tool to scan for oxidative stresses." *Plant J* 40: 439-451.
- Morita M. and Fujimaki M.** (1973a). "Non-hydroperoxy-type Peroxides as Autocatalysts of Lipid Autoxidation." *Agr Biol Chem* 37: 1213-1214.
- Morita M. and Fujimaki M.** (1973b). "Minor peroxide components as catalysts and precursors to monocarbonyls in the autoxidation of methyl linoleate." *J Agric Food Chem* 21: 860-863.
- Morita M. and Tokita M.** (1990). "Evaluation of the Role of Hydroperoxides in the Formation of Aldehydes during Linoleate Autoxidation." *Chemistry and Physics of Lipids* 56: 209-215.
- Morita M. and Tokita M.** (1993). "Courses of Aldehyde Formation during Linoleate Autoxidation and Some Information About Precursors and Mechanism." *Chemistry and Physics of Lipids* 66: 13-22.
- Morita M. and Tokita M.** (2006). "The real radical generator other than main-product hydroperoxide in lipid autoxidation." *Lipids* 41: 91-95.
- Mosblech A., Feussner I. and Heilmann I.** (2008). "Oxylipins: Structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation." *Plant Physiol Biochem.*
- Mueller M. J.** (2004). "Archetype signals in plants: the phytoprostanes." *Curr Opin Plant Biol* 7: 441-448.
- Mueller M. J., Mene-Saffrane L., Grun C., Karg K. and Farmer E. E.** (2006). "Oxylipin analysis methods." *Plant J* 45: 472-489.
- Mueller S., Hilbert B., Dueckershoff K., Roitsch T., Krischke M., Mueller M. J. and Berger S.** (2008). "General detoxification and stress responses are mediated by oxidized lipids through TGA transcription factors in Arabidopsis." *Plant Cell* 20: 768-785.
- Mukhtarova L. S., Mukhitova F. K., Gogolev Y. V. and Grechkin A. N.** (2011). "Hydroperoxide lyase cascade in pea seedlings: Non-volatile oxylipins and their age and stress dependent alterations." *Phytochemistry* 72: 356-364.

- Murakami S. and Ikeuchi M.** (1982). "Biochemical characterization and localization of the 36,000-dalton NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase in squash etioplasts." *Prog Clin Biol Res* 102 Pt B: 13-23.
- Nakajyo H., Hisamatsu Y., Sekiguchi M., Goto N., Hasegawa K. and Shigemori H.** (2006). "Arabidopside F, a new oxylipin from *Arabidopsis thaliana*." *Heterocycles* 69: 295-+.
- Nakata A., Nakagawa Y., Nishida M., Nozaki S., Miyagawa J., Nakagawa T., Tamura R., Matsumoto K., Kameda-Takemura K., Yamashita S. and Matsuzawa Y.** (1999). "CD36, a novel receptor for oxidized low-density lipoproteins, is highly expressed on lipid-laden macrophages in human atherosclerotic aorta." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 1333-1339.
- Neill S., Desikan R. and Hancock J.** (2002). "Hydrogen peroxide signalling." *Curr Opin Plant Biol* 5: 388-395.
- Nichols D. S. and McMeekin T. A.** (2002). "Biomarker techniques to screen for bacteria that produce polyunsaturated fatty acids." *J Microbiol Methods* 48: 161-170.
- Nozaki S., Kashiwagi H., Yamashita S., Nakagawa T., Kostner B., Tomiyama Y., Nakata A., Ishigami M., Miyagawa J., Kameda-Takemura K. and et al.** (1995). "Reduced uptake of oxidized low density lipoproteins in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient subjects." *J Clin Invest* 96: 1859-1865.
- Podrez E. A., Poliakov E., Shen Z., Zhang R., Deng Y., Sun M., Finton P. J., Shan L., Febbraio M., Hajjar D. P., Silverstein R. L., Hoff H. F., Salomon R. G. and Hazen S. L.** (2002b). "A novel family of atherogenic oxidized phospholipids promotes macrophage foam cell formation via the scavenger receptor CD36 and is enriched in atherosclerotic lesions." *J Biol Chem* 277: 38517-38523.
- Podrez E. A., Poliakov E., Shen Z., Zhang R., Deng Y., Sun M., Finton P. J., Shan L., Gugiu B., Fox P. L., Hoff H. F., Salomon R. G. and Hazen S. L.** (2002a). "Identification of a novel family of oxidized phospholipids that serve as ligands for the macrophage scavenger receptor CD36." *J Biol Chem* 277: 38503-38516.
- Porter N. A.** (1984). "Chemistry of lipid peroxidation." *Methods Enzymol* 105: 273-282.
- Ravichandran K. S. and Lorenz U.** (2007). "Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal." *Nat Rev Immunol* 7: 964-974.
- Reinbothe S., Reinbothe C., Apel K. and Lebedev N.** (1996). "Evolution of chlorophyll biosynthesis--the challenge to survive photooxidation." *Cell* 86: 703-705.
- Rey P., Gillet B., Romer S., Eymery F., Massimino J., Peltier G. and Kuntz M.** (2000). "Over-expression of a pepper plastid lipid-associated protein in tobacco leads to changes in plastid ultrastructure and plant development upon stress." *Plant J* 21: 483-494.
- Reynolds E. S.** (1963). "The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy." *J Cell Biol* 17: 208-212.
- Routaboul J. M., Fischer S. F. and Browse J.** (2000). "Trienoic fatty acids are required to maintain chloroplast function at low temperatures." *Plant Physiol* 124: 1697-1705.
- Routaboul J. M., Skidmore C., Wallis J. G. and Browse J.** (2011). "Arabidopsis mutants reveal that short- and long-term thermotolerance have different requirements for trienoic fatty acids." *J Exp Bot*.
- Ruediger W., Benz J. and Guthoff C.** (1980). "Detection and Partial Characterization of Activity of Chlorophyll Synthetase in Etioplast Membranes." *European Journal of Biochemistry* 109: 193-200.
- Ryberg M. and Sundqvist C.** (1982). "Characterization of Prolamellar Bodies and Prothylakoids Fractionated from Wheat Etioplasts." *Physiologia Plantarum* 56: 125-132.
- Ryberg M. and Sundqvist C.** (1988). "The Regular Ultrastructure of Isolated Prolamellar Bodies Depends on the Presence of Membrane-Bound Nadph-Protochlorophyllide Oxidoreductase." *Physiologia Plantarum* 73: 218-226.

- Sato C., Oka N., Nabeta K. and Matsuura H.** (2011). "Cellulase applied to the leaves of sweet pepper (*Capsicum annuum* L. var. *grossum*) upregulates the production of salicylic and azelaic acids." *Biosci Biotechnol Biochem* 75: 761-763.
- Schneider C., Boeglin W. E., Yin H., Porter N. A. and Brash A. R.** (2008a). "Intermolecular peroxy radical reactions during autoxidation of hydroxy and hydroperoxy arachidonic acids generate a novel series of epoxidized products." *Chem Res Toxicol* 21: 895-903.
- Schneider C., Porter N. A. and Brash A. R.** (2008b). "Routes to 4-hydroxynonenal: fundamental issues in the mechanisms of lipid peroxidation." *J Biol Chem* 283: 15539-15543.
- Selstam E. and Sandelius A. S.** (1984). "A Comparison between Prolamellar Bodies and Prothylakoid Membranes of Etioplasts of Dark-Grown Wheat Concerning Lipid and Polypeptide Composition." *Plant Physiol* 76: 1036-1040.
- Selstam E., Schelin J., Brain T. and Williams W. P.** (2002). "The effects of low pH on the properties of protochlorophyllide oxidoreductase and the organization of prolamellar bodies of maize (*Zea mays*)." *Eur J Biochem* 269: 2336-2346.
- Seltmann M. A., Stingl N. E., Lautenschlaeger J. K., Krischke M., Mueller M. J. and Berger S.** (2010). "Differential impact of lipoxygenase 2 and jasmonates on natural and stress-induced senescence in *Arabidopsis*." *Plant Physiol* 152: 1940-1950.
- Shah J.** (2005). "Lipids, lipases, and lipid-modifying enzymes in plant disease resistance." *Annu Rev Phytopathol* 43: 229-260.
- Shah J.** (2009). "Plants under attack: systemic signals in defence." *Curr Opin Plant Biol* 12: 459-464.
- Shellhammer J. and Meinke D.** (1990). "Arrested Embryos from the *bio1* Auxotroph of *Arabidopsis thaliana* Contain Reduced Levels of Biotin." *Plant Physiol* 93: 1162-1167.
- Silverstein R. L. and Febbraio M.** (2000). "CD36 and atherosclerosis." *Curr Opin Lipidol* 11: 483-491.
- Singleton P. A., Chatchavalvanich S., Fu P., Xing J., Birukova A. A., Fortune J. A., Klibanov A. M., Garcia J. G. and Birukov K. G.** (2009). "Akt-mediated transactivation of the S1P1 receptor in caveolin-enriched microdomains regulates endothelial barrier enhancement by oxidized phospholipids." *Circ Res* 104: 978-986.
- Solymosi K., Smeller L., Ryberg M., Sundqvist C., Fidy J. and Boddi B.** (2007). "Molecular rearrangement in POR macrodomains as a reason for the blue shift of chlorophyllide fluorescence observed after phototransformation." *Biochim Biophys Acta* 1768: 1650-1658.
- Somerville C. and Browse J.** (1991). "Plant lipids: metabolism, mutants, and membranes." *Science* 252: 80-87.
- Sperling U., Franck F., van Cleve B., Frick G., Apel K. and Armstrong G. A.** (1998). "Etioplast differentiation in *Arabidopsis*: both PORA and PORB restore the prolamellar body and photoactive protochlorophyllide-F655 to the *cop1* photomorphogenic mutant." *Plant Cell* 10: 283-296.
- Sperling U., van Cleve B., Frick G., Apel K. and Armstrong G. A.** (1997). "Overexpression of light-dependent PORA or PORB in plants depleted of endogenous POR by far-red light enhances seedling survival in white light and protects against photooxidative damage." *Plant J* 12: 649-658.
- Stelmach B. A., Muller A., Hennig P., Gebhardt S., Schubert-Zsilavecz M. and Weiler E. W.** (2001). "A novel class of oxylipins, sn1-O-(12-oxophytodienoyl)-sn2-O-(hexadecatrienoyl)-monogalactosyl Diglyceride, from *Arabidopsis thaliana*." *J Biol Chem* 276: 12832-12838.
- Stok J. E. and De Voss J.** (2000). "Expression, purification, and characterization of Biol: a carbon-carbon bond cleaving cytochrome P450 involved in biotin biosynthesis in *Bacillus subtilis*." *Arch Biochem Biophys* 384: 351-360.

- Stuart L. M. and Ezekowitz R. A.** (2005). "Phagocytosis: elegant complexity." *Immunity* 22: 539-550.
- Triantaphylides C., Krischke M., Hoerberichts F. A., Ksas B., Gresser G., Havaux M., Van Breusegem F. and Mueller M. J.** (2008). "Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants." *Plant Physiol* 148: 960-968.
- Van Breusegem F. and Dat J. F.** (2006). "Reactive oxygen species in plant cell death." *Plant Physiol* 141: 384-390.
- Velasco J., Berdeaux O., Marquez-Ruiz G. and Dobarganes M. C.** (2002). "Sensitive and accurate quantitation of monoepoxy fatty acids in thermoxidized oils by gas-liquid chromatography." *J Chromatogr A* 982: 145-152.
- Vellosillo T., Martinez M., Lopez M. A., Vicente J., Cascon T., Dolan L., Hamberg M. and Castresana C.** (2007). "Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in Arabidopsis regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade." *Plant Cell* 19: 831-846.
- Vranova E., Inze D. and Van Breusegem F.** (2002). "Signal transduction during oxidative stress." *J Exp Bot* 53: 1227-1236.
- Weber H., Chetelat A., Reymond P. and Farmer E. E.** (2004). "Selective and powerful stress gene expression in Arabidopsis in response to malondialdehyde." *Plant J* 37: 877-888.
- 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." *Plant Cell* 3: 49-59.
- Xu Z. Y., Zhang X., Schlappi M. and Xu Z. Q.** (2011). "Cold-inducible expression of AZI1 and its function in improvement of freezing tolerance of Arabidopsis thaliana and Saccharomyces cerevisiae." *J Plant Physiol* 168: 1576-1587.
- Zhang E. J., Kang Q. S. and Zhang Z.** (1993). "[Chemical constituents from the bark of Hibiscus syriacus L.]" *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 18: 37-38, 63.
- Zhang J. F., Li Y. B., Li C. L. and Jiang J. Q.** (2006). "[Studies on chemical constituents in root tuber of Cynanchum auriculatum]." *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 31: 814-816.

## VII ANHANG

Tabelle VII-1: Übersicht der Galactolipidspiegel im Wildtyp Col0. In der Tabelle sind die Mittelwerte der einzelnen Spezies mit Standardabweichung (n=3) unter basalen Bedingungen und 24 Stunden nach Pathogenbehandlung angegeben. Weiterhin wurde der Anstieg und Oxidationsgrad berechnet.

Col0	Lipid/TG (nmol/g)		Lipid/TG (nmol/g)		Anstieg (x-fach)	Oxidationsgrad	
	basal		24h Pst			basal (%)	Pst (%)
	MW	STABW	MW	STABW			
MGDG-18:3-18:3	3543,9	131,1	6169,9	506,6	1,7		
MGDG-18:3-16:3	4673,1	462,2	9080,5	868,2	1,9		
DGDG-18:3-18:3	4636,4	369,1	5303,9	174,1	1,1		
DGDG-18:3-16:3	620,7	18,2	952,8	126,4	1,5		
MGDG-18:3-265	221,6	35,2	274,1	44,3	1,2	4,5	2,9
MGDG-16:3-293	206,9	26,3	312,3	54,1	1,5	4,2	3,3
MGDG-18:3-293	39,8	2,7	71,0	7,7	1,8	1,1	1,1
DGDG-18:3-293	294,6	32,1	243,0	50,9	0,8	6,0	4,4
DGDG-18:3-265	15,5	0,5	20,1	8,2	1,3	2,4	2,1
DGDG-16:3-293	14,7	0,5	18,5	7,6	1,3	2,3	1,9
MGDG-293-265	8,3	2,0	72,0	16,6	8,6	0,2	0,8
MGDG-293-293	3,5	1,0	27,8	9,4	8,0	0,1	0,4
DGDG-293-265	n.d.	n.d.	8,4	4,3			0,9
DGDG-293-293	8,9	1,2	60,2	18,8	6,8	0,2	1,1
MGDG-18:3-143	2,9	0,8	5,5	1,2	1,9	0,1	0,1
MGDG-16:3-171	22,9	3,3	28,6	4,8	1,2	0,5	0,3
MGDG-16:3-143	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
MGDG-18:3-171	12,6	3,1	26,6	5,2	2,1	0,4	0,4
MGDG-18:3-159	5,3	1,6	10,2	1,4	1,9	0,1	0,1
MGDG-16:3-187	1,2	0,3	2,2	0,2	1,8	0,03	0,02
MGDG-18:3-187	1,9	0,3	4,7	0,7	2,4	0,04	0,1
MGDG-16:3-159	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
DGDG-18:3-171	26,3	9,1	26,9	2,4	1,0	0,6	0,5
DGDG-18:3-143	2,7	0,6	3,1	0,3	1,1	0,4	0,3
DGDG-16:3-171	9,3	2,0	6,9	1,3	0,7	1,5	0,7
DGDG-16:3-143	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
DGDG-18:3-187	1,2	0,5	1,5	0,7	1,3	0,03	0,03
DGDG-18:3-159	12,6	2,1	15,3	1,2	1,2	2,0	1,6
DGDG-16:3-187	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
DGDG-16:3-159	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
MGDG-171-171	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
MGDG-171-143	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
MGDG-171-143	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
MGDG-187-187	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			

<b>MGDG-187-159</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
<b>MGDG-187-159</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
<b>DGDG-171-171</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
<b>DGDG-171-143</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
<b>DGDG-171-143</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
<b>DGDG-187-187</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
<b>DGDG-187-159</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
<b>DGDG-187-159</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
<b>Arabidopsid A</b>	44,2	8,1	1876,4	510,8	42,5	0,9	17,1
<b>Arabidopsid B</b>	8,3	1,0	945,8	339,4	114,4	0,2	13,3
<b>Arabidopsid C</b>	n.d.	n.d.	143,3	45,5			13,1
<b>Arabidopsid D</b>	3,8	1,0	145,7	53,4	38,3	0,1	2,7
<b>Arabidopsid E</b>	21,1	4,1	1466,3	309,5	69,4	0,5	13,9
<b>Arabidopsid G</b>	12,8	5,8	1048,5	267,7	82,0	0,4	14,5
<b>MGDG-18:3-263</b>	2,2	0,2	56,2	29,0	25,7	0,05	0,6
<b>MGDG-16:3-291</b>	4,8	0,4	168,2	84,2	35,3	0,1	1,8
<b>MGDG-18:3-291</b>	5,1	0,9	108,6	58,6	21,3	0,1	1,7
<b>DGDG-18:3-291</b>	2,5	1,3	70,9	55,4	28,8	0,1	1,3
<b>DGDG-18:3-263</b>	n.d.	n.d.	11,7	5,7			1,2
<b>DGDG-16:3-291</b>	n.d.	n.d.	18,0	15,7			1,9
<b>MGDG-18:3-281</b>	2,2	0,7	26,2	17,5	11,7	0,05	0,3
<b>MGDG-16:3-309</b>	3,6	1,0	74,0	41,3	20,4	0,1	0,8
<b>MGDG-18:3-309</b>	2,6	0,2	23,7	13,4	9,0	0,1	0,4
<b>DGDG-18:3-309</b>	n.d.	n.d.	8,7	1,4			0,2
<b>DGDG-18:3-281</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
<b>DGDG-16:3-309</b>	n.d.	n.d.	2,5	1,5			0,3

Tabelle VII-2: Übersicht der Galactolipidspiegel in der Mutante *lox2-1*. In der Tabelle sind die Mittelwerte der einzelnen Spezies mit Standardabweichung (n=3) unter basalen Bedingungen und 24 Stunden nach Pathogenbehandlung angegeben. Weiterhin wurde der Anstieg und Oxidationsgrad berechnet.

<i>lox2-1</i>	Lipid/TG (nmol/g)		Lipid/TG (nmol/g)		Anstieg (x-fach)	Oxidationsgrad	
	basal		24h Pst			basal (%)	Pst (%)
	MW	STABW	MW	STABW			
<b>MGDG-18:3-18:3</b>	4143,9	175,2	8160,5	928,2	2,0		
<b>MGDG-18:3-16:3</b>	5612,4	313,8	11271,2	728,3	2,0		
<b>DGDG-18:3-18:3</b>	4068,1	222,9	6045,9	411,1	1,5		
<b>DGDG-18:3-16:3</b>	557,5	33,6	1126,7	171,4	2,0		
<b>MGDG-18:3-265</b>	264,5	12,6	293,2	10,0	1,1	4,5	2,5
<b>MGDG-16:3-293</b>	266,4	22,7	286,0	29,2	1,1	4,5	2,5
<b>MGDG-18:3-293</b>	50,8	2,9	81,1	11,0	1,6	1,2	1,0
<b>DGDG-18:3-293</b>	297,2	34,7	273,1	71,6	0,9	6,8	4,3
<b>DGDG-18:3-265</b>	20,9	2,3	35,0	10,7	1,7	3,6	3,0
<b>DGDG-16:3-293</b>	16,1	0,7	34,3	6,1	2,1	2,8	3,0
<b>MGDG-293-265</b>	8,0	1,6	21,8	2,0	2,7	0,1	0,2
<b>MGDG-293-293</b>	3,7	0,7	13,9	0,5	3,8	0,1	0,2
<b>DGDG-293-265</b>	n.d.	n.d.	3,5	1,3			0,3
<b>DGDG-293-293</b>	9,3	1,6	27,9	7,1	3,0	0,2	0,5
<b>MGDG-18:3-143</b>	2,5	0,5	5,8	1,2	2,3	0,0	0,1
<b>MGDG-16:3-171</b>	19,6	1,9	27,1	3,9	1,4	0,3	0,2
<b>MGDG-16:3-143</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
<b>MGDG-18:3-171</b>	11,2	1,7	31,4	3,6	2,8	0,3	0,4
<b>MGDG-18:3-159</b>	4,3	0,5	11,1	0,3	2,6	0,1	0,1
<b>MGDG-16:3-187</b>	1,3	0,3	2,1	1,2	1,5	0,02	0,02
<b>MGDG-18:3-187</b>	1,7	0,0	3,3	0,6	1,9	0,04	0,0
<b>MGDG-16:3-159</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
<b>DGDG-18:3-171</b>	22,1	2,5	32,2	5,6	1,5	0,5	0,5
<b>DGDG-18:3-143</b>	3,1	0,4	3,6	0,9	1,2	0,5	0,3
<b>DGDG-16:3-171</b>	10,3	0,5	9,3	0,6	0,9	1,8	0,8
<b>DGDG-16:3-143</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
<b>DGDG-18:3-187</b>	0,7	0,1	1,5	0,5	2,2	0,02	0,02
<b>DGDG-18:3-159</b>	11,6	1,9	16,8	3,8	1,4	2,0	1,5
<b>DGDG-16:3-187</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
<b>DGDG-16:3-159</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
<b>MGDG-171-171</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
<b>MGDG-171-143</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
<b>MGDG-171-143</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
<b>MGDG-187-187</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
<b>MGDG-187-159</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
<b>MGDG-187-159</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
<b>DGDG-171-171</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			



<b>DGDG-171-143</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
<b>DGDG-171-143</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
<b>DGDG-187-187</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
<b>DGDG-187-159</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
<b>DGDG-187-159</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
<b>Arabidopsid A</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
<b>Arabidopsid B</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
<b>Arabidopsid C</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
<b>Arabidopsid D</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
<b>Arabidopsid E</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
<b>Arabidopsid G</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
<b>MGDG-18:3-263</b>	1,7	0,1	15,0	2,1	8,6	0,03	0,1
<b>MGDG-16:3-291</b>	2,0	0,2	18,1	4,2	8,9	0,04	0,2
<b>MGDG-18:3-291</b>	0,8	0,7	10,1	2,7	12,7	0,02	0,1
<b>DGDG-18:3-291</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
<b>DGDG-18:3-263</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
<b>DGDG-16:3-291</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
<b>MGDG-18:3-281</b>	1,0	0,9	14,6	4,1	14,9	0,02	0,1
<b>MGDG-16:3-309</b>	n.d.	n.d.	20,9	2,5			0,2
<b>MGDG-18:3-309</b>	1,8	0,2	17,6	5,5	9,6	0,04	0,2
<b>DGDG-18:3-309</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
<b>DGDG-18:3-281</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			
<b>DGDG-16:3-309</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			

Tabelle VII-3: Übersicht der Spiegel der analysierten Phospholipide bzw. Triglyceride im Wildtyp Col0. In der Tabelle sind die Mittelwerte der einzelnen Spezies mit Standardabweichung (n=3) unter basalen Bedingungen und 24 Stunden nach Pathogenbehandlung angegeben. Weiterhin wurde der Anstieg und Oxidationsgrad berechnet.

Col0	Lipid/TG (nmol/g)		Lipid/TG (nmol/g)		Anstieg (x-fach)	Oxidationsgrad	
	basal		24h Pst			basal	Pst
	MW	STABW	MW	STABW		(%)	(%)
<b>18:3-18:3-PC</b>	2144,8	188,6	1524,5	251,6	0,7		
<b>18:3-18:2-PC</b>	697,3	117,2	455,4	64,6	0,7		
<b>18:3-16:0-PC</b>	469,7	53,9	220,9	24,1	0,5		
<b>18:3-16:0-PE</b>	600,9	65,6	1223,4	108,8	2,0		
<b>18:3-16:0-PS</b>	461,4	109,6	670,6	146,9	1,5		
<b>18:3-16:1-PG</b>	5760,6	1036,3	6583,5	794,2	1,1		
<b>18:3-16:0-PG</b>	5405,1	817,3	8045,9	1472,7	1,5		
<b>293-16:1-PG</b>	33,3	7,4	136,9	18,8	4,1	0,6	2,1
<b>293-16:0-PG</b>	42,4	9,4	220,9	30,3	5,2	0,8	2,7
<b>18:3-16:0-PI</b>	1193,0	190,9	2475,0	484,1	2,1		
<b>293-16:0-PI</b>	15,3	3,2	121,5	18,5	7,9	1,3	4,7
<b>TG-18:3-18:3-18:3</b>	177,8	19,1	1714,9	424,3	9,6		
<b>TG-18:3-18:3-18:2</b>	289,5	37,2	1976,8	416,9	6,8		
<b>TG-16:0-18:3-18:3</b>	32,6	4,4	366,9	105,1	11,3		
<b>TG-16:0-18:3-18:2</b>	113,5	15,7	1152,8	379,5	10,2		
<b>TG-18:3-18:3-293</b>	0,5	0,1	222,6	97,9	454,2	0,3	11,5
<b>TG-18:3-18:2-293</b>	1,4	0,3	226,9	90,8	160,1	0,5	10,3
<b>TG-16:0-18:3-293</b>	0,7	0,2	135,7	55,2	201,9	2,0	27,0
<b>TG-16:0-18:2-293</b>	0,9	0,1	140,9	46,2	161,1	0,8	10,9
<b>TG-18:3-293-293</b>	n.d.	n.d.	6,3	2,1			0,4
<b>TG-18:2-293-293</b>	n.d.	n.d.	5,0	1,9			0,3
<b>TG-16:0-293-293</b>	n.d.	n.d.	3,9	1,0			1,1
<b>TG-293-293-293</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			

Tabelle VII-4: Übersicht der Spiegel der analysierten Phospholipide bzw. Triglyceride in der Mutante *lox2-1*. In der Tabelle sind die Mittelwerte der einzelnen Spezies mit Standardabweichung (n=3) unter basalen Bedingungen und 24 Stunden nach Pathogenbehandlung angegeben. Weiterhin wurde der Anstieg und Oxidationsgrad berechnet.

<i>lox2-1</i>	Lipid/TG (nmol/g)		Lipid/TG (nmol/g)		Anstieg (x-fach)	Oxidationsgrad	
	basal		24h Pst			basal	Pst
	MW	STABW	MW	STABW		(%)	(%)
<b>18:3-18:3-PC</b>	1625,1	131,2	1573,0	56,2	1,0		
<b>18:3-18:2-PC</b>	637,6	28,3	570,1	4,6	0,9		
<b>18:3-16:0-PC</b>	340,6	34,5	230,6	21,0	0,7		
<b>18:3-16:0-PE</b>	620,2	44,6	2428,6	450,4	3,9		
<b>18:3-16:0-PS</b>	290,9	46,1	420,7	40,1	1,4		
<b>18:3-16:1-PG</b>	5055,1	860,3	7084,7	1961,5	1,4		
<b>18:3-16:0-PG</b>	5457,8	702,7	9176,0	2552,1	1,7		
<b>293-16:1-PG</b>	21,8	2,8	85,7	27,1	3,9	0,4	1,2
<b>293-16:0-PG</b>	34,9	4,5	183,1	54,6	5,3	0,6	2,0
<b>18:3-16:0-PI</b>	1778,1	293,7	3513,0	1136,2	2,0		
<b>293-16:0-PI</b>	15,2	1,7	140,5	56,9	9,2	0,8	3,8
<b>TG-18:3-18:3-18:3</b>	311,1	46,6	2748,8	81,3	8,8		
<b>TG-18:3-18:3-18:2</b>	401,2	38,7	3304,2	110,1	8,2		
<b>TG-16:0-18:3-18:3</b>	61,3	7,5	715,4	18,9	11,7		
<b>TG-16:0-18:3-18:2</b>	241,2	32,8	2498,8	174,5	10,4		
<b>TG-18:3-18:3-293</b>	0,6	0,1	337,8	44,7	530,4	0,2	10,9
<b>TG-18:3-18:2-293</b>	1,9	0,5	334,9	19,5	173,5	0,5	9,2
<b>TG-16:0-18:3-293</b>	1,2	0,4	166,7	4,0	135,7	2,0	18,9
<b>TG-16:0-18:2-293</b>	1,5	0,5	127,3	3,9	84,1	0,6	4,8
<b>TG-18:3-293-293</b>	n.d.	n.d.	9,6	0,5			0,3
<b>TG-18:2-293-293</b>	n.d.	n.d.	7,9	0,4			0,2
<b>TG-16:0-293-293</b>	n.d.	n.d.	3,1	0,4			0,4
<b>TG-293-293-293</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			

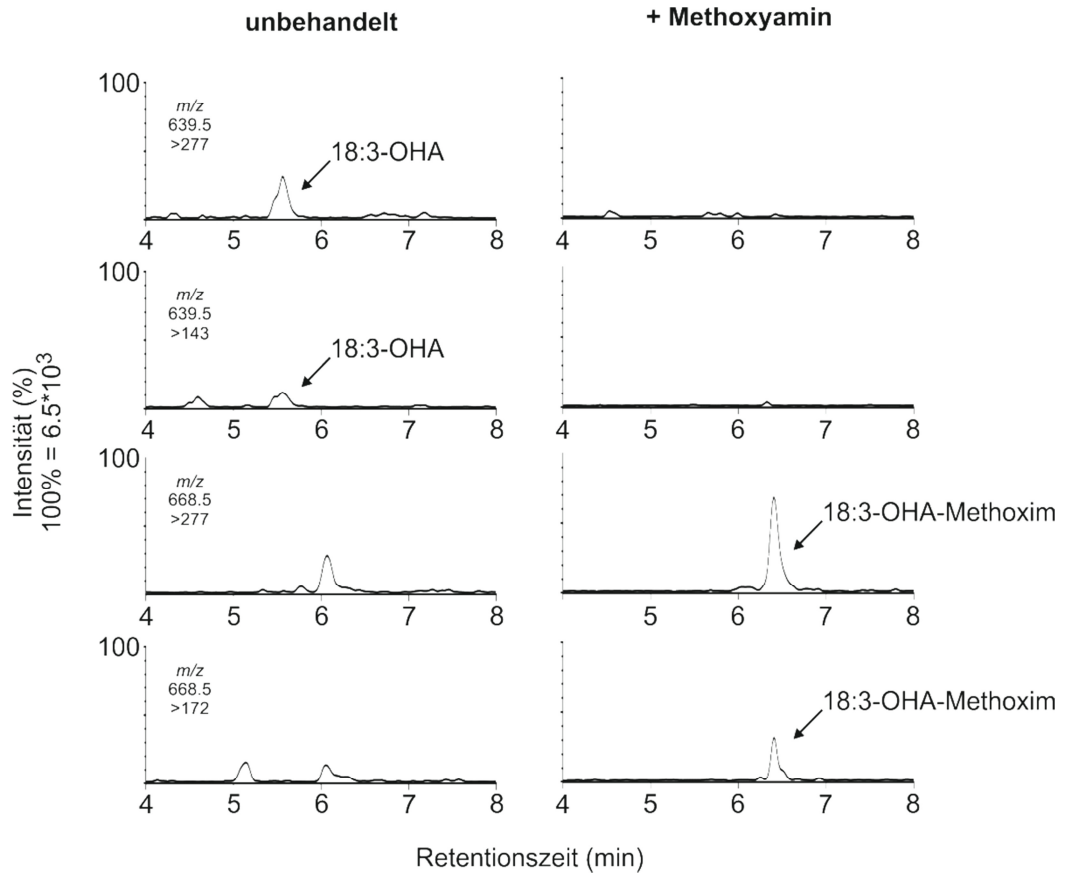


Abbildung VII-1: Chromatogramm vor und nach Derivatisierung der Aldehydgruppe in MGDG-18:3-OHA. Nach der chromatographischen Auftrennung des Pflanzenextrakts ist bei einer Retentionszeit von 5,6 Minuten in den beiden charakteristischen Massenspuren für MGDG-18:3-OHA je ein deutlicher Peak erkennbar. Im Chromatogramm des mit Methoxyamin behandelten Extrakts ist in diesen beiden Spuren kein Peak mehr detektierbar. In den Massenspuren, die charakteristisch sind für das Derivatisierungsprodukt tauchen dagegen bei einer Retentionszeit von 6,4 Minuten neue Peaks auf.

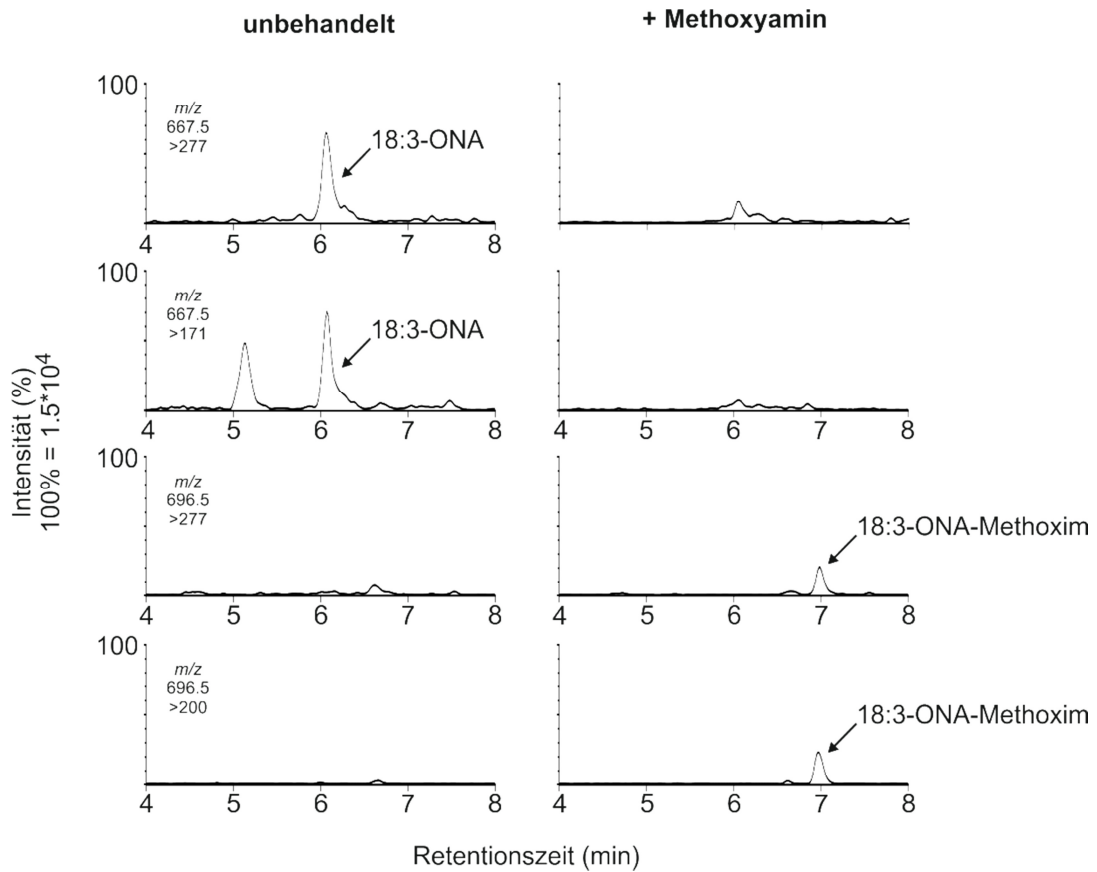


Abbildung VII-2: Chromatogramm vor und nach Derivatisierung der Aldehydgruppe in MGDG-18:3-ONA. Nach der chromatographischen Auftrennung des Pflanzenextrakts ist bei einer Retentionszeit von 6,1 Minuten in den beiden charakteristischen Massenspuren für MGDG-18:3-ONA je ein deutlicher Peak erkennbar. Im Chromatogramm des mit Methoxyamin behandelten Extrakts ist in diesen beiden Spuren kein Peak mehr detektierbar. In den Massenspuren, die charakteristisch sind für das Derivatisierungsprodukt tauchen dagegen bei einer Retentionszeit von 7,0 Minuten neue Peaks auf.



---

<b>DGDG- 18:3-[D]-AZA</b>	n.d.	n.d.	n.d.			n.d.	n.d.
<b>DGDG- 16:3-AZA</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>DGDG- 16:3-[D]-AZA</b>	n.d.	n.d.	n.d.			n.d.	n.d.
<b>DGDG- 18:3-ONA</b>	5,7 +/- 0,6	4,1 +/- 0,5	12,9 +/- 1,3	6,8 +/- 2,6	9,1 +/- 5,6	4,1 +/- 0,5	9,2 +/- 0,3
<b>DGDG- 18:3-[D]-ONA</b>	n.d.	n.d.	n.d.			n.d.	n.d.
<b>DGDG- 16:3-ONA</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>DGDG- 16:3-[D]-ONA</b>	n.d.	n.d.	n.d.			n.d.	n.d.

Tabelle VII-6: Summe der gemessenen komplexen Lipide im Wildtyp Col0 und in der Mutante *lox2-1*. In der Tabelle sind die Mittelwerte der einzelnen Spezies mit Standardabweichung (n=3) unter basalen Bedingungen und 24 Stunden nach Pathogenbehandlung angegeben. Zusätzlich wurde der Anstieg berechnet.

Col0	Lipid/TG ( $\mu\text{mol/g}$ )		Lipid/TG ( $\mu\text{mol/g}$ )		Anstieg (x-fach)
	basal		24h Pst		
	MW	STABW	MW	STABW	
Summe MGDG	8,22	0,59	15,25	1,37	1,9
Summe DGDG	5,26	0,39	6,26	0,30	1,2
Summe oxMGDG	0,63	0,10	6,63	1,82	10,5
Summe oxDGDG	0,38	0,05	0,79	0,27	2,1
Summe PL	16,73	2,58	21,20	3,35	1,3
Summe oxPL	0,09	0,02	0,48	0,07	5,3
Summe TG	0,61	0,08	5,21	1,33	8,5
Summe oxTG	0,00	0,00	0,74	0,30	214,6
<b><i>lox2-1</i></b>					
Summe MGDG	9,76	0,49	19,43	1,66	2,0
Summe DGDG	4,63	0,26	7,17	0,58	1,6
Summe oxMGDG	0,64	0,05	0,87	0,08	1,4
Summe oxDGDG	0,38	0,04	0,40	0,10	1,1
Summe PL	15,81	2,14	25,00	6,22	1,6
Summe oxPL	0,07	0,01	0,41	0,14	5,7
Summe TG	1,01	0,13	9,27	0,38	9,1
Summe oxTG	0,01	0,00	0,99	0,07	186,0



## DANKSAGUNG

---

### **DANKSAGUNG**

Ein besonderer und herzlicher Dank geht an Herrn Professor Dr. Dr. Martin J. Müller für die Überlassung des interessanten und spannenden Dissertationsthemas. Ich danke Ihnen für ihr stetes Interesse, Ihre außerordentlich gute Betreuung und andauernde, zuverlässige Unterstützung.

Vielen Dank an Herrn PD Dr. Dirk Becker für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich dem Sonderforschungsbereich 567 und dem Graduiertenkolleg 1342 „Lipid Signalling“.

Ich danke umfassend allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie für die nette Arbeitsatmosphäre, die Hilfe und Unterstützung. Mein herzlichster Dank geht an Beate Krischke und Dr. Nadja Stingl, die immer für mich da waren, mich aufheiterten und stets unterstützten – privat und beruflich. Des Weiteren möchte ich mich insbesondere bei Barbara Dierich, Dr. Markus Krischke, PD Dr. Susanne Berger, Dr. Gabriele Gresser, PD Dr. Frank Waller, Dr. Markus Peer, Dr. Agnes Fekete, Dorothee Hahne, Benjamin Mielich, Florentin Baur und Anna Fischer für ihre Unterstützung und Hilfe bedanken. Vielen Dank für die netten Gespräche an Jens Lautenschläger, Monika Weidner, Melanie Baumann, Anne Schmidt, Tina Hellman, Simone Zapf und wen ich jetzt hier vergessen habe bzw. weil ich aus Platzgründen nicht alle aufzählen kann ☺. Ihr habt dazu beigetragen, dass die Zeit während der Promotion zu einem unvergesslichen, schönen Lebensabschnitt wurde.

Vielen Dank ans „Gärtner-Team“, insbesondere an Joachim Rothenhöfer, für die Arbeit, Hilfe und Unterstützung, ebenso wie die lustigen und aufheiternden Gespräche. Ein Dank an dieser Stelle auch ans Werkstatt-Team.

Ich möchte meiner Familie ganz herzlich danken, ohne deren finanzielle und moralische Unterstützung die Promotion nicht möglich gewesen wäre. Vielen Dank Mama, Papa, Angie, Andi, Oma Maria und Opa Otto.

Insbesondere danke ich meinem Freund Daniel, der mich stets geduldig ertragen hat, auch wenn der Stress noch so groß war. Vielen Dank für deine Unterstützung, deine Hilfe und Geduld.

## EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

---

### **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, den 05.03.2012

Maria Zöllner